

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Die Rolle des Wachstumsfaktors Progranulin
in der Progression der Atherosklerose –
eine *in vivo* - Studie im Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anja Stundl
aus
München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Elisabeth
Deindl

Prof. Dr. med. Jens Waschke

Prof. Dr. med. Christian Weber

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Katrin Echtler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2016

Eidesstattliche Versicherung

Stundl, Anja

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Die Rolle des Wachstumsfaktors Progranulin in der Progression der Atherosklerose
– eine *in vivo* - Studie im Mausmodell“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bonn, den 01.06.2015

Anja Stundl

TABLE OF CONTENTS

Part 1. Summary.....	1
Zusammenfassung	3
Part 2. Einleitung	5
2.1 Atherosklerose	5
2.1.1 Bedeutung der Atherosklerose	6
2.1.2 Prävalenz	6
2.1.3 Pathogenese und Stadien der Atherosklerose	6
2.1.4 Die Rolle inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Atherosklerose	9
2.1.5 Tiermodelle	11
2.1.5.1 Apolipoprotein E – defiziente Maus (ApoE ^{-/-} - Maus).....	12
2.2 Progranulin	13
2.2.1 Lokalisation.....	14
2.2.2 Struktur.....	14
2.2.3 Funktion.....	16
2.3 Leukozyten	18
2.3.1 Leukozytenadhäsionskaskade	19
2.3.1.1 Interstitielle Migration.....	21
2.3.2 Die pathogenetische Rolle der Leukozyten im inflammatorischen Prozess der Atherogenese.....	22
2.3.2.1 Methoden der <i>in vivo</i> – Visualisierung von Leukozyten.....	24
2.4 Zielsetzung der Arbeit	26
Part 3. Material und Methoden	28

3.1	Versuchstiere/Zucht	28
3.1.1	Wildtyp/Kontrollstamm	28
3.1.2	Transgene Tiere.....	29
3.1.2.1	ApoE ^{-/-}	29
3.1.2.2	PGRN ^{-/-}	29
3.1.2.3	PGRN ^{-/-} ApoE ^{-/-}	29
3.1.3	Knochenmarkchimären.....	30
3.1.3.1	Präparation des Knochenmarks	30
3.1.3.2	Knochenmarksdepletion durch Ganzkörperbestrahlung	32
3.1.3.3	Knochenmarkstransplantation	32
3.1.4	Genetische Identifikation der transgenen Tierstämme durch PCR und Gelelektrophorese	33
3.1.4.1	Gewinnung der Gewebeprobe.....	34
3.1.4.2	DNA-Isolation.....	34
3.1.4.3	Konzentrationsbestimmung von gelösten Nukleinsäuren	34
3.1.4.4	Amplifizierung der zu bestimmenden Gensequenzen.....	35
3.1.4.5	Auftrennung der Banden / Gelelektrophorese	37
3.1.4.6	Dokumentation.....	39
3.2	Tierhaltung.....	39
3.3	Versuchsdurchführung	41
3.3.1	Narkosedurchführung.....	41
3.3.1.1	Inhalationsnarkose.....	42
3.3.1.2	Injektionsnarkose.....	42
3.3.2	Operatives Vorgehen	43
3.3.2.1	A. carotis-Mausmodell	43
3.3.2.1.1	Katheterisierung der Vena jugularis	44
3.3.2.1.2	Chirurgische Präparation der Arteriae Carotides.....	45
3.3.2.1.3	Übersicht über den Versuchsaufbau	46
3.3.2.1.4	Versuchsprotokoll/Dokumentation.....	47
3.3.2.1.5	Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)	49

III | Table of contents

3.3.2.1.5.1	Prinzipien der IVM	49
3.3.2.1.5.2	Durchführung der IVM	50
3.3.2.1.5.2.1	Fluoreszenzfarbstoff – Acridinorange	50
3.3.2.1.6	Auswertung der Videoaufzeichnungen	51
3.3.2.2	Modell des Musculus cremaster	52
3.3.2.2.1	Intraskrotale Injektion	52
3.3.2.2.2	Chirurgische Präparation des Musculus cremaster	53
3.3.2.2.3	Übersicht über den Versuchsaufbau	54
3.3.2.2.4	Versuchsprotokoll / Dokumentation	55
3.3.2.2.5	RLOT (“Reflected-Light Oblique Transillumination”) – Intravitalmikroskopie	57
3.3.2.2.5.1	Prinzipien der RLOT	57
3.3.2.2.5.2	Durchführung der RLOT	58
3.3.2.2.5.3	TNF-alpha	58
3.3.2.2.6	Auswertung der Videoaufzeichnungen	59
3.3.3	Bestimmung des Ausprägungsgrades der atherosklerotischen Veränderungen	60
3.3.3.1	Probengewinnung	60
3.3.3.1.1	Blutabnahme durch Punktion der Vena facialis zur Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl	60
3.3.3.1.2	Intrakardiale Blutentnahme zur Bestimmung von Lipidstoffwechselfparametern	61
3.3.3.2	Histopathologische Untersuchungen	62
3.3.3.2.1	Organentnahme	62
3.3.3.2.2	Färbungen	63
3.3.3.2.2.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	63
3.3.3.2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	64
3.3.3.2.2.3	Elastika-van-Gieson-Färbung	65
3.3.3.2.3	Immunhistochemie	65
3.3.3.2.3.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	66
3.3.3.2.3.2	Immunhistologische Färbungen	67
3.3.3.2.3.2.1	Doppelfärbung	67
3.3.3.2.3.2.2	Dreifachfärbung	68
3.3.3.2.4	Sudan-III-Färbung	70

3.3.4	Statistische Berechnungen	71
Part 4. Ergebnisse.....		73
4.1	Ergebnisse des A. Carotis-Mausmodells.....	73
4.1.1	Körpergewicht der Versuchstiere	73
4.1.2	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, des Plasma-Cholesterins und des High-Density-Lipoproteins (HDL).....	74
4.1.3	Hautveränderungen.....	79
4.1.4	Rolle von Leukozyten in der Atheroprogession <i>in vivo</i>	80
4.2	Ergebnisse des M. Cremaster - Mausmodells	86
4.2.1	Quantifizierung der dynamischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mittels „Reflected-Light Oblique Transillumination“ (RLOT) – Intravitalmikroskopie am Modell des murinen Musculus cremaster <i>in vivo</i>	86
4.2.1.1	Gesamtleukozytenzahl im Blut	88
4.2.1.2	Gefäßdurchmesser	88
4.2.1.3	Anteil fest adhärenter Leukozyten	89
4.2.1.4	Anteil rollender Leukozyten	92
4.2.1.5	Anzahl transmigrierter Leukozyten	94
4.3	Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen.....	97
4.3.1	Charakterisierung der organischen Veränderungen – histopathologische Befunde an Paraffinschnitten.....	97
4.3.2	Charakterisierung der organischen Veränderungen – histopathologische Befunde an Gefrierschnitten	102
4.3.3	Charakterisierung der organischen Veränderungen – histopathologische Befunde an Sudan – III – Präparaten des Arcus Aortae.....	107
Part 5. Diskussion		111
5.1	Diskussion der Ergebnisse	111
5.1.1	Einfluss von Progranulin auf die dynamische Leukozyten-Endothel-Interaktion....	111
5.1.1.1	Makrozirkulatorisches Setting im Rahmen der Atherosklerose.....	112

5.1.1.2	Mikrozirkulatorisches Setting im Rahmen der sterilen Entzündung – Progranulin als Regulator für die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	114
5.1.2	Einfluss von Progranulin auf den Ausprägungsgrad atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen / Relevante leukozytäre Quelle von Progranulin	115
5.2	Ausblick	118
Part 6.	Danksagung.....	120
Part 7.	Abkürzungsverzeichnis	122
Part 8.	Abbildungsverzeichnis	126
Part 9.	Tabellenverzeichnis	130
Part 10.	Literaturverzeichnis	131

Part 1. SUMMARY

The exact molecular and cellular mechanisms which build up to the initiation and progression of atherosclerosis and ultimately to dangerous disease-associated events, including myocardial infarction and stroke, remain elusive and are, to date, subject to various medical and biochemical research.

This thesis will elaborate on the functional role of the growth factor Progranulin and its role in the progression of atherosclerosis. This was investigated *in vivo* by means of two different mouse models.

Crossbreeding ApoE-deficient mice, used frequently as mouse model of early-stage atherosclerosis, with mice lacking PGRN, we generated mice double deficient of the ApoE - and PGRN - gene. Building on this model, we were able to elucidate the influence of Progranulin on atherogenesis. We were able to show, that deficiency of Progranulin exhibits a strong influence on atheroprogession. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - mice, in contrast to PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - mice, showed a severely accelerated and aggravated version of atherosclerosis. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - mice presented with significantly higher tight leukocyte adhesion at the atherosclerotic predilection sites of the carotid artery vessel endothelium as well as greater predisposition to diffuse and extended atherosclerotic vascular alterations.

In mice lacking PGRN, an analysis of dynamic leukocyte-endothelium interactions in microvasculature was conducted. To do so, sterile inflammation was induced by treating the vasculature of the exposed cremaster muscle of PGRN^{-/-} - mice and wildtype controls using TNF-alpha injection and leukocyte adhesion was recorded. Likewise, PGRN^{-/-} - mice presented with significantly higher tight leukocyte adhesion in response to the TNF- α -induced inflammatory stimulus. Moreover, an increased tendency for tethering, rolling and transmigration into the neighboring interstitial tissue compared to the control group PGRN^{+/+} could be shown.

Hence, it could be shown that progranulin plays a pivotal role in the initiation and progression of atherosclerosis: not only has it a regulatory function on recruitment and adhesion of immune cells, but also does it exhibit anti-inflammatory and atheroprotective functions, to some extent due to the fact that Progranulin is a natural competitive antagonist for the TNF-receptor.

Based on these insights on the pathophysiological importance of Progranulin in atherogenesis, it appears to be a promising target for the development of future pharmaceutical therapy options for the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

ZUSAMMENFASSUNG

Die exakten molekularen und zellulären Mechanismen, welche zu Initiation und Progression der Atherosklerose und letztlich zu den gefürchteten atherosklerotischen Folgeerkrankungen, hierunter Myokardinfarkt und Apoplex, führen, sind bis heute Gegenstand vielfältiger medizinischer und biochemischer Forschungsbemühungen und noch nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die funktionelle Rolle des Wachstumsfaktors Progranulin in der Progression der Atherosklerose *in vivo* in zwei Mausmodellen näher untersucht. Im Detail wurde analysiert, inwiefern Progranulin die Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten steuert und die Ausbildung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen beeinflusst.

Auf dem Boden eines bereits etablierten und häufig angewandten Mausmodells der frühen Atherosklerose, nämlich der ApoE-defizienten Maus, wurde ein Doppel-Knockout-Mausmodell generiert, welches überdies auch eine Defizienz des Progranulin-Gens aufweist. Auf diese Weise konnte der Einfluss von Progranulin (PGRN) auf die Atherogenese herausgearbeitet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von Progranulin einen erheblichen Einfluss auf die Atheroprogession nimmt. Im Doppel-Knockout-Stamm $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ war, im Gegensatz zur Kontrollgruppe $PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}$, eine erhebliche Akzeleration und Aggravation der Atherogenese zu objektivieren gewesen. Die $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ - Mäuse zeichneten sich durch eine signifikant gesteigerte feste Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel atherosklerotischer Prädilektionsstellen in der Makrozirkulation der Arteria carotis aus. Darüber hinaus führte die Depletion von Progranulin zu einer übersteigerten Ausbildung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen.

Anhand eines weiteren Mausmodells, dem Cremaster-Modell, konnte der Einfluss von Progranulin auf die dynamische Leukozyten-Endothel-Interaktion in Mikrogefäßen des Musculus cremaster im Rahmen einer sterilen Inflammation untersucht werden. Hier führte die Defizienz von Progranulin zu einer ebenfalls signifikant gesteigerten festen Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel als Reaktion auf den inflammatorischen Stimulus. Ebenso konnte eine steigende Tendenz zum Rolling

und zur Transmigration in das umgebende Interstitium im Vergleich zur Kontrollgruppe PGRN^{+/+} aufgezeigt werden.

Für Progranulin konnte somit eine zentrale Bedeutung für die Initiation und Progression der Atherosklerose belegt werden: es wirkt nicht nur regulierend auf Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen ein, sondern entfaltet auch, nicht zuletzt durch seinen natürlichen kompetitiven Antagonismus am TNF-Rezeptor, antiinflammatorische und atheroprotektive Wirkungen.

Aus der Erkenntnis der pathophysiologischen Bedeutung von Progranulin in der Atheroprogression könnte sich eine zukunftssträchtige und vielversprechende Grundlage für die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieoptionen zur Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen ergeben.

Part 2. EINLEITUNG

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes verstarben 2011 insgesamt 342.233 Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen [1]. Es lässt sich zwar im Vergleich zum Vorjahr eine leicht fallende Tendenz in den Todeszahlen erkennen [2], nichtsdestotrotz macht die Atherosklerose mit ihren klinischen Folgeerkrankungen, hierunter Myokardinfarkt und Apoplex, nach wie vor die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen aus [1, 3, 4]. Die weiterhin hohe Anzahl an insgesamt von atherosklerotischen Folgeerscheinungen betroffenen Menschen verdeutlicht, warum auch noch gegenwärtig die Pathogenese der Atherosklerose Gegenstand vielfältiger medizinischer, und biochemischer Forschungsbemühungen ist. Ein besseres Verständnis der komplexen Abläufe des zugrundeliegenden Krankheitsprozesses auf molekularer Ebene soll dazu beitragen, neue Ansatzpunkte für präventive Strategien und Therapieoptionen zu entwickeln, um den Krankheitsverlauf bereits erkrankter Patienten positiv zu beeinflussen, das unaufhaltsame Fortschreiten der Krankheit hinauszuzögern, und mittel- bis langfristig das Auftreten von Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems zu senken.

2.1 ATHEROSKLEROSE

Die Atherosklerose wird nach Definition der Welt-Gesundheits-Organisation (kurz: WHO) als „variable Kombination von Veränderungen der innersten Schicht der Gefäßwand von Arterien, der Intima“, bezeichnet. Diese besteht aus „herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut sowie Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia in den großen und mittleren Arterien“ [5, 6].

Atherosklerose und Arteriosklerose werden häufig als Synonym gebraucht, doch sind beide voneinander zu unterscheiden. Die „Atherosklerose“ ist „eine chronisch-progrediente, in erster Linie fokale, aber auch diffuse Veränderung der Arterienwand“, die ihren Ausgang in der innersten Schicht, der Tunica intima, nimmt [7], wohingegen man unter der „Arteriosklerose“ eine generelle

Arterienverhärtung versteht, die durch Fibrose und Mediaverkalkung charakterisiert ist und mit zunehmendem Alter auftritt [8].

2.1.1 BEDEUTUNG DER ATHEROSKLEROSE

Bei der Atherosklerose handelt es sich um die häufigste, chronisch-rezidivierende und chronisch-progrediente, nicht selten schon im Kindesalter beginnende inflammatorische Arterienerkrankung, die zunächst lange Zeit asymptomatisch verläuft [6, 9]. Häufigste klinische Folgeerkrankungen sind die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihrer akuten Manifestation, dem Myokardinfarkt, der atherosklerotische zerebrovaskuläre Insult (CVI) oder die peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen (pAVK/cAVK) [10, 11].

2.1.2 PRÄVALENZ

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes (DESTATIS 2011) waren wie schon in den Vorjahren auch im Jahr 2011 kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache für Sterbefälle in Deutschland. 2011 verstarben insgesamt 342.233 Menschen (40,2%) an Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems [1]. Aber auch global gesehen stehen die atherosklerotischen Folgeerkrankungen nach wie vor an der Spitze der Haupttodesursachen [4, 12].

2.1.3 PATHOGENESE UND STADIEN DER ATHEROSKLEROSE

Die Pathogenese der Atherosklerose ist bis heute Gegenstand der aktuellen Forschung und noch nicht vollständig geklärt. Entgegen der früheren vorherrschenden Meinung, der atherosklerotische Gefäßumbau sei im Wesentlichen bedingt durch eine gesteigerte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und damit verbundener vermehrter Ablagerung cholesterinreicher Lipoproteine in der innersten Gefäßschicht, der Intima [13, 14], weiß man heute, dass es sich um einen viel komplexeren Vorgang handelt, welcher maßgeblich durch eine unspezifische inflammatorische Reaktion der Gefäßwand charakterisiert ist [15]. Durch Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren, insbesondere durch eine hohe Serum-LDL-Konzentration, kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion [11]. Durch

gesteigerte Endothelpermeabilität für verschiedenste Lipoproteine, u.a. LDL-Partikel oder auch Lipoprotein (a), welche einer oxidativen und möglicherweise auch anderweitigen Modifikation unterliegen, reichern sich diese in der Gefäßwand an und wirken stark proinflammatorisch [16, 17]. Durch konsekutiv gesteigerte Synthese von entzündungsfördernden und proatherogenen Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen, u.a. Tumornekrosefaktor-alpha (kurz: TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), durch die in die Arterienwand eingewanderten Zellen wird eine Entzündungsreaktion in den Gang gesetzt [15, 18], und Leukozyten rekrutiert [14]. Prädilektionsstellen für derartige endotheliale Veränderungen stellen in erster Linie Aufzweigungen von Arterien dar, an denen turbulente Strömungen auftreten, welche erhöhte mechanische Scherkräfte auf die Gefäßwand ausüben [15, 19, 20], und eine verminderte Verfügbarkeit des endothelialen Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) bewirken [11, 21]. In der Folge kommt es zu einer verminderten Fähigkeit des Gefäßes zur Dilatation und auch zu einer Abnahme der durch Stickstoffmonoxid hervorgerufenen antiinflammatorischen Effekte [22, 23].

Nach Beginn des atherosklerotischen Umbauprozesses im Endothel manifestiert sich die nächste, bereits z.T. makroskopisch sichtbare Erscheinungsform der Atherosklerose durch Bildung sogenannter Fettstreifen („fatty streaks“), welche durch subendotheliale Ansammlung von fettbeladenen Monozyten und Makrophagen, den sogenannten Schaumzellen („foam cells“), von T-Lymphozyten sowie glatten Muskelzellen charakterisiert sind [14, 24]. Diese streifigen Fetteinlagerungen können bereits in der ersten Lebensdekade nachgewiesen werden [25-27]. Sie zählen vielmehr zu Vorstufen weiter fortgeschrittener atheromatöser Läsionen [27].

Das nächste Stadium im atherosklerotischen Prozess umfasst die Bildung einer fortgeschrittenen, komplizierten, jedoch stabilen Plaque mit Ausbildung einer fibrösen Kappe. Eine fibröse Schicht bestehend aus extrazellulärer Matrix, Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgibt eine beginnend nekrotische Zone aus überwiegend Leukozyten, Lipiden und Zelltrümmern, und trennt diese vom Gefäßinneren, dem Lumen, ab [14, 27]. Mit progredientem Wachstum der fortgeschrittenen, komplizierten Plaque durch Einwanderung von Monozyten in die Läsion bildet sich unter der fibrösen

Kappe ein sogenannter nekrotischer Kern („necrotic core“) [24], der sich aus extrazellulären Lipiden, Cholesterinkristallen und abgestorbenen Zelltrümmern zusammensetzt [14, 28].

Von einer fortgeschrittenen, komplizierten, instabilen oder auch „vulnerablen“ Plaque ist die Rede, wenn die fibröse Kappe eine zunehmende Instabilität aufweist [14, 27]. Die mangelnde Stabilität und die Ausdünnung der fibrösen Kappe ist Ausdruck eines gestörten Gleichgewichts von Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix und zunehmender Beanspruchung durch die Akkumulation der Lipide [14, 27, 29, 30]. Folge der stetig dünner werdenden fibrösen Kappe ist häufig die Plaqueruptur [14]. Diese tritt bevorzugt an den Rändern der fibrösen Kappe, den sogenannten Schulterregionen, auf [14, 31]. Die Plaqueruptur hat die Freilegung von Bestandteilen der Gefäßwand, der subendothelialen Matrix, wie z.B. Kollagen, und Lipiden zur Folge und führt konsekutiv zu einer Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Es resultieren Thrombusformation und Ischämie [14].

Stadien der Atherosklerose

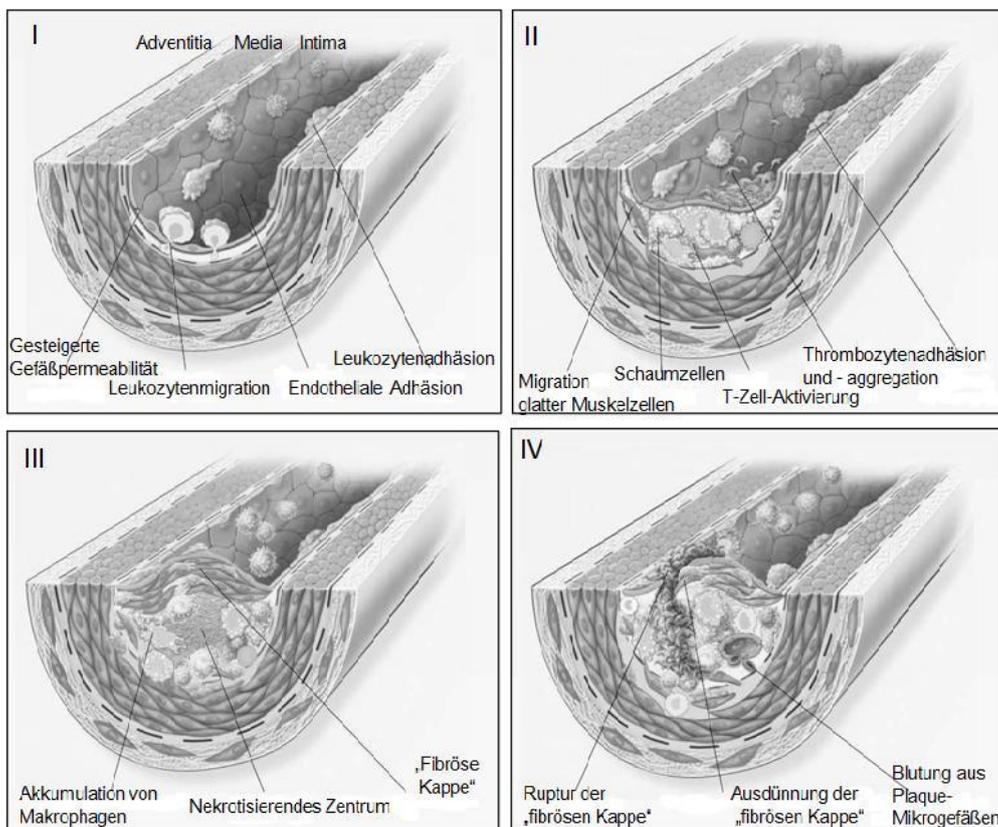


Abbildung 1: Stadien der Atherosklerose: I: Endotheliale Dysfunktion , II: Bildung von „fatty streaks“, III: Stabile Plaque-Bildung der fibrösen Kappe, IV: Instabile Plaque mit Plaqueruptur, modifiziert nach [14].

2.1.4 DIE ROLLE INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE UND CHEMOKINE IN DER ATHEROSKLEROSE

Zytokine stellen regulatorische Peptide dar, die in der Steuerung der angeborenen und adaptiven Immunantwort, u.a. bei Entzündungsprozessen wie der Atherosklerose, eine entscheidende Rolle spielen. Sie werden von Basophilen, dendritischen Zellen (DCs), Eosinophilen, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, natürlichen Killerzellen (NKs), und Neutrophilen sezerniert [32], und können sowohl als proinflammatorische als auch als antiinflammatorische Mediatoren fungieren [33].

Es werden im Wesentlichen fünf Hauptgruppen von Zytokinen unterschieden: Interferone (kurz: IFN), Interleukine (kurz: IL), koloniestimulierende Faktoren (kurz: CSF), Tumornekrosefaktoren (kurz: TNF) und Chemokine [33]. In den frühen Stadien der Atherosklerose bewirken Zytokine eine Veränderung der endothelialen Permeabilität, setzen eine Entzündungsreaktion in den Gang, und fördern somit die Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten in die Arterienwand [14, 34]. In fortgeschritteneren Stadien der Atheroprogression können sie durch die Förderung von Apoptose und Matrixdegeneration zu einer Destabilisation der atherosklerotischen Plaque und somit zur Plaqueruptur führen [34].

Im Folgenden soll auf das in der vorliegenden Arbeit relevante Zytokin näher eingegangen werden:

Der Tumornekrosefaktor-alpha (kurz TNF- α) ist ein stark proinflammatorisches und proatherogenes Zytokin [35, 36] und damit ein Signalstoff des Immunsystems [37]. Es wurde erstmals vor mehr als 25 Jahren aufgrund seines Charakteristikums, Tumorzellen *in vitro* direkt abzutöten und in tumortransplantierten Mäusen Nekrosen zu induzieren, als solcher beschrieben [38]. TNF- α gehört einer Gruppe von Entzündungsmediatoren an, die alle eine Steigerung der Synthese von Akute-Phase-Proteinen bewirken. Er wird vorherrschend von Makrophagen und Monozyten freigesetzt [35, 37], und ist dazu in der Lage, verschiedene Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation sowie

Zelldifferenzierung und Ausschüttung weiterer Signalstoffe hervorzurufen [35]. TNF- α spielt eine entscheidende Rolle bei der Modulation des Immunsystems, bei verschiedensten akuten und chronischen Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel bei bakteriellen Infektionen, Sepsis, oder im Rahmen der Atherosklerose, bei Autoimmunerkrankungen, bei der Bekämpfung von Tumorzellen, bei Kachexie, und bei Lungenfibrose [39].

TNF- α bindet als Ligand an korrespondierende Membranrezeptoren, die sogenannten TNF-Rezeptoren, welche praktisch an allen Körperzellen mit Ausnahme von Erythrozyten exprimiert werden, und entfaltet so seine Wirkung [40]. Der Rezeptor führt über seine Aktivierung zur Vermittlung von Signalen, die an der Zielzelle zu den mannigfaltigen Wirkungen von TNF- α , wie zum Beispiel Apoptose, Zellproliferation oder Zelldifferenzierung, führen. Die TNF-Rezeptoren sind Bestandteil einer großen Rezeptorfamilie, die auch als TNF-Rezeptor-Superfamilie bekannt ist. Innerhalb dieser Rezeptorgruppe werden zwei Rezeptorarten unterschieden [40, 41], die sich nicht nur in ihrer Bindungsaffinität gegenüber TNF- α abgrenzen lassen, sondern auch abweichende intrazelluläre Signalkaskaden induzieren [42]. Zum einen gibt es Rezeptoren, die eine sogenannte „Todesdomäne“ (death domain, DD) besitzen und somit dazu befähigt sind, den programmierten Zelltod zu induzieren. Zum anderen kommen Rezeptoren vor, welche über die Freisetzung von TNF-Rezeptor-assoziiierter-Faktoren (kurz: TRAFs) immunmodulatorische Effekte oder Entzündungsreaktionen vermitteln [43, 44].

Nach Interaktion von TNF- α mit dem TNF-Rezeptor I (kurz: TNFR-I) kann sowohl ein proinflammatorischer als auch ein proapoptotischer Signalweg eingeleitet werden [42]. Über die „TNF-Rezeptor-assoziierte-Todesdomäne“ (kurz: TRADD) werden weitere intrazelluläre Adapterproteine wie das „Rezeptor-interagierende-Protein“ (kurz: RIP), der „TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor-2“ (kurz: TRAF2) oder die „Fas-assoziierte-Todesdomäne“ (kurz: FADD) rekrutiert [45].

Zur Apoptose kommt es letztlich, wenn das proteolytische Enzym Caspase 8 durch die FADD aktiviert wird [46]. Im Gegensatz dazu kann TNF- α seine antiapoptotische Wirkung entfalten, wenn es über den TNF-Rezeptor I und die FADD die intrazellulären Adaptermoleküle RIP sowie TRAF2 anregt, und

so zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B („nuclear factor kappa beta“) und AP-1 („Aktivator Protein-1“) beiträgt. In der Folge wird die Transkription verschiedenster inflammatorischer Gene induziert und Proatherogenität erzeugt [33, 44, 47]. Anders als der TNF-Rezeptor I verfügt der TNF-Rezeptor II (kurz: TNFR-II) nicht über die „TNF-Rezeptor-assoziierte-Todesdomäne“. Nach Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor II wird unmittelbar TRAF2 aktiviert, und in der Folge NF- κ B sowie AP-1 zur Transkription inflammatorischer Gene angeregt [48]. Proatherogenität ist die Folge [33].

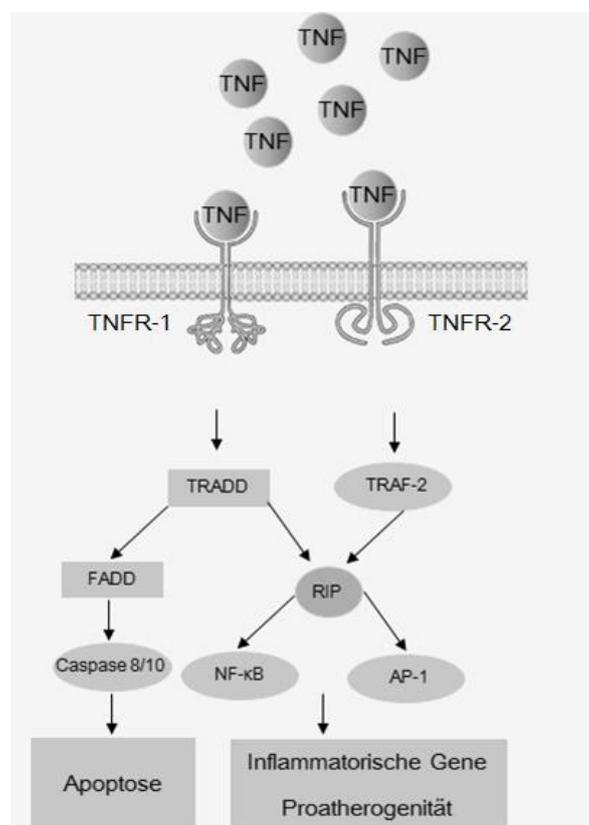


Abbildung 2: Die Signalkaskaden nach Bindung von TNF- α an den TNFR-1 und an den TNFR-2, modifiziert nach [33, 41].

2.1.5 TIERMODELLE

Durch gezielte genetische Manipulation ist es gelungen, Mauslinien zu entwickeln, die für die Atherosklerose empfänglich sind [49]. Vorteil der Maus als Versuchstier ist zum einen die geringe

genetische Varianz und zum anderen die rasche Aufzucht [50, 51]. Gegenwärtig gibt es diverse Mausmodelle, die in der Atherosklerose-Forschung eingesetzt werden. Durch gezielten Knock-out von spezifischen Genen des Lipidstoffwechsels stehen die Apolipoprotein E - defiziente Maus (ApoE^{-/-} - Maus) und die LDL - Rezeptor - defiziente Maus (LDLR^{-/-} - Maus) im Vordergrund atherosklerotischer Forschung [52, 53].

Im Folgenden soll auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell näher eingegangen werden:

2.1.5.1 APOLIPOPROTEIN E – DEFIZIENTE MAUS (APOE^{-/-} - MAUS)

Apolipoprotein E (kurz: ApoE) ist ein Glykoprotein, welches überwiegend in der Leber und im Gehirn synthetisiert wird und einen wichtigen Bestandteil nahezu aller Lipoproteine mit Ausnahme von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) darstellt. Es fungiert als wichtiger Ligand für die Erkennung durch Lipoproteinrezeptoren [49, 54, 55], welche für die zelluläre Aufnahme von Lipiden verantwortlich sind [56]. Die antiatherogene Eigenschaft des Apolipoproteins E ist einerseits auf seine Fähigkeit zurückzuführen, entscheidenden Einfluss auf die Beseitigung von Lipiden aus dem Plasma zu nehmen [56, 57]. Andererseits besitzt es antioxidative Eigenschaften und verringert unter Umständen die oxidative Modifikation von Lipiden [58]. Nicht zuletzt beeinflusst Apolipoprotein E eine Vielzahl von Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Proliferation von Muskelzellen und die Lipoproteinaufnahme von Makrophagen [59, 60].

Durch einen gezielten Gen-Knockout für Apolipoprotein E (ApoE) wurde 1992 der Grundstein für das mittlerweile am häufigsten eingesetzte und gut validierte Mausmodell in der atherosklerotischen Forschung gelegt [61, 62].

Durch das Fehlen von Apolipoprotein E, welches normalerweise die Bindung von VLDL (very low density lipoprotein) und Chylomikronen an den LDL-Rezeptor vermittelt und die Voraussetzung für die Aufnahme in die Leber darstellt, kommt es zu höheren Konzentrationen von Cholesterin im Blut.

ApoE - defiziente (ApoE^{-/-}) Mäuse zeichnen sich dadurch aus, dass die entstehenden atherosklerotischen Läsionen in hohem Maße denen des Menschen gleichen [63, 64]. Auch die einzelnen Stadien des atherosklerotischen Umbauprozesses ähneln denen im Menschen [64]. Die Fettstreifen („fatty streaks“) stehen bei der ApoE - defizienten Maus (ApoE^{-/-} - Maus) ebenso am Anfang des atherosklerotischen Gefäßumbaus, gefolgt von den fortgeschrittenen, komplizierten, jedoch stabilen Plaques mit Ausbildung einer fibrösen Kappe [51, 61, 63]. Instabile, vulnerable Plaques oder Plaqueruptur werden dagegen gar nicht oder nur sehr selten beobachtet [49].

Die atherosklerotischen Veränderungen nehmen ihren Ursprung in der proximalen Aorta und dehnen sich schließlich weiter in die Peripherie aus; insbesondere sind Bezirke von Gefäßen wie zum Beispiel Gefäßabzweigungen betroffen, in denen der normale laminare Blutstrom gestört ist und daher turbulente Strömungen vorherrschen [65].

Der Plasma-Cholesterinspiegel beruht genauso wie beim Menschen auf den Ernährungsgewohnheiten, und lässt sich durch eine lipid- und cholesterinreiche, sogenannte „Western-type diet“ steigern [64]. Ein hoher Serumcholesterinspiegel ist mit einer stärkeren Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen verbunden [51, 62, 66].

2.2 PROGRANULIN

Progranulin (kurz: PGRN) ist ein faszinierendes pleiotropes Protein beziehungsweise ein Wachstumsfaktor, welcher in der Literatur auch unter den Namen Granulin-Epithelin-Vorläufer (GEP = granulin-epithelin-precursor) [67], Proepithelin (kurz: PEPI), Acrogranin [68-70] oder „PC-cell-derived growth factor“ (kurz: PCDGF) [71] bekannt ist. Progranulin wird reichlich in stark proliferierendem Gewebe wie Milz, Plazenta, Ovarien, Nebenhoden, oder Nebennieren exprimiert [72] und von Makrophagen und dendritischen Zellen aus Monozyten sezerniert [73]. Aber auch Gastrointestinaltrakt, Lunge, Nieren, Skelettmuskel, Herz und Gehirn [74] sowie hämatopoetische Zellen [75] und Tumorzellen [76] weisen eine Progranulin-Expression auf.

2.2.1 LOKALISATION

Das Progranulin-Gen ist beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 [77] und bei der Maus auf Chromosom 11 [78] lokalisiert.

2.2.2 STRUKTUR

Progranulin ist ein aus 593 Aminosäuren bestehendes, cysteinreiches Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von 68.5 kDa. Durch seine starke Glykosylierung weist es *in vivo* eine tatsächliche Größe von ungefähr 90 kDa auf [71, 79]. Progranulin setzt sich aus einem Signalpeptid und 7,5 einfach strukturierten DNA-Sequenzen („tandem repeats“) mit 12 einzigartigen cysteinreichen Granulin-Motiven zusammen [80], die durch Linker-Regionen voneinander getrennt sind [80, 81].

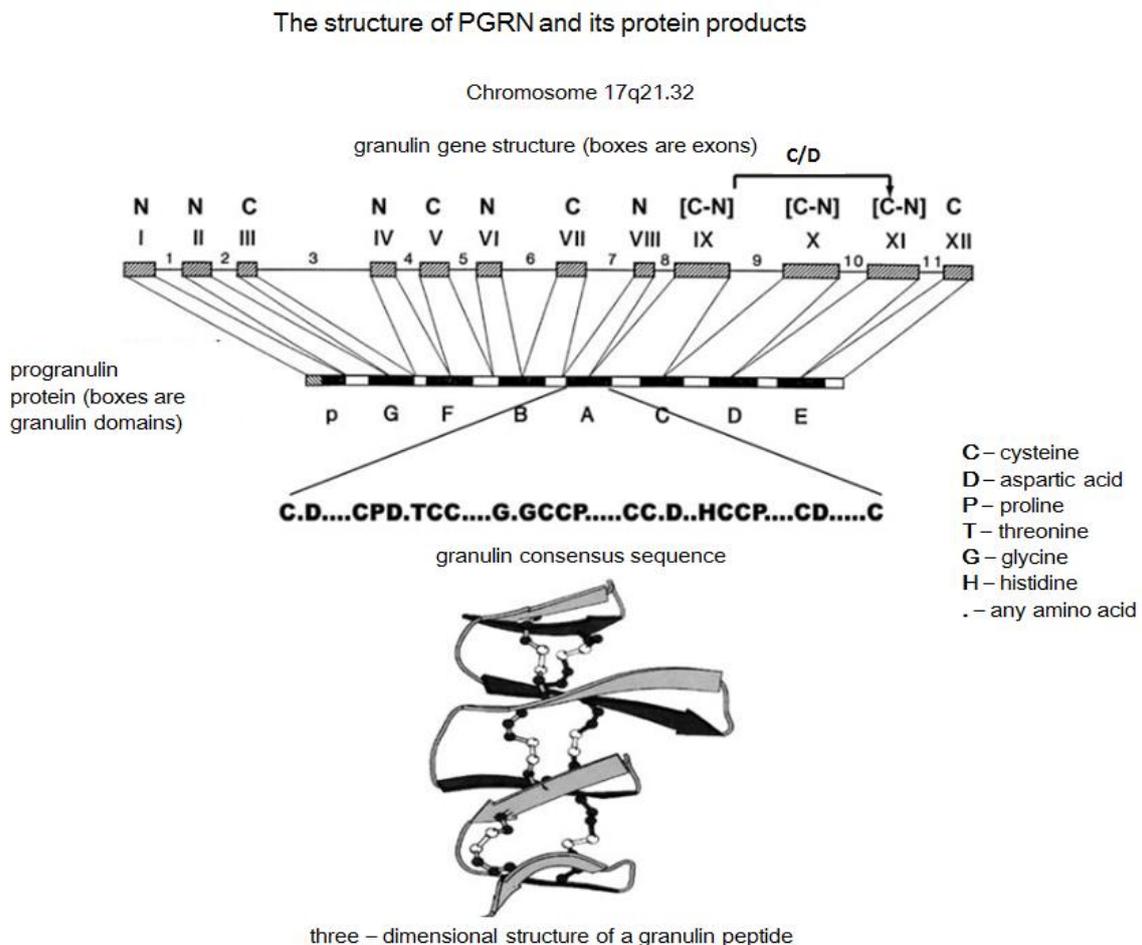


Abbildung 3: Struktur von Progranulin, modifiziert nach [76].

Proteolytische Spaltung von Progranulin durch die neutrophile Elastase oder Proteinase 3, proteolytische Enzyme der neutrophilen Granulozyten [82], erzeugt kleinere Peptide, die auch Granuline oder Epitheline genannt werden [76, 83, 84]. Bei den Granulinen oder Epithelinen handelt es sich um eine Gruppe von 7 Peptiden mit einer Molekülgröße von 6 kDa, die jeweils sechs Disulfid-Brücken enthalten. Der Vorgang der proteolytischen Spaltung kann durch den Sekretorische-Leukozyten-Protease-Inhibitor (kurz: SLPI) gehemmt werden [83]. Bei SLPI handelt es sich um ein Protein, welches unter anderem von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, und einen antiinflammatorischen Effekt auf diese beiden Zellpopulationen ausübt [85, 86]. Es besitzt die Fähigkeit, die enzymatische Aktivität von Serinproteasen wie der neutrophilen Elastase, der Proteinase 3 oder auch von Cathepsin G zu hemmen.

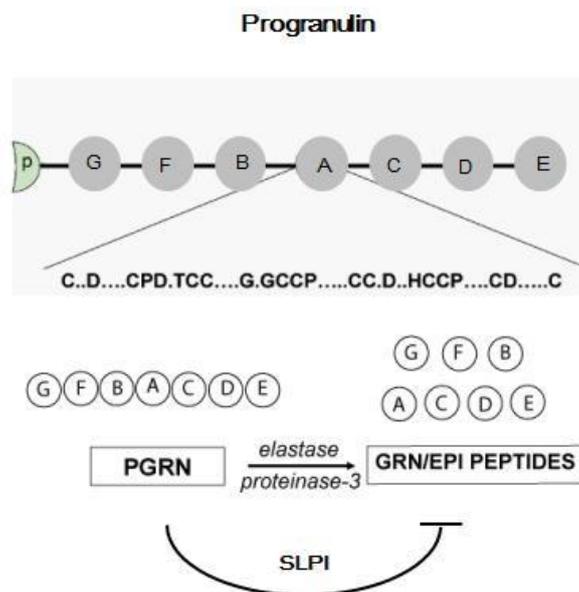


Abbildung 4: Konversion von Progranulin in Granuline - Die Rolle von SLPI und der Serinproteasen: die Proteinase 3 und die Elastase katalysieren die Überführung von Progranulin in Granuline, wohingegen SLPI die Konversion hemmt, modifiziert nach [87].

2.2.3 FUNKTION

Die physiologische Funktion von Progranulin ist zwar bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden und geklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass es als pluripotenter Wachstumsfaktor [88] fungiert, welcher eine entscheidende Rolle im Ablauf von Zellzyklus sowie Zellmotilität spielt [76], und Zellwachstum wie auch Zellüberleben begünstigt [89]. Als solcher ist Progranulin in einer Reihe von physiologischen Prozessen und biologischen Funktionen wie Entwicklung, Wundheilung nach Verletzung, und Entzündung involviert [76, 79]. Progranulin wird zudem eine Rolle als neurotrophischer Faktor zuteil [90]. Mutationen im Progranulin-Gen werden mit Formen der frontotemporalen Demenz in Verbindung gebracht [91, 92].

Erst kürzlich wurde auch seine Bedeutung in inflammatorischen Geschehen wie der Atherosklerose suggeriert, nicht zuletzt weil das gemeinsame Vorkommen von Verletzung, Entzündung und Wundheilung charakteristisch für den atherosklerotischen Prozess ist [93, 94]. Entzündliche Prozesse, wie die der Atherosklerose, werden über einen übergeordneten dreigeteilten Kreislauf reguliert:

SLPI agiert als potenter Hemmstoff der Serinproteasen, insbesondere von neutrophiler Elastase und Proteinase 3, und schützt Progranulin in seiner vollen Größe so vor Proteolyse, der enzymatischen Hydrolyse von Proteinen durch Peptidasen [83]. Dadurch, dass Progranulin direkt TNF-Rezeptoren bindet [95], blockiert es die Antwort von Makrophagen und Monozyten auf inflammatorische Stimuli [85] durch partielle Hemmung von Tumornekrosefaktor-alpha (kurz: TNF- α) und bewirkt dadurch einen antiinflammatorischen Effekt [83]. Die proteolytische Spaltung von Progranulin in die kleineren Granuline durch die neutrophile Elastase oder Proteinase 3 führt im Gegensatz dazu zu einer vermehrten Sekretion von Lockstoffen für neutrophile Granulozyten wie z.B. Interleukin-8 und damit zu einem proinflammatorischen Effekt [83].

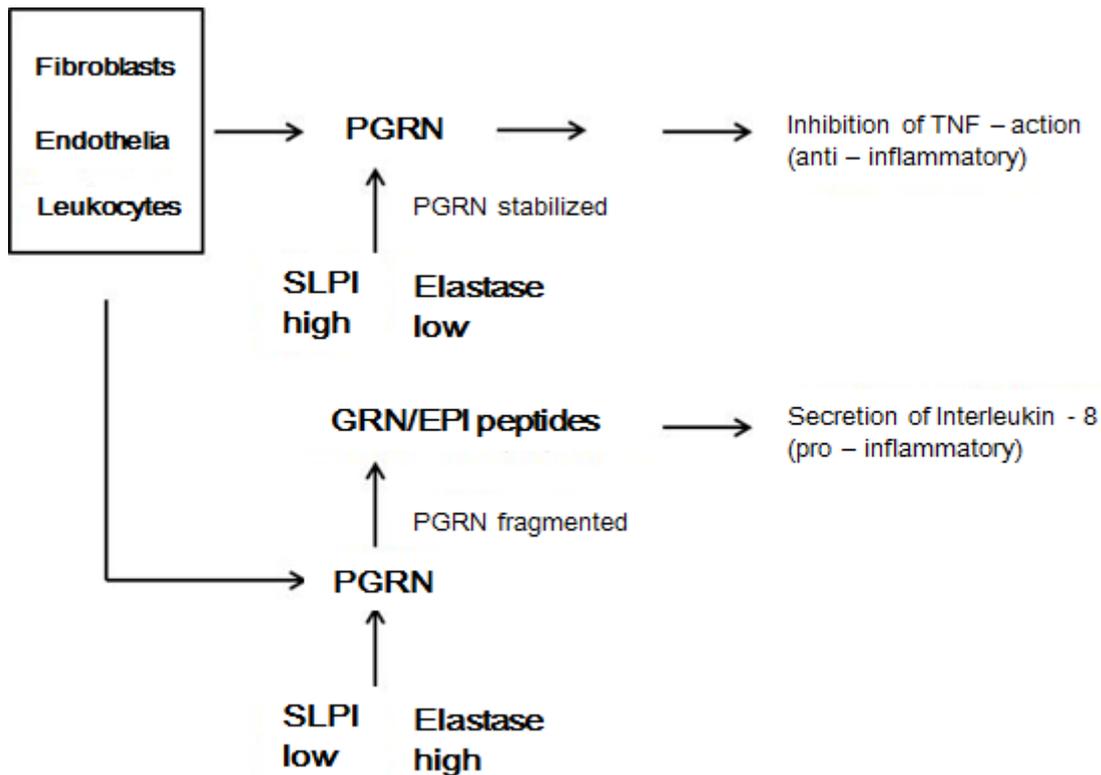


Abbildung 5: Funktionen von Progranulin bzw. Granulinen in Abhängigkeit von SLPI und neutrophiler Elastase: Dominiert SLPI, wird die proteolytische Spaltung von Progranulin gehemmt, Progranulin in seiner vollen Größe stabilisiert und ein antientzündlicher Effekt bewirkt. Dominieren dahingegen die Serinproteasen, wird Progranulin in seine kleineren Peptide, die Granuline, proteolytisch gespalten, und Interleukin-8 mit der Folge eines proinflammatorischen Effektes sezerniert, modifiziert nach [76].

Zudem konnte gezeigt werden, dass Progranulin einerseits an Apolipoprotein A-I (ApoA-I), den Hauptproteinbestandteil von Lipoproteinen hoher Dichte (*high density lipoproteins*, HDL) mit antiatherogener Wirkung, bindet [96] und andererseits die Deletion von Progranulin in einem Schutz vor Entwicklung einer Insulinresistenz bei Mäusen resultiert [97].

Progranulin-defiziente Mäuse entwickeln diverse phänotypische Veränderungen. Einerseits lassen die Tiere eine erhöhte Tendenz zu entzündlichen Veränderungen, u.a. Arthritis, erkennen [95], andererseits weisen sie Verhaltensauffälligkeiten mit sozialen Defiziten oder gestörtem männlichen Zuchtverhalten auf [98-101]. Darüber hinaus ist die Progranulin-Defizienz mit zunehmendem Alter mit progredienten kognitiven Einbußen vergesellschaftet [98, 99]. Nicht zuletzt deswegen spielen

Progranulin-defiziente Mäuse eine wesentliche Rolle in der Demenzforschung. Aktuelle Forschungsergebnisse belegen die Bedeutung von Progranulin in der Ätiologie der frontotemporalen Demenz [91, 92].

2.3 LEUKOZYTEN

Leukozyten, auch weiße Blutkörperchen genannt, sind kernhaltige Zellen des Immunsystems. Ihre Zahl liegt im Blut eines erwachsenen Menschen bei 5.000-10.000 pro Mikroliter ($5-10 \times 10^9 / l$) Blut, ist aber abhängig von verschiedensten Einflüssen wie Tageszeit oder körperlicher Aktivität. Nur ein geringer Teil der weißen Blutzellen zirkuliert im Blutkreislauf; der weitaus größere Teil verteilt sich auf verschiedenste Gewebe, wie das Knochenmark oder lymphatische Organe. Leukozyten sind amöboid beweglich, und können auf chemotaktische Reize aktiv aus dem Blut in die verschiedenen Zellgewebe einwandern („*Diapedese*“) [102, 103].

Im gefärbten Blutaussstrich lassen sich lichtmikroskopisch Gestalt und Aussehen der Leukozyten gut sichtbar machen und den verschiedenen Gruppen zuordnen. Es werden folgende Subtypen unterschieden: neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Monozyten [102-104]. Eine genaue Leukozytentypisierung (Lymphozytensubsets, u.a.) kann mittels Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse erfolgen.

Die Normalwerte der Leukozyten sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Normalwerte des weißen Differentialblutbildes		
	Mensch	Maus
Granulozyten		
• Neutrophile Granulozyten	55 - 65 %	10 - 40 %
• Eosinophile Granulozyten	2 - 4 %	0 - 4 %
• Basophile Granulozyten	0,5 - 1 %	0 - 0,3 %
Lymphozyten	20 - 40 %	55 - 95 %
Monozyten	4 - 7 %	0,1 - 3,5 %

Tabelle 1: Zusammensetzung des weißen Differentialblutbildes eines erwachsenen Menschen (links), modifiziert nach [105], sowie Zusammensetzung des weißen Differenzialblutbildes einer Maus (rechts), modifiziert nach [106, 107].

2.3.1 LEUKOZYTENADHÄSIONSKASKADE

Die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut an den Ort des inflammatorischen Geschehens ist Teil der angeborenen Immunabwehr. Die daran beteiligten Leukozyten-Endothel-Interaktionen umfassen eine Reihe hintereinander geschalteter Prozesse, die auch als Adhäsionskaskade bezeichnet werden. Initiiert wird dieser mehrstufige Prozess durch Anheftung der Leukozyten an das Endothel postkapillärer Venolen („*Tethering*“), das durch Interaktion von Selektinen, insbesondere L-, E- und P-Selektin, und diversen glykosylierten Liganden, maßgeblich durch den P-Selektin-Glykoproteinliganden 1 (kurz: PSGL-1), und deren Rezeptoren vermittelt wird [108-111]. Infolgedessen kommt es zum Rollen der Leukozyten („*Rolling*“) entlang des Gefäßendothels. Während die Leukozyten mit dem durch die entzündlich bedingte Vasodilatation verlangsamten Blutfluss langsam entlang der Gefäßwand rollen, werden sie durch Chemokine und weitere chemotaktische Botenstoffe, welche von Endothelzellen im Entzündungsgeschehen exprimiert werden, aktiviert. In der Folge werden auf der Leukozytenoberfläche Integrine aktiviert, welche über endotheliale Adhäsionsrezeptoren, wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 („intercellular adhesion molecule-1“, kurz: ICAM-1) oder das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 („vascular adhesion molecule-1“,

kurz: VCAM-1), eine feste Bindung der rollenden Leukozyten („*Adhesion*“) an die Endotheloberfläche vermitteln [109, 110, 112]. Nach erfolgter Adhäsion folgt letztlich der Durchtritt der Leukozyten durch die Gefäßwand („*Transmigration*“), welcher sowohl transzellulär als auch parazellulär erfolgen kann [113-115]. Auf der Suche nach einer geeigneten Durchtrittsstelle kriechen die Leukozyten hierzu entlang des Endothels („*Crawling*“) [110, 116, 117].

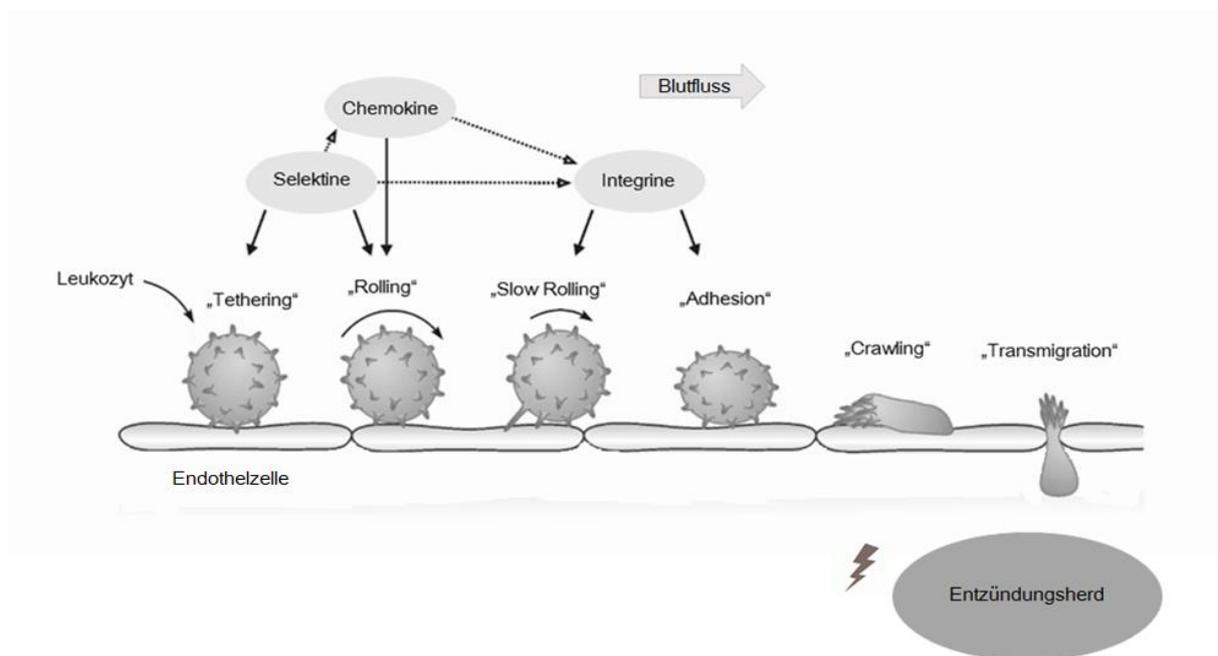


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Leukozytenadhäsionskaskade, modifiziert nach [109]. Die Leukozyten-Endothel-Interaktionen erfolgen kaskadenförmig. Leukozyten nehmen zunächst Kontakt mit dem Endothel auf („*Tethering*“). In der Folge rollen sie entlang des Endothels („*Rolling*“), werden durch Chemokineinfluss aktiviert, und adhären daraufhin fest an der Endotheloberfläche („*Adhesion*“). Auf der Suche nach einer geeigneten Durchtrittsstelle kriechen die Leukozyten entlang des Endothels („*Crawling*“), und durchwandern schließlich die Endothelzellschicht („*Transmigration*“), um an den Entzündungsherd zu gelangen.

2.3.1.1 INTERSTITIELLE MIGRATION

Nach erfolgtem Durchtritt durch die Gefäßwand („*Transmigration*“) nehmen die Leukozyten ihre Wanderung durch das Gewebe zum Ort des Entzündungsgeschehens auf, was auch als „interstitielle Migration“ bezeichnet wird [118].

Kraft eines amöboiden Bewegungsmusters bahnen sich die Leukozyten ihren Weg zum Entzündungsherd. Zahlreiche Lockstoffe, sogenannte „Chemokine“, die sich im Entzündungsgebiet anreichern, sind neben löslichen Gradienten treibende Kraft für die Migration der Immunzellen [118-120]. Gibt ein substratgebundener Signalstoff die Bewegungsrichtung vor, wird das Fortbewegungsmuster der Leukozyten entlang der Matrix als gerichtete Migration („*Haptotaxis*“) bezeichnet, wenn sie entlang eines Konzentrationsgradienten substratgebundener chemotaktischer Botenstoffe, die in bindegewebigen Strukturen immobilisiert vorliegen, durch das Interstitium migrieren. Fehlt dieses Konzentrationsgefälle, resultiert eine ungerichtete Migration („*Haptokinese*“) [118]. Sind dagegen lösliche, frei diffundierende Chemokine an der Leukozytenmigration beteiligt, kommt es zur gerichteten Migration („*Chemotaxis*“), wenn sich ein Konzentrationsgradient der gelösten Signalstoffe ausbildet. Stellt sich dagegen zwischen diversen Lockstoffen ein Gleichgewicht ein, resultiert eine ungerichtete, willkürliche Migration („*Chemokinese*“) [118, 121].

Während des Vorgangs der interstitiellen Migration verfügen Leukozyten über drei unterschiedliche Bewegungsmuster, zwischen denen in Abhängigkeit der pro- und antimigratorischen Signalstoffe auch Zwischenstufen angenommen werden können:

Immunzellen, die frei durch das Gewebe wandern, weisen sehr hohe Geschwindigkeiten auf (3-30 µm/min.), wobei weder Integrine auf der Zelloberfläche aktiviert noch Wechselbeziehungen zu anderen Zellen hergestellt werden. Diese schnellen Bewegungen sind lediglich auf Formveränderungen der Leukozyten zurückzuführen [118].

Treffen Leukozyten jedoch auf andere Zellen, bremsen sie ihre Geschwindigkeit ab (1-3 $\mu\text{m}/\text{min}$). Nehmen sie überdies mittels Integrinen festen Kontakt zu den anderen Zellen auf, ist nahezu keine Bewegung mehr zu verzeichnen (< 1 $\mu\text{m}/\text{min}$).

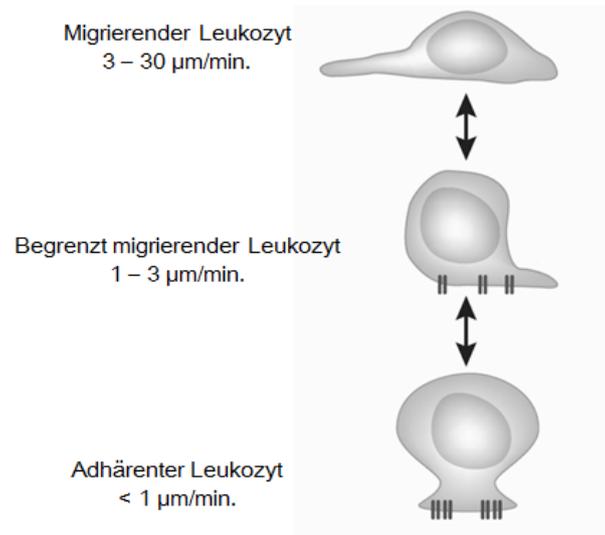


Abbildung 7: Unterschiedliche Bewegungsmuster von Leukozyten bei der interstitiellen Migration, modifiziert nach [118]. Leukozyten bewegen sich mit hohen Geschwindigkeiten frei durch das Interstitium, sind aber in der Lage, ihre zunächst hohen Geschwindigkeiten bis zum völligen Erlöschen abzubremsen, wenn sie sich einer anderen Zelle nähern oder Kontakt zu ihr aufnehmen.

2.3.2 DIE PATHOGENETISCHE ROLLE DER LEUKOZYTEN IM INFLAMMATORISCHEN PROZESS DER ATHEROGENESE

Für die Initiation der Atherosklerose ist insbesondere die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten, überwiegend von zirkulierenden Monozyten und T-Lymphozyten, von entscheidender Bedeutung [14, 18, 122, 123]. Nach Schädigung des Gefäßendothels durch den Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren, insbesondere durch eine hohe Serum-LDL-Konzentration, aber auch durch hämodynamische Veränderungen, Immunkomplexe, vasoaktive Amine und weitere begünstigende Faktoren [124-126], kommt es zu einem Ungleichgewicht von Proliferation und Antiproliferation, Pro- und Antithrombogenität des Endothels sowie Gefäßkontraktion und – relaxation [127]. Im Rahmen der

Endothelverletzung und als Antwort auf die subintimalen Lipideinlagerungen werden vermehrt spezifische vaskuläre Adhäsionsmoleküle, u.a. P-Selektin oder auch vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (VCAM), freigesetzt, welche den temporären Kontakt zwischen Endothelzelle und Immunzelle vermitteln, und vor allem in der frühen Phase der Atherogenese die Leukodiapedese, und letztlich die Adhäsion von Leukozyten, insbesondere von Monozyten und T-Lymphozyten, an das geschädigte Endothel ermöglichen [128-130]. In der Folge wandern vermehrt Leukozyten unter Einfluss des Monocyte Chemoattractant Protein – 1 (MCP-1) in die Arterienwand ein [131], führen zu einer Freisetzung entzündungsfördernder Chemokine und Zytokine, und lösen somit eine Entzündungsreaktion aus [14, 15, 18]. Sind Monozyten oder auch Makrophagen in der Intima lokalisiert, differenzieren sich diese durch Ingestion von Cholesterin, insbesondere in Form oxidiertes LDL-Partikel (ox-LDL), durch an ihrer Zelloberfläche befindliche Moleküle, sogenannte „Scavenger-Rezeptoren“ [132] zu sogenannten Schaumzellen („foam cells“), und bilden gemeinsam mit T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen die sogenannten Fettstreifen („fatty streaks“) [14, 24]. Leukozyten, oder vielmehr Schaumzellen, bilden das histopathologische Korrelat der frühen atherosklerotischen Läsion, und stellen somit bereits ein wichtiges Merkmal der frühen Atherogenese dar. Aber auch in allen weiteren Stadien der Atheroprogression tragen Leukozyten zur Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses bei [14, 133]. Während die Präsenz von Entzündungs- und Schaumzellen innerhalb der Intima zunächst noch ein reversibles Stadium in der Atherogenese ohne relevante klinische Folgen darstellt, kann es jedoch im weiteren Verlauf zu einem Voranschreiten der atherosklerotischen Plaque kommen. Die zunächst stabile Plaque setzt sich aus einer Deckplatte („fibrous cap“) bestehend aus fibrösem Bindegewebe, extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen und einem lipid- und entzündungszellreichen Kern („necrotic core“) bestehend aus überwiegend Leukozyten, extrazellulären Lipiden, Cholesterinkristallen und Zelltrümmern zusammen [14, 24, 27, 28]. Durch das progrediente Wachstum der fibrösen Kappe kommt es zu einer Ausweitung der Gefäßwand, zu einer Abnahme der Elastizität und konsekutiv zu einer Lumeneinengung [134]. In der Folge, bedingt durch die zunehmende Instabilität, bildet sich eine fortgeschrittene, komplizierte, instabile, „vulnerable“ und ruptur-gefährdete Plaque aus, welche durch einen großen Lipidkern, eine

dünne Deckplatte und eine Vielzahl inflammatorischer Zellen gekennzeichnet ist [14, 27]. In der von einer Plaqueruptur gefährdeten atherosklerotischen Läsion wird der Aktivität der beteiligten Immunzellen eine große Bedeutung beigemessen: an besonders ruptur-gefährdeten Stellen einer Plaque, den sogenannten Schulterregionen an den Rändern der fibrösen Kappe, finden sich zahlreiche Entzündungszellen, u.a. Makrophagen, T-Lymphozyten und auch Mastzellen [135-137]. Kommt es zu einer Plaqueruptur, tritt der Atherominhalt bestehend aus Teilen von Gefäßwand, subendothelialer Matrix, Lipiden, und Leukozyten u.a. in Kontakt mit den unter der Faserkappe liegenden stark prokoagulatorischen Faktoren wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Gewebsthromboplastin im Blut, und führt neben der Aktivierung von Thrombozyten zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit folglich Thrombusformation und Ischämie [14, 15].

2.3.2.1 METHODEN DER *IN VIVO* – VISUALISIERUNG VON LEUKOZYTEN

Zur Untersuchung des Verhaltens von Leukozyten im inflammatorischen Prozess *in vivo* gibt es zwei unterschiedliche Methoden der *in vivo* – Visualisierung von Leukozyten. Es stehen einerseits das Ohrmodell nach Roediger et al. [138] und Ng et al. [139] und andererseits das Cremastermodell modifiziert nach Baez [140, 141] zur Verfügung. Beiden Methoden gemeinsam ist die Visualisierung der Mikrozirkulation im Setting einer induzierten Entzündung.

Roedinger et al. [138] und Ng et al. [139] entwickelten ein Laser-Verletzungsmodell, um das genaue Verhaltensmuster von Leukozyten, insbesondere von dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten, in der Haut der Maus (Ohrmuschelrückseite) *in vivo* zur Darstellung zu bringen. Für die Induktion der Verletzung kam ein Laserstrahl zur Anwendung, welcher mit einer hohen Energie für zwei bis fünf Sekunden auf einen ausgewählten Gewebebereich gerichtet wurde. Ein durch diesen induzierten Hitzeschaden herbeigeführter Hautdefekt (Verbrennung) mit Nekrose war die Folge, und somit eine „sterile“ Inflammation initiiert [138, 139].

Khandoga et al. [141] etablierten dagegen ein auf einer anderen Methode basiertes Tiermodell, um das Verhalten von Leukozyten im Entzündungsgeschehen *in vivo* sichtbar machen und anschließend

quantitativ analysieren zu können. Durch gezielte intraskrotale Mikroinjektion chemotaktischer Stoffe konnte im Musculus cremaster eine Entzündung ausgelöst, und im Anschluss daran das Leukozyten-Verhaltensmuster beobachtet werden [141].

2.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Progranulin beziehungsweise seine proteolytischen Spaltprodukte in physiologischen und körpereigenen Prozessen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose eine funktionale Rolle spielen [68, 69, 76, 79, 89, 142-146]. Darüber hinaus konnte auch eine Bedeutung von Progranulin und seinen Granulinen im Rahmen entzündlicher Prozesse, wie Wundheilung [67, 76, 79, 147, 148] und steriler Arthritis [95, 149] identifiziert werden. Nachdem Progranulin bereits in anderen wissenschaftlichen Arbeiten [93, 94, 150] ein vermeintlicher Stellenwert in der Atherogenese zugesprochen wurde, sollte nun in der vorliegenden Promotionsarbeit geprüft werden, inwiefern Progranulin die Atherosklerose, ein chronisch-rezidivierendes und chronisch-progredientes inflammatorisches Geschehen der Gefäße [3, 6, 9], das durch die Koexistenz von Entzündung, Verletzung und Wundheilung maßgeblich bestimmt ist, beeinflusst. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die funktionale Rolle von Progranulin in der Regulation von Leukozytenadhäsion und -migration *in vivo* sowie auf die Identifikation relevanter leukozytärer Quellen des Progranulins gelegt, um daraus möglicherweise Rückschlüsse auf den menschlichen Organismus ziehen und gegebenenfalls neue primärpräventive Maßnahmen abzuleiten zu können. Zur Adressierung dieser speziellen Fragestellung kommen zwei unterschiedliche Methoden zur Demonstration der verschiedenartigen hämodynamischen Begebenheiten in Makro- und Mikrozirkulation zum Einsatz: unter Verwendung der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie (kurz: IVM) lässt sich die Beteiligung von Leukozyten, nämlich ihre feste Adhäsion an das dysfunktionale Gefäßendothel in der Arteria carotis communis, einem der Hauptmanifestationsorte für atherosklerotische Gefäßwandveränderungen [20, 49, 151], in einem Doppelknockout-Mausmodell PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} und entsprechenden Kontrolltieren PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} mit gesteigerter Atherosklerosedisposition sowie bei Knochenmarkchimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} und PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} analysieren. Mittels „Reflected-Light oblique Transillumination“-Intravitalmikroskopie (kurz: RLOT) können in Bereichen der Mikrozirkulation am Musculus cremaster in PGRN-defizienten Versuchstieren und jeweiligen Kontrollen nach Induktion einer sterilen Inflammation durch vorhergehende Injektion von TNF- α Wechselbeziehungen zwischen Leukozyten, wichtigen Mediatoren in der

Entzündungsreaktion, und Endothelzellen beobachtet und folglich die Einflussnahme von Progranulin auf diese zellulären Interaktionen erfasst werden. Um eine Aussage über den Ausprägungsgrad der atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen treffen und einen Proteinnachweis in den Läsionen zur Identifikation maßgeblicher zellulärer Quellen von Progranulin erbringen zu können, werden darüber hinaus verschiedene histologische Verfahren an Carotiden und Aortenbögen angewendet.

Im Einzelnen sollen folgende wissenschaftliche Fragestellungen abgehandelt werden:

- Welchen Einfluss hat Progranulin auf die dynamische Leukozyten-Endothel-Interaktion im makrozirkulatorischen Setting im Rahmen der Atherosklerose?

- Welchen Einfluss hat Progranulin auf die dynamische Leukozyten-Endothel-Interaktion im mikrozirkulatorischen Setting im Rahmen der sterilen Entzündung?

- Welchen Einfluss hat Progranulin auf den Ausprägungsgrad atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen und welche Zellen sind maßgebliche Quelle des Progranulins in der atherosklerotischen Plaque?

Part 3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERSUCHSTIERE/ZUCHT

Ziel der Arbeit ist es, anhand verschiedener Tiermodelle die funktionelle Rolle von Progranulin und seiner Spaltprodukte, der Granuline, in der Atheroprogression zu untersuchen.

Für diese Promotionsarbeit wird ein Mausmodell verwendet, welches sich durch schnelle Generationszeiten, unproblematische Aufzucht, sowie leichte und kosteneffiziente Tierhaltung als geeignet erweist [152]. Ferner erscheint die Maus als Versuchstier durch ihre geringe Körpergröße besonders prädestiniert für intravitalmikroskopische Untersuchungen. Für besondere Fragestellung liegen transgene Mäusestämme vor, die es ermöglichen, diverse Pathomechanismen auf molekularer Ebene näher zu untersuchen.

Für die diversen Versuche finden folgende Mäusestämme Verwendung:

- PGRN^{+/+} vs. PGRN^{-/-}
- PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}
- Knochenmarkchimären (PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-})

Auf die einzelnen Mausmodelle wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen:

3.1.1 WILDSTYP/KONTROLLSTAMM

Sogenannte Wildtyp-Tiere (PGRN^{+/+}, PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}), welche auf einem C57Bl6/J-Hintergrund (Fa. Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) basieren, dienen als Kontrolle für die transgenen Mausstämme (PGRN^{-/-}, PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}), die auf diesem Hintergrund erzeugt wurden. Alle Versuchsergebnisse werden den von den Kontrollstämmen ermittelten Ergebnissen gegenübergestellt.

3.1.2 TRANSGENE TIERE

Transgene Mäuse sind ein ideales Modellsystem, um die Regulation und Funktion bestimmter Proteine und das Verhalten von einzelnen Zellen näher zu untersuchen. Durch Gen-Knockout können gezielt bestimmte Proteine ausgeschaltet werden; eine Gegenüberstellung der Ergebnisse mit denen der Kontroll- bzw. Wildtypstämmen lässt eine Aussage über die funktionelle Rolle eines Genproduktes in komplexen Mechanismen, wie zum Beispiel der Leukozytenadhäsion bzw. -migration, zu.

3.1.2.1 APOE^{-/-}

Für die Eigenzucht werden ApoE-defiziente Elternpaare (Fa. Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) kommerziell erworben. Ab einem Alter von 8-10 Wochen ist eine Zucht möglich. Dazu wird ein Zuchtbock mit jeweils 2 Zuchtweibchen verpaart, und nach sichtbarer Trächtigkeit der Zuchtbock aus dem gemeinsamen Käfig entfernt. Jungtiere werden mit 4 Wochen vom Muttertier getrennt und mit cholesterinreicher Diät angefüttert.

3.1.2.2 PGRN^{-/-}

Für die Eigenzucht werden Progranulin-defiziente Elternpaare (Dr. Nishihara and colleagues, Riken BioResource Center, Tsukuba, Japan) kommerziell erworben. Ab einem Alter von 8-10 Wochen ist auch bei dieser Mauslinie eine Zucht möglich. Dazu wird ein auf dem Genlocus für Progranulin heterozygoter Zuchtbock mit jeweils 2 heterozygoten Zuchtweibchen verpaart. Jungtiere werden mit 4 Wochen abgesetzt.

3.1.2.3 PGRN^{-/-}APOE^{-/-}

Für die Einkreuzung werden zwei PGRN^{-/-}-C57Bl6/J - Zuchtweibchen mit zwei ApoE^{-/-}-C57Bl6 - Zuchtböcken verpaart. Unter Berücksichtigung der 1. Mendel'schen Regel weisen die Nachkommen (F1-Generation) aus dieser ersten Verpaarung sowohl auf dem Genlocus für PGRN als auch auf dem Genlocus für ApoE Heterozygotie auf. Eine erneute Kreuzung der F1-Nachkommen zieht eine

Aufspaltung des Genotyps mit dem Verhältnis 1: 2: 1 nach sich; man erhält die ersten zweifach defizienten Nachkommen $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ (Doppel-Knockout).

3.1.3 KNOCHENMARKCHIMÄREN

Nach zweimaliger, subletaler Bestrahlung der Versuchstiere mit jeweils 6,5 Gray (Gy) und anschließender Injektion aus Spendermäusen isolierter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in die Schwanzvene (Verweis auf Kapitel 3.1.3.2 und 3.1.3.3) weisen die Empfängermäuse einen Knochenmarkchimärismus auf. Gewebeständige Zellen tragen den Genotyp der Empfängermäuse, Zellen hämatopoetischen Ursprungs tragen die genetische Information der Spendertiere.

3.1.3.1 PRÄPARATION DES KNOCHENMARKS

Ausgewachsene $PGRN^{+/+}$ - oder $PGRN^{-/-}$ - Mäuse im Alter von 8-12 Wochen werden durch Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Forene® 100%, Abott GmbH, Wiesbaden) anästhesiert und durch zervikale Dislokation („Genickbruch“) getötet. Im Anschluss wird nach Desinfektion mit 70-%igem Ethanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) zunächst die Haut an den Mäusefüßen mit einem sterilen Skalpell (pfm Medical AG, Köln) eingeschnitten und abgezogen. Daraufhin werden die Vorder- und Hinterbeine nach Möglichkeit nahe der *Articulatio humeri* bzw. *Articulatio coxae* mit einer Schere abgetrennt, so dass die Oberarm- (Humerus) bzw. Oberschenkel- (Femur) Knochen unversehrt bleiben. In einem nächsten Schritt werden sowohl Oberarm- (Humerus) als auch Oberschenkel- (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) sorgfältig mit Hilfe eines sterilen Skalpells von umgebender Muskulatur befreit, wobei darauf zu achten ist, dass die Knochen intakt bleiben, um Kontaminationen vorzubeugen. Nach der Freipräparation werden die Knochen in eine mit Knochenmarkpuffer (PBS, 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 2% FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen, Carlsbad, USA)) gefüllte Petrischale überführt. Die nun folgende Präparation der Knochenmarkszellen wird unter einer Sterilbank (Typ HS12, Heraeus, Hanau) durchgeführt.

Unter Zuhilfenahme eines sterilen Skalpells werden die Knochen an beiden Epiphysen eröffnet. Anschließend wird das Knochenmark mit einer 5 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) mit aufgesteckter Kanüle (26G, BD Microlance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) aus den Knochen auf einem 70 µm-Zellsieb (Cell Strainer, 70 µm Nylon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) in einem 50 ml Gefäß (50 ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) gespült, bis die Spülflüssigkeit makroskopisch einen klaren Aspekt aufweist. Das so gewonnene Knochenmark wird dann mit Hilfe eines Spritzenstempels durch das Zellsieb gepresst und mit Knochenmarkpuffer gespült. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 4°C, 612 x g zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Hereaus Instruments, Hanau) und im Anschluss daran der Überstand mittels einer Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim) vorsichtig abgesaugt. Das verbliebene Zellpellet wird in 1 ml Ammoniumchlorid (NH₄Cl) resuspendiert und 5 Minuten bei 4°C zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Die Zellsuspension wird dann auf ein Volumen von 20 ml mit dem Knochenmarkpuffer aufgefüllt und erneut für 5 Minuten bei 4°C, 800 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt enthält das Zellpellet hauptsächlich polymorphonukleäre Leukozyten sowie hämatopoetische Vorläuferzellen. Der Überstand wird wieder mittels Vakuumpumpe abgesaugt, und das verbliebene Zellpellet in 1-2 ml Knochenmarkpuffer resuspendiert.

Die Zellzahl wird letztlich mittels einer Neubauer-Zählkammer (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe) bestimmt. Die Zellsuspension kann bis zur Transplantation bei 4°C für maximal 3 Stunden gelagert werden. Für die folgende Knochenmarkstransplantation stehen pro Empfängertier zwischen 5-10 x 10⁶ Knochenmarkszellen in 300 µl RPMI Zellkulturmedium (Gibco® RPMI Media, Life Technologies GmbH, Darmstadt) zur Schwanzveneninjektion zur Verfügung. Zu diesem Zweck wird zunächst die Zellsuspension zentrifugiert, und in entsprechendem Volumen in vorgewärmtem RPMI (37°C) resuspendiert.

3.1.3.2 KNOCHENMARKSDEPLETION DURCH GANZKÖRPERBESTRAHLUNG

Die 8 Wochen alten ApoE^{-/-} - beziehungsweise PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Empfängertiere werden vor Knochenmarkstransplantation zweimal mit einer subletalen Dosis bestrahlt, um ihre vorhandenen Knochenmarkszellen zu depletieren. Die Mäuse werden in einem sterilen Becherglas in die Vorrichtung der Caesium-Bestrahlungsquelle gestellt, und mit 6,5 Gray (Gy) bestrahlt. Diese Ganzkörperbestrahlung wird im Abstand von 4-12 Stunden ein zweites Mal vorgenommen. Nach der zweiten Bestrahlung wird dem Empfängertier das Knochenmark der Spendermaus über Schwanzveneninjektion appliziert.

3.1.3.3 KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION

Die Knochenmarkstransplantation der 8 Wochen alten Empfängertiere erfolgt unmittelbar nach der Knochenmarksdepletion durch subletale Ganzkörperbestrahlung. Dazu werden den Rezipienten zwischen $5-10 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von etwa 0,3 ml durch „Tail-vein-Injektion“ in die Schwanzvene verabreicht. Dazu wird das Tier unter Zuhilfenahme einer Fixationsvorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Fohr Medical Instruments GmbH) fixiert, wobei der Schwanz jederzeit frei zugänglich bleibt. Das Blut wird nun proximal an der Schwanzbasis gestaut, indem man auf den Mäuseschwanz einen Druck zwischen Zeige- und Mittelfinger ausübt. Mit Hilfe von warmem Wasser lässt sich zusätzlich eine Gefäßdilatation hervorrufen. Vor dem Einstich wird der Schwanz mit OctenidermR (Schulke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert. Zur Injektion eignen sich insbesondere die zwei lateral gelegenen Venen. Die Zellsuspension wird schließlich durch eine 30G-Kanüle (BD Microlance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) intravenös verabreicht.

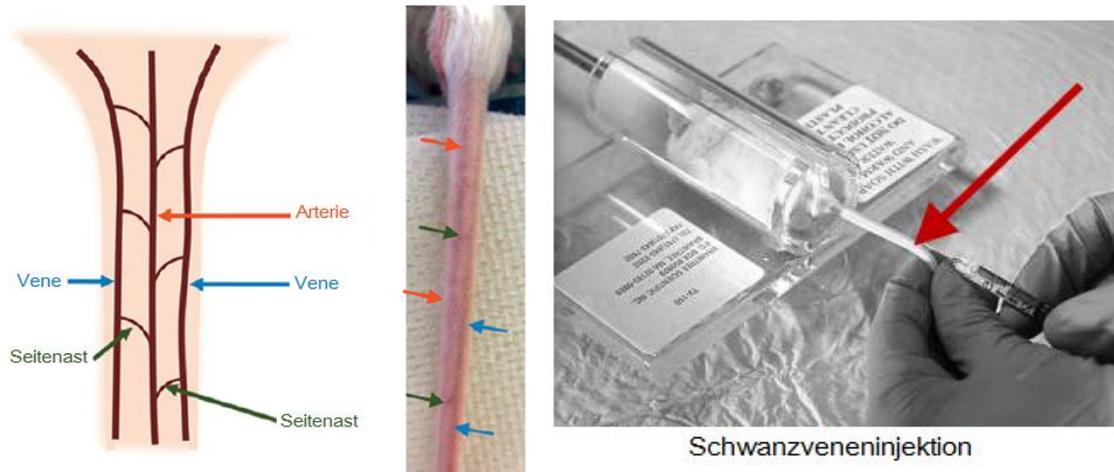


Abbildung 8: Links: Schematische Gefäßdarstellung der Schwanzvenen bei der Maus: rote Pfeile: Arterie; blaue Pfeile: Vene; grüne Pfeile: Seitenäste, modifiziert nach [153]. Rechts: Methodische Durchführung der Schwanzveneninjektion, modifiziert nach [154].

3.1.4 GENETISCHE IDENTIFIKATION DER TRANSGENEN TIERSTÄMME DURCH PCR UND GELELEKTROPHORESE

Bei den verwendeten Mauslinien der $ApoE^{-/-}$, der $PGRN^{-/-}$ sowie der Kreuzung zu $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ beziehungsweise zu $PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}$ Versuchstieren ist eine Genotypisierung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und anschließender Gelelektrophorese zur genetischen Identifikation des transgenen bzw. Wildtyp-Genlocus notwendig.

In der $ApoE^{-/-}$ -Zucht werden homozygote Tiere miteinander verpaart; eine Abweichung des Genotyps ist aus diesem Grund nicht anzunehmen. Ungeachtet dessen wird etwa alle zwei Monate eine stichprobenartige Kontrolle des Genotyps vorgenommen, um festzustellen, ob es ungewollt zu einer Abweichung der ursprünglichen Genidentifikation gekommen ist.

Bei der Progranulin-Zuchtlinie muss jedoch bei jeder einzelnen Maus der $PGRN$ -Locus untersucht werden. Hierbei werden heterozygote Tiere miteinander gepaart, so dass nach der Mendel'schen

Spaltungsregel die Nachkommen heterozygoter Elternpaare in 50% der Fälle ebenfalls Heterozygotie aufweisen.

Bei der Zuchtlinie der PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} beziehungsweise der PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Maus kann für den ApoE-Locus wie bereits oben beschrieben vorgegangen werden. Der PGRN-Locus muss allerdings aus obig genanntem Grund obligatorisch bei jedem Versuchstier ermittelt werden.

3.1.4.1 GEWINNUNG DER GEWEBEPROBE

Unabdingbare Voraussetzung für jede Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten Tierstämme stellt die Gewinnung einer Gewebeprobe dar. Hierzu wird das bei der Ohrlochung [155] zur dauerhaften Markierung des Einzelindividuums anfallende Gewebe mit einem ungefähren Durchmesser von 1-2 mm verwendet.

3.1.4.2 DNA-ISOLATION

Für die Isolation der genomischen DNA aus den Gewebeproben wird ein kommerziell erworbenes Isolationskit (blackPREP Rodent Tail DNA Kit, Analytik Jena, Jena) angewendet. Das genaue Vorgehen richtet sich dabei nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wird die Konzentration der isolierten DNA bestimmt, und die gewonnene DNA einerseits zur Amplifizierung (Polymerase-Kettenreaktion (PCR)) verwendet, andererseits für etwaige Kontrollen bei -20°C gelagert.

3.1.4.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON GELÖSTEN NUKLEINSÄUREN

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgt am NanoDrop (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc. über PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland). Die DNA-Proben werden photometrisch bei 260 nm und 280 nm vermessen. Eine optische Dichte von OD₂₆₀ = 1,0 entspricht in der Regel einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Das Verhältnis OD₂₆₀ / OD₂₈₀, welches Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure gibt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.1.4.4 AMPLIFIZIERUNG DER ZU BESTIMMENDEN GENSEQUENZEN

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR) werden die zu untersuchenden Gensequenzen (Progranulin- und ApoE-Fragmente) amplifiziert. Sowohl Progranulin- als auch ApoE-Knockout-Tiere besitzen an Position des ausgeschnittenen Gens ein Neo-Gen. Um den erfolgreichen Gen-Knockout kontrollieren zu können, werden Primersequenzen innerhalb und außerhalb des Neo-Gen-Abschnittes entworfen. Als Template wird 50 ng DNA eingesetzt; die Zyklenzahl und Annealing-Temperaturen werden an die verwendeten Primer angepasst und optimiert.

Die unten stehenden Tabellen liefern Angaben zur genauen Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze sowie der dabei verwendeten Primer. Außerdem findet sich eine Auflistung der gewählten PCR-Bedingungen.

Pro PCR werden Reaktionsgefäße mit 25 µl angesetzt.

Reaktionsansatz für die Amplifizierung des ApoE-Gens		
Substanzen	Menge	Hersteller
10xPCR Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	2,5µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Taq-Polymerase (1U)	0,3µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP-Mix (10mM)	0,5µl (200µM)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Primer oIMR180	0,75µl (0,3µM)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer oIMR181	1,25µl (0,3µM)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer oIMR182	1,25µl (0,3µM)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Template DNA (ca. 100ng)	2µl	
Aqua bidest	Ad 25µl	

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung des ApoE-Gens.

Die PCR-Produkte (Größe der Produkte: ApoE wt = 155 bp, ApoE ko = 245 bp) werden anschließend in einem 2,5%-igen Agarosegel aufgetrennt.

Reaktionsansatz für die Amplifizierung des PGRN-Gens		
Substanzen	Menge	Hersteller
10xPCR Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	2,5µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,3µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP-Mix (10mM)	0,5µl (200µM)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Primer PGRN F	je1,25µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Primer PGRN R	je1,25µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Primer Neo 30	je1,25µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Template DNA (ca.100ng)	2 µl	
Aqua bidest	Ad 25 µl	

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung des PGRN-Gens.

Die PCR-Produkte (Größe der Produkte: PGRN wt = 960 bp, PGRN ko = 650 bp) werden anschließend in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt.

Primer der PCR-Ansätze (ApoE-Locus)		
Primer für den ApoE-Locus		Primer-Sequenzen
PR59	oIMR180	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG
PR61	oIMR181	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC
PR60	oIMR182	GCCGCCCGACTGCATCT

Tabelle 4: Übersicht über die Primer der PCR-Ansätze (ApoE-Locus).

Primer der PCR-Ansätze (PGRN-Locus)	
Primer für den PGRN-Locus	Primer-Sequenzen
PGRN F	CATGTGACTGATGACTGTCC
PGRN R	GAGCAAGACGCTTTTGCTTG
Neo 30	TTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA

Tabelle 5: Übersicht über die Primer der PCR-Ansätze (PGRN-Locus).

Übersicht über die PCR-Bedingungen für 35 Zyklen		
	Bedingungen für ApoE-PCR	Bedingungen für PGRN-PCR
Initiale Denaturierung	4' bei 95°C	3' bei 94°C
Denaturierung	0,75' bei 95°C	0,5' bei 94°C
Primerbindung	0,75' bei 62°C	0,5' bei 60°C
Elongation	0,75' bei 72°C	1' bei 72°C
Termination	7' bei 72°C bei 4°C bis Entnahme der Proben	7' bei 72°C bei 4°C bis Entnahme der Proben

Tabelle 6: Übersicht über die PCR-Bedingungen für 35 Zyklen.

3.1.4.5 AUFTRENNUNG DER BANDEN / GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der DNA-Banden nach ihrem Molekulargewicht geschieht auf frisch hergestelltem 1,5%- bzw. 2,5%igem Agarosegel. Zu diesem Zweck wird eine 1,5%- bzw. 2,5%-ige Agaroselösung in TBE-Puffer (1x) (Stocklösung TBE Buffer 5x Molecular Biology grade, AppliChem GmbH, Darmstadt) angesetzt, diese mit 1,7 µl Ethidiumbromid / 35 µl Agaroselösung versetzt, und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgekocht (2-3 min.). Das so hergestellte Gel wird anschließend als Gelträger in eine abgedichtete Horizontalkammer der Gelelektrophorese-Zelle mit eingesetztem Kamm gegossen.

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dient der DNA-Längenstandard Gene Ruler 100 bp (Thermo Scientific, Rockford, USA), welcher ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird. Für die Gelelektrophorese empfiehlt sich ein Gel-Lauf von 45 Minuten bei einer definierten elektrischen Spannung von 100 Volt.

Nach der Elektrophorese wird das Gel unter UV-Licht analysiert.

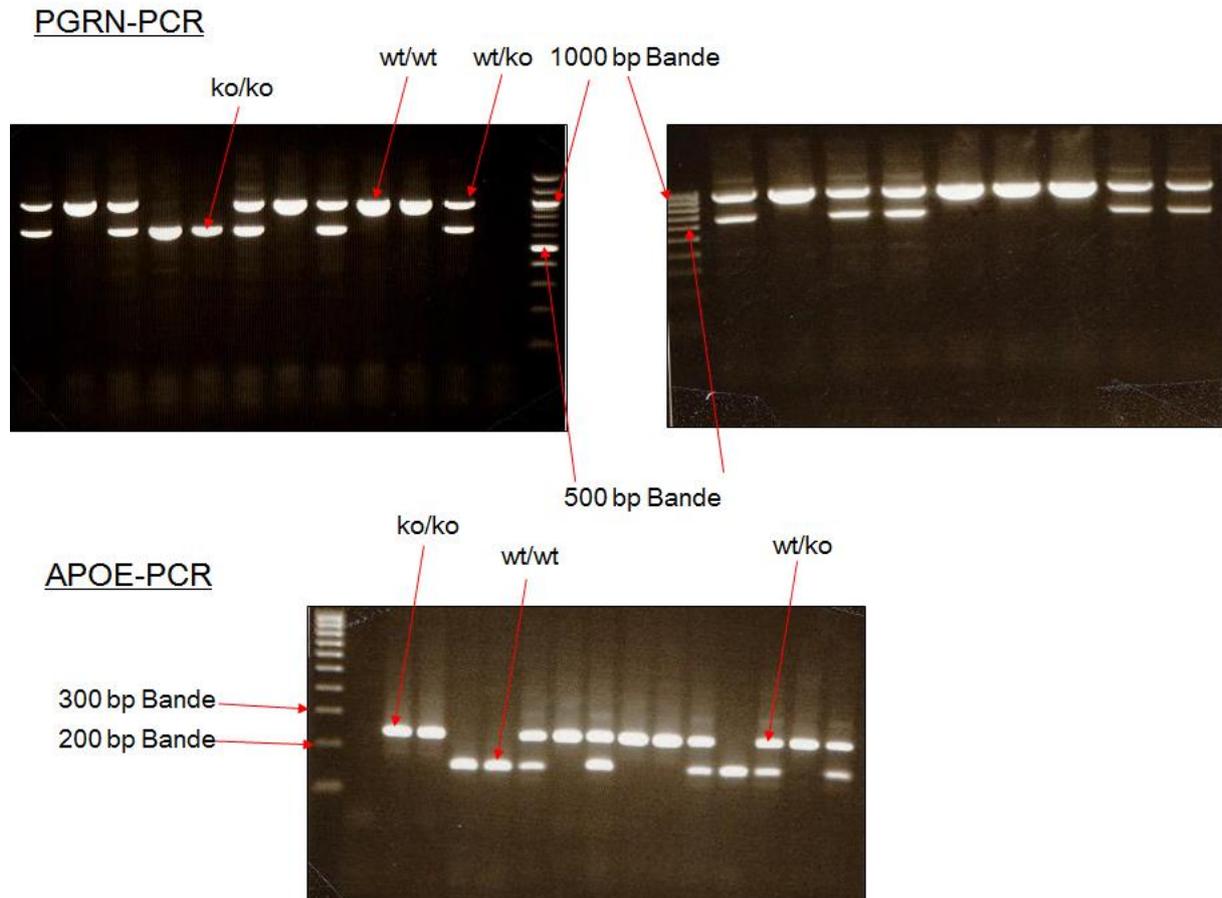


Abbildung 9: Bandmuster bei der Genotypisierung von Progranulin-Tierstamm (oben) vs. ApoE-Tierstamm (unten).

3.1.4.6 DOKUMENTATION

Zur Dokumentation werden nach Abschluss der Gelelektrophorese die Gele abfotografiert, die Ergebnisse in Zuchtlisten eingetragen, und die Gelbilder zum späteren Nachweis in einem Ordner abgeheftet.

3.2 TIERHALTUNG

Bei der Tierhaltung der Experimentellen Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik der LMU, Klinikum der Universität München, handelt es sich um einen SPF („specific pathogen free“) - Bereich.

Die Tiere werden alle getrennt nach Stämmen in gleichgeschlechtlichen Gruppen von maximal sechs Tieren in durchsichtigen, leicht zu reinigenden und sterilisierbaren Käfigen (IVCs = Individually Ventilated Cages) vom Typ III (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten, die einzeln belüftbar sind und somit einen ausreichenden Luftaustausch bei konstanter Raumtemperatur von 20-25°C und Luftfeuchtigkeit von 60-70% ermöglichen. Die Beleuchtung wird über eine Zeitschaltuhr geregelt und weist einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus auf. In der Hell-Phase werden zwischen 50 und 100 Lux erreicht. Die Käfige werden mit entkeimtem Labortiereinstreu (Abedd® - LAB&VET Service GmbH, Wien, Österreich) ausgelegt. Kleine autoklavierbare Maushäuschen aus rotem transparentem Plastik (Mouse House, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) dienen als Rückzugsmöglichkeit. Außerdem wird Zellstoff als Nestbaumaterial angeboten. Den Mäusen stehen frisches Wasser und nagegerechtes Haltungsfutter (Futtermittel für Zucht/Haltung von Ratte/Maus, ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) ad libitum zur Verfügung.

Alle Versuchstiere, die für das Arteria-carotis-Modell eingeplant werden, erhalten im Alter von vier Wochen über einen Zeitraum von zwölf Wochen eine cholesterinreiche Sonderdiät (AltrominSpezialfutter GmbH& Co. KG, Lage).

Die Zusammensetzung der Sonderdiät ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

13100017 131017 Altr. 1310 mod. as Purina 5015

Nr.	Inhaltsstoff	Einheit	Bedarf	Gehalt	Differenz
1	Rohprotein / Crude Protein	mg/kg		238491,322	
2	Rohfett / Crude Fat	mg/kg		119979,562	
3	Rohfaser / Crude Fibre	mg/kg		30360,041	
4	Rohasche / Crude Ash	mg/kg		69600,074	
5	Feuchtigkeit / Moisture	mg/kg		94882,744	
6	Monosaccharide(s)	mg/kg		28500,000	
7	Disaccharide(s)	mg/kg		58735,737	
8	Polysaccharide(s)	mg/kg		274396,321	
9	Umsetzb. Energie/Metab. Energy	kcal/kg		3717,994	
10	Lysin / Lysine	mg/kg		15835,390	
11	Methionin / Methionine	mg/kg		7069,090	
12	Cystin / Cystine	mg/kg		3575,590	
13	Threonin / Threonine	mg/kg		9145,985	
14	Tryptophan	mg/kg		3029,360	
15	Arginin / Arginine	mg/kg		15048,645	
16	Histidin / Histidine	mg/kg		6202,345	
17	Isoleucin / Isoleucine	mg/kg		10244,610	
18	Leucin / Leucine	mg/kg		18613,335	
19	Phenylalanin / Phenylalanine	mg/kg		10665,335	
20	Valin / Valine	mg/kg		9570,320	
21	Alanin / Alanine	mg/kg		8841,800	
22	Asparaginsäure / Aspartic acid	mg/kg		18132,270	
23	Glutaminsäure / Glutamic acid	mg/kg		42546,035	
24	Glycin / Glycine	mg/kg		8698,950	
25	Prolin / Proline	mg/kg		15498,090	
26	Serin / Serine	mg/kg		10684,950	
27	Tyrosin / Tyrosine	mg/kg		9270,105	
28	Vitamin A	I.E./kg		15000,000	
29	Vitamin D3	I.E./kg		550,000	
30	Vitamin E	mg/kg		152,445	
31	Vitamin K3 als/as Menadion(e)	mg/kg		6,500	
32	Vitamin B1	mg/kg		19,015	
33	Vitamin B2	mg/kg		16,121	
34	Vitamin B6	mg/kg		12,013	
35	Vitamin B12	mg/kg		0,031	
36	Nikotinsäure / Nicotinic acid	mg/kg		43,084	
37	Pantothenre./Pantothenic acid	mg/kg		35,540	
38	Folsäure / Folic acid	mg/kg		6,54040	
39	Biotin	mg/kg		0,432	
40	Cholinchlorid/Choline chloride	mg/kg		982,013	
42	P-Aminobenzoesre./Benzoic acid	mg/kg		50,000	
43	Inosit / Inositol	mg/kg		54,125	
44	Vitamin C	mg/kg		28,000	
45	Calcium	mg/kg		8337,805	
46	Ges.Phosphor / Phosphorus	mg/kg		7761,550	
47	Verd.Phosphor/Digest.Phosphorus	mg/kg		5461,677	
48	Magnesium	mg/kg		1764,868	
49	Natrium / Sodium	mg/kg		3244,036	
50	Kalium / Potassium	mg/kg		9629,446	
51	Schwefel / Sulfur	mg/kg		1848,162	

52	Chlor / Chlorine	mg/kg	5400,190
53	Eisen / Iron	mg/kg	179,155
54	Mangan / Manganese	mg/kg	72,901
55	Zink / Zinc	mg/kg	61,837
56	Kupfer / Copper	mg/kg	10,314
57	Jod / Iodine	mg/kg	0,919
58	Molybdän / Molybdenum	mg/kg	1,181
59	Fluor / Fluorine	mg/kg	7,768
60	Selen / Selenium	mg/kg	0,353
61	Kobalt / Cobalt	mg/kg	0,389
67	Palmitinsäure C-16:0	mg/kg	23174,100
68	Palmitoleinsäure C-16:1	mg/kg	92,400
70	Stearinsäure C-18:0	mg/kg	28021,200
71	Ölsäure C-18:1	mg/kg	33109,700
72	Linolsäure C-18:2	mg/kg	19002,150
73	Linolensäure C-18:3	mg/kg	2382,000
74	Arachinsäure C-20:0	mg/kg	148,000
75	Eicosaensäure C-20:1	mg/kg	299,400
77	Arachidonsäure C-20:4	mg/kg	400,400
78	Eicosapentaensäure C-20:5	mg/kg	178,200
99	Canthaxanthin	mg/kg	1,050
102	Cholesterin / Cholesterol	mg/kg	12375,000
106	B-Apo-8-Carotinsäure	mg/kg	1,400
111	Aluminium	mg/kg	72,695
155	Volumen / Volume	kg	1000,000

Tabelle 7: Inhaltsstoffe der cholesterinreichen Sonderdiät (Altromin 1310 mod. As Purina 5015, gemahlen), modifiziert nach Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

3.3.1 NARKOSEDURCHFÜHRUNG

Für Gewebeentnahmen zur Genotypisierung der Versuchstiere, für Blutentnahmen durch Punktion der V. facialis sowie für die intraskrotale Injektion von Tumornekrosefaktor-alpha (kurz: TNF- α) im Rahmen des Cremaster-Modells wird eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene® 100%, Abott GmbH, Wiesbaden) induziert.

Für alle weiteren operativen Eingriffe im Rahmen der verschiedenen Versuchsmodelle wird die Narkose zunächst auch durch Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches eingeleitet, und anschließend durch Injektion einer Kombinationsnarkose fortgeführt.

3.3.1.1 INHALATIONSNARKOSE

Die zu narkotisierende Maus wird zur Durchführung der Inhalationsnarkose in eine durchsichtige Kunststoffröhre gesetzt, und dieser ein dreiprozentiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch über einen Verdampfer (Völker GmbH, Kaltenkirchen) bis zum Erlöschen der Stellreflexe zugeführt. Isofluran zeichnet sich durch sein schnelles An- und Abfluten, seine hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung aus; es wirkt allerdings nur schwach analgetisch. Deshalb eignet es sich nur für kurze und wenig schmerzhaft Eingriffe. Nach einer reinen Isoflurannarkose beträgt die Aufwachphase aufgrund des raschen Abflutens meist nur wenige Minuten.

3.3.1.2 INJEKTIONSNARKOSE

Um den Kriterien einer Allgemeinanästhesie, nämlich Ausschaltung des Bewusstseins (Hypnose, Amnesie), der Schmerzempfindung (Analgesie) und der Muskeltätigkeit (Relaxation) gerecht zu werden, erfolgt die Durchführung der operativen Eingriffe unter Kombinationsnarkose. Hierzu wird zunächst wie oben beschrieben die Narkose durch Inhalation von Isofluran und Sauerstoff eingeleitet. Im Anschluss wird eine Kombinationsanästhesie aus 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5 mg, Janssen Cilag, Neuss), 0,5 mg/kg Medetomidin (Dorbene ® vet. 1 mg/ml, PFIZER Deutschland GmbH, Berlin, Germany), und 5,0 mg/kg Midazolam (Actavis 5 mg/ml, Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, Langenfeld) intraperitoneal verabreicht. Diese Kombinationsnarkose sichert die chirurgische Toleranz während des Versuchsablaufs. Bei Nachlassen der Narkosetiefe ist gegebenenfalls eine Nachinjektion möglich. Während der Versuche werden in regelmäßigen Abständen Puls- und Atemfrequenz, Atemtyp und das Fehlen des Zwischenzehenreflexes überprüft, um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten. Über eine Nasenmaske wird durch kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff eine suffiziente Oxygenierung des Tieres sichergestellt. Eine Wärmematte (ThermoLux®-

Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt) sorgt für die Aufrechterhaltung der Wärmehomöostase des narkotisierten Tieres.

Injektionsanästhetikum	Dosierung	Applikationsform
Fentanyl	0,05 mg/kg KG	intraperitoneal
Medetomidin	0,5 mg/kg KG	intraperitoneal
Midazolam	5,0 mg/kg KG	intraperitoneal

Tabelle 8: Übersicht über die Kombinationsanästhesie bei der Maus.

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums werden die Augen des Versuchstieres mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) versorgt, um ein Austrocknen der Hornhaut während der Narkose zu verhindern.

3.3.2 OPERATIVES VORGEHEN

3.3.2.1 A. CAROTIS-MAUSMODELL

Für die Durchführung des A.-carotis-Mausmodells wird zunächst die oben beschriebene Anästhesietechnik angewandt. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (Fehlen des Zwischenzehenreflexes) werden die Versuchstiere vor dem Versuch abfotografiert, um gegebenenfalls äußerliche Auffälligkeiten in den jeweiligen Versuchsgruppen, wie zum Beispiel entzündliche Hautveränderungen, Kratzspuren oder Haarverlust zu detektieren. Anschließend werden die Mäuse gewogen (Waage AE260-S, Mettler-Toledo, Gießen) und es wird Blut über die Vena facialis zur Bestimmung der systemischen Leukozytenanzahl entnommen. In einem nächsten Schritt wird das Operationsgebiet am ventralen Hals mittels elektrischem Haarschneider (Ermila, MAGNUM HANDY, Type 1556, Wahl GmbH, Unterkirnach) und Enthaarungscreme (Pilca E, DMV – Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG, Bad Pyrmont) vollständig von Haaren befreit, und die Haut mit Alkohol (Cutasept, Bode Chemie, Hamburg) entfettet und desinfiziert. Durch die Fixierung des Tieres

in Rückenlage mittels Klebeband (Transpore TM, 3M Health Care, Neuss) auf einer Wärmematte (ThermoLux®-Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt) wird dem unter einer Narkose auftretendem Wärmeverlust begegnet. Über eine Nasenmaske wird kontinuierlich Sauerstoff appliziert, um eine ausreichende Oxygenierung sicherzustellen. Bei Bedarf ist eine additive Gabe von Isofluran möglich. Zur Optimierung der Lagerung und Überstreckung des Halses wird eine 1 ml-Einmalspritze (Injekt®, 1 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) im Nacken positioniert.

Die anschließende Präparation des anästhesierten Tieres für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie wird unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischem Instrumentarium (micro2000, Medicon, Tuttlingen) unter einem Stereomikroskop (ZEISS Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Jena) vorgenommen. Für eine bestmögliche Ausleuchtung des Operationsfeldes sorgt eine Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Carl-Zeiss AG, Jena).

3.3.2.1.1 KATHETERISIERUNG DER VENA JUGULARIS

Fluoreszenzfarbstoffe zur Visualisierung von Zellen werden dem Empfängertier über einen venösen Zugang, vornehmlich über die Vena jugularis dextra, verabreicht. Dieser venöse Zugang besteht aus einer mit isotonischer Natriumchloridlösung (NaCl 0.9%, Diaco, Serag-Wiessner KG, Naila) gefüllten 2 ml-Einmalspritze (Injekt®, 2ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen), einem Drei-Wege-Hahn (Discofix C, B.Braun, Melsungen) und einem Polyethylenschlauch (Portex® Non Sterile, Polythene Tubing, 0.28mm ID, 0.61mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK). Dazu werden nach einem geraden medianen Hautschnitt in der ventralen Halsregion vom Kinnwinkel (Ramus mandibularis) bis zum Sternum die Speicheldrüsen (Glandulae submandibulares/sublinguales) stumpf getrennt und nach lateral ausgelagert, um eine optimale Sicht auf das Operationsfeld und eine erleichterte Identifikation der Vena jugularis dextra zu gewährleisten. Die zum Vorschein kommende Vene wird mit großer Sorgfalt von umgebendem Binde- und Fettgewebe sowie begleitendem Nerven separiert, und möglichst nah am Kinnwinkel mit einem („Halte“-)Faden (Prolene, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Durch leichten Zug an diesem Haltefaden wird das Gefäß gestreckt, und der Blutfluss reduziert.

Es werden in der Regel drei Fäden vorgelegt: am kaudalen Ende der Vena jugularis dextra wird eine doppelte Ligatur zur Fixation des Katheters in der Vene vorgelegt, und zwei weitere einfache Ligaturen kranial davon vorgenommen, um einerseits das durch die Inzision entstandene Loch zu verkleinern und andererseits den Blutfluss über Seitenäste zu verhindern. Nach einer kleinen Inzision der Jugularvene mittels Mikro-Federschere (Art.-Nr.: 05.12.30, Medicon, Germany) kann der zuvor vorbereitete Polyethylenkatheter in das Gefäß vorgeschoben und durch die vorgelegte doppelte Ligatur in Position gehalten werden; die kranialen Ligaturen werden ebenfalls zugezogen. Die korrekte Katheterlage wird durch Aspiration von venösem Blut und Spülung mit isotonischer Natriumchloridlösung verifiziert. Um ein akzidentielles Herausrutschen des korrekt positionierten venösen Katheters zu verhindern, wird dieser im Anschluss mittels Klebeband zusätzlich fixiert.

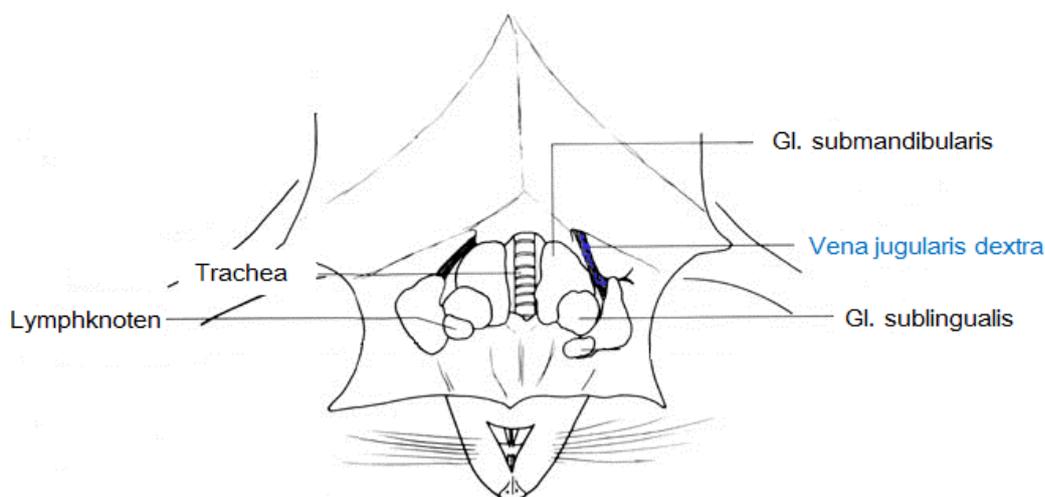


Abbildung 10: Schematische Darstellung der eröffneten ventralen Halsregion einer auf dem Rücken liegenden Maus mit nach lateral ausgelagerten Gl. submandibulares/sublinguales und Aufsicht auf die V. jugularis dextra, modifiziert nach [156].

3.3.2.1.2 CHIRURGISCHE PRÄPARATION DER ARTERIAE CAROTIDES

Um das Verhalten von Immunzellen, insbesondere das von Leukozyten, mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie (kurz: IVM) aufzeichnen zu können, werden im Anschluss an die Katheterisierung der Vena jugularis sorgsam die Arteria carotis dextra und die Arteria carotis sinistra

von Binde- und Fettgewebe sowie umgebendem Nerven ohne Traumatisierung der Arterien freipräpariert. Zur besseren Kontrastierung wird jeweils ein kleines schwarzes, dünnes und flexibles Stückchen Plastik-Filmfolie den freigelegten Arterien untergeschoben. Für die anschließenden Aufnahmen wird das Versuchstier auf der obig beschriebenen Wärmematte (ThermoLux®-Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt) nun unter einem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BX51WIF, Olympus, Tokyo, JP) positioniert.



Abbildung 11: Präparation der Arteriae carotides communes, modifiziert nach [157].

3.3.2.1.3 ÜBERSICHT ÜBER DEN VERSUCHSAUFBAU

Die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie wird jeweils an einer definierten Anzahl von Tieren der Versuchsgruppe $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ sowie der Kontrollgruppe $PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}$ im Alter von 16 Wochen nach zwölfwöchiger cholesterinreicher Diät und erneut jeweils an einer definierten Anzahl von Tieren der Chimären-Versuchsgruppe $PGRN^{-/-}$ in $ApoE^{-/-}$ sowie der Chimären-Kontrollgruppe $PGRN^{+/+}$ in $ApoE^{-/-}$ im Alter von 20 Wochen nach zunächst vierwöchiger Anfütterung mit cholesterinreicher Diät vor Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation und anschließend weiterer 12 Wochen cholesterinreicher Diät durchgeführt. Da bei der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie im Idealfall

pro Versuchstier zwei Carotiden aufgezeichnet werden können, ergeben sich bis zu „Anzahl (n) der Versuchstiere x 2“ zu untersuchende Carotiden.

Nach Induktion der Anästhesie, Fotodokumentation, Gewichtsbestimmung, Blutentnahme zur Bestimmung der systemischen Leukozytenanzahl und erfolgreicher Positionierung des venösen Zugangs in die Vena jugularis dextra sowie Freilegung der beiden Arteriae carotides communes wie oben beschrieben wird dem Versuchstier zunächst ein Fluoreszenzfarbstoff, Acridinorange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), in einem Verhältnis von 1:40 intravenös verabreicht. Im weiteren Verlauf wird das Verhalten der zu untersuchenden Immunzellen, nämlich die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand, unter dem Videofluoreszenzmikroskop näher beobachtet, und präzise in einem Versuchsprotokoll festgehalten.

Im Anschluss an den operativen Teil wird eine intrakardiale Herzpunktion zur Blutentnahme und Bestimmung der Lipidstoffwechselfparameter (Gesamt-Cholesterin in mg/dl, HDL-Cholesterin in mg/dl) vorgenommen, und danach das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet. Nach Sicherung des Todes werden gegebenenfalls Organe für weitere Untersuchungen entnommen.

3.3.2.1.4 VERSUCHSPROTOKOLL/DOKUMENTATION

Zu jedem Versuch wird ein Versuchsprotokoll mit folgenden Informationen angefertigt: Versuchsdatum, Tiernummer, Tierstamm, Geburtsdatum (Alter in Wochen), Geschlecht, Gewicht in Gramm, Genotyp, Gruppenzugehörigkeit, Elterntiere mit Tiernummern, Beginn der cholesterinreichen Diät, Fütterungswoche, Menge der benötigten Kombinationsanästhesie, eventuelle Komplikationen, Versuchsablauf, Videoaufzeichnungen mit genauer Bezeichnung und Speicherort, Organ- und Blutentnahmen.

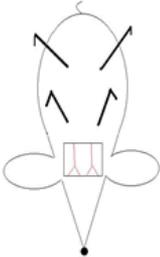
IVM - Versuchsprotokoll:			
Datum:			
Tier:			
Nummer:	Stamm:	Genotyp:	
Geburtsdatum:	Alter in Wochen:	Gruppe:	
Geschlecht:	Mutter:	Vater:	
Cholesterinreiches Futter ab:		Fütterungswoche:	Gewicht:
Narkose:			
MMF (à 35 µl Fentanyl):			
ausgetragen am :			
Versuchsablauf:			
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Katheterisierung der Vena jugularis □ rechts □ links 2. Präparation der Arteriae carotides communes bds. □ 3. Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes: Acridin-Orange 1:40 Zeitpunkt der 1. Gabe: Zeitpunkt weiterer Applikation: Gesamtmenge in ml: 4. Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM) 		
Videoaufzeichnung:			
A. carotis rechts/links:	Objektiv:	IVM-Bereich:	Dateiname: gespeichert in
rechts:		bifurkationsnah	
		bifurkationsfern	
links:			
Besonderheiten:			
Ergebnis:			

Abbildung 12: Übersicht Versuchsprotokoll A. carotis - Mausmodell.

3.3.2.1.5 INTRAVITALE VIDEOFLUORESZENZMIKROSKOPIE (IVM)

3.3.2.1.5.1 PRINZIPIEN DER IVM

Die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie erlaubt eine Echtzeitdarstellung zellulärer Vorgänge *in vivo*. Unter Zuhilfenahme von nicht-toxischen Fluoreszenzfarbstoffen können verschiedenartige Zellen und zelluläre Strukturen markiert und unter einem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop visualisiert werden. Diese Technik bietet also den Vorteil, das physiologische Verhalten von unterschiedlichen Zellen *in vivo* untersuchen und aufzeichnen zu können [158].

Die Fluoreszenzmikroskopie als Sonderform der Lichtmikroskopie beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz, bei dem bestimmte Moleküle, auch Fluorochrome bezeichnet, Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Durch die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge werden diese Moleküle angeregt; die Elektronen werden aus einem Zustand niedriger Energie (Grundzustand) in einen Zustand höherer Energie (angeregter Zustand) versetzt. Da sich die Moleküle aber nicht auf dem hohen Energieniveau halten können, fallen sie unmittelbar danach in ihren Grundzustand zurück. Bei dieser Rückkehr in den energieärmeren Zustand wird die zuvor aufgenommene Energie wieder frei und ein Teil des absorbierten Lichts in Form von längerwelliger Strahlung emittiert (Stokes Regel) [158].

Dieses Prinzip macht sich das Olympus Cell[^]R System bestehend aus einem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Olympus BX51WI, Olympus, Hamburg) mit 20x-Immersionsobjektiv (OLYMPUS, Hamburg) in Kombination mit einem komplexen Multifunktions-Beleuchtungssystem MT20 (Olympus, Hamburg) und einer Xenon-Lampe als Lichtquelle zunutze. Durch ein Emissionssignal, welches über eine CCD-Kamera (ORCA-ER, Digital Camera C4742 – 80 – 12AG, Hamamatsu Photonics, JP) an einen angeschlossenen Computer gesendet wird, können die zuvor fluoreszenzmarkierten Zellen oder zellulären Strukturen *in vivo* sichtbar gemacht werden.

Mit dem speziellen Computerprogramm Cell[^]R 2.8 (Imaging Software for Life Science Microscopy, Olympus, Hamburg) wird die gesamte Erfassung, Dokumentation, Bearbeitung und Auswertung der Videoaufzeichnungen vorgenommen.

3.3.2.1.5.2 DURCHFÜHRUNG DER IVM

Die Durchführung der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung des Leukozytenverhaltens erfolgt unmittelbar nach intravenöser Applikation von initial 0,05 ml (Verdünnung 1:40) des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Dazu werden sowohl für Arteria carotis communis dextra als auch für Arteria carotis communis sinistra nacheinander mit dem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop und einer 20-fachen Vergrößerung unter Flüssigkeitsimmersion mit angewärmter isotonischer Natriumchloridlösung verschiedene Bereiche nach einem feststehenden Protokoll (100 repeats, exposure time: 40 ms, cycle time 110 ms) aufgenommen. Pro Aufnahmezeitraum werden hierbei 100 Einzelaufnahmen (repeats) aufgezeichnet, die bei einer Belichtungszeit von in der Regel 40 ms einer Video-Gesamtlänge von ca. 10 Sekunden entsprechen. Es wird zunächst mit einem Aufnahmezeitraum herznah, also „bifurkationsfern“, begonnen, und sich sukzessive in kleinen Schritten nach kranial vorgearbeitet. Entsprechend wird dann herzfern, also „bifurkationsnah“, verfahren. Pro Bereich werden mindestens 3 Aufnahmen nach oben stehendem Protokoll aufgezeichnet.

3.3.2.1.5.2.1 FLUORESZENZFARBSTOFF – ACRIDINORANGE

Acridinorange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), auch unter Rhodulinorange bekannt [158], ist ein orangefarbener DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Durch seinen lipophilen Charakter ist er zur Permeabilisierung von Zellmembranen durch Diffusion befähigt, und reichert sich in Zellkernen an. In sauren Zellkompartimenten wie den Lysosomen, Endosomen oder auch im Golgi-Apparat wird eine Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes beobachtet [159]. Bei Anregung von Acridinorange mit Licht einer Wellenlänge von 490 nm emittiert der Fluoreszenzfarbstoff im grünen Bereich [160].

Für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie werden den Versuchstieren initial 0,05 ml Acridinorange in einer Verdünnung von 1:40 intravenös über den liegenden Venenzugang appliziert. Nachinjektionen sind, falls erforderlich, zu jedem Zeitpunkt möglich.

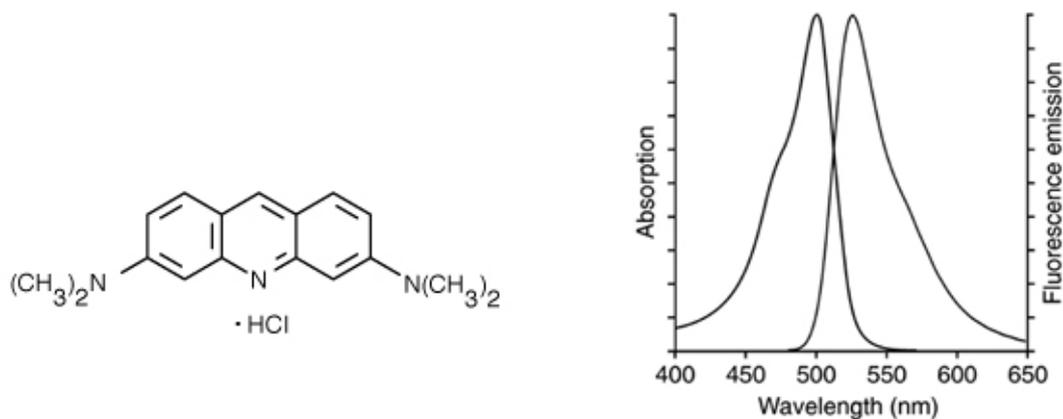


Abbildung 13: Strukturformel(C₁₇H₂₀ClN₃) und Absorptions-/Emissionsspektrum von Acridinorange, [160].

3.3.2.1.6 AUSWERTUNG DER VIDEOAUFZEICHNUNGEN

Die Auswertung der Videoaufnahmen erfolgt mit dem Computerprogramm Cell[^]R 2.8 von Olympus. Evaluiert werden jeweils drei Aufnahmen der herznahen, also „bifurkationsfernen“, Regionen sowie drei Aufnahmen der kranial gelegenen herzfernen, also „bifurkationsnahen“, Regionen der Arteria carotis communis. Dazu werden die intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen aufgerufen, der reelle Maßstab ermittelt, und jeweils vier 100x100 µm große Auswertungsfenster eingeblendet. Um eine Aussage über die Rekrutierung von Leukozyten in diesem Versuchsansatz zu erhalten, werden die adhärenen Zellen pro Auswertungsfenster ausgezählt. Als „adhärent“ wird in diesem Zusammenhang eine Zelle bezeichnet, die über die gesamte Aufnahmezeit ihre Lage beziehungsweise Position nicht

verändert. Die Zahlenwerte der einzelnen Auswertungen werden in einer zuvor erstellten Tabelle (Microsoft Office 2010, Excel) vermerkt, und die Ergebnisse unter Zuhilfenahme einer Statistiksoftware objektiv beurteilt.

3.3.2.2 MODELL DES MUSCULUS CREMASTER

Für die Untersuchung der funktionellen Rolle von Progranulin im Zusammenhang mit Atherosklerose wird die Rekrutierung und Interaktion von Immunzellen, insbesondere von Leukozyten, am Modell des Musculus cremaster, welches eine Visualisierung der Mikrozirkulation im Rahmen einer sterilen Entzündung ermöglicht, an PGRN^{-/-} - Mäusen sowie entsprechenden Kontrolltieren (PGRN^{+/+}) erhoben.

3.3.2.2.1 INTRASKROTALE INJEKTION

Nach Induktion einer kurzen Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Kapitel 3.3.1.1) werden die Versuchstiere unter kontinuierlicher Gaszufuhr in Rückenlage auf einer Wärmematte mit Klebeband zumindest an den Hinterbeinen fixiert, und in dieser Position der Hoden durch leichten Druck auf den Bauch von kranial nach kaudal exponiert. Bei fehlendem Schmerzreflex (Fehlen des Zwischenzehenreflexes) kann die intraskrotale Injektion von 300ng/350µL Tumornekrosefaktor-alpha (Murine TNF-α, Cat. # 315-01A, 20 µg, Lot# 041054, PeproTech, Inc., New Jersey, USA) in den Hodenzwischenraum mittels feinsten Kanüle (BD Microlance TM 3, 30 G ½“, 0,3 x 13mm, BD Drogheda, Ireland) vorgenommen werden. Nach erfolgter Injektion wird die inhalative Anästhesie mit Isofluran abgestellt, und die Mäuse nach Wiedererwachen für 4 Stunden bis zur chirurgischen Präparation in Einzelkäfigen vom Typ I (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) unter Wärmeapplikation (auf Wärmeunterlagen) gehalten; frisches Wasser und nagegerechtes Haltungsfutter wird den Tieren ad libitum zur Verfügung gestellt.

3.3.2.2.2 CHIRURGISCHE PRÄPARATION DES MUSCULUS CREMASTER

3-3,5 Stunden nach intraskrotaler Injektion erfolgt die chirurgische Präparation des Musculus cremaster unter einem Stereomikroskop (ZEISS Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Jena) modifiziert nach der Erstbeschreibung von Baez [140]. Nach Einleitung der Kombinationsnarkose (Verweis auf Kapitel 3.3.1.2) wird das Versuchstier unter konstanter Sauerstoffzufuhr zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Oxygenierung in Rückenlage auf einer speziell für das Cremaster-Modell konstruierten Plexiglas-Platte (Plexiglas®, Dipl. Ing. Martin Humbs, Valley) mit Klebeband fixiert. Durch leichten abdominellen Druck wird der Hodensack optimal auf dem Plateau der Plexiglas-Platte positioniert, das Eingriffsgebiet am Skrotum mittels elektrischem Haarschneider und Enthaarungscreme (PlicaR extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl) von Haaren befreit, und die Haut mit Alkohol (CutaseptRF, Bode Chemie, Hamburg) entfettet und desinfiziert. In einem nächsten Schritt wird der in der Regel rechte Hoden durch ventrale Inzision des Hodensacks unter Zuhilfenahme einer Mikro-Federschere (Art.-Nr.: 05.12.30, Medicon, Germany) freigelegt. Anschließend wird der am meisten distal gelegene mediale Anteil des Hodens (Apex) auf dem transparenten Podest der Plexiglas-Platte (Plexiglas®, Dipl. Ing. Martin Humbs, Valley) mit feinsten eigens konstruierter „L-shape“-Kanüle (BD Microlance TM 3, 30 G 1/2", 0,3 x 13mm, BD Becton Dickinson GmbH, Germany) fixiert, das eröffnete Skrotum zum Schutz des Gewebes vor Austrocknung und zur Ermöglichung einer besseren Sicht kontinuierlich mit isotonischer Natriumchloridlösung (NaCl 0.9%, Diaco, Serag-Wiessner KG, Naila) superfundiert, und die bindegewebige Hülle, die den Hoden umgibt, ohne Traumatisierung des M. cremaster entfernt. Hieraufhin wird der Musculus cremaster mit Hilfe eines Kauters (High Temperature cautery, Loop Tip 2" Extended Shaft, REF:AA05, Bovie Medical Corporation Clearwater, FL 33760 USA) durch Längsschnitt von proximal nach distal ventral in einer möglichst gefäßarmen Region eröffnet, und über dem transparenten Podest der Plexiglas-Platte mit „L-shape“-Kanülen aufgespannt. Im Anschluss werden Hoden und Nebenhoden sorgsam vom Musculus cremaster getrennt und in die Bauchhöhle zurückgeschoben.

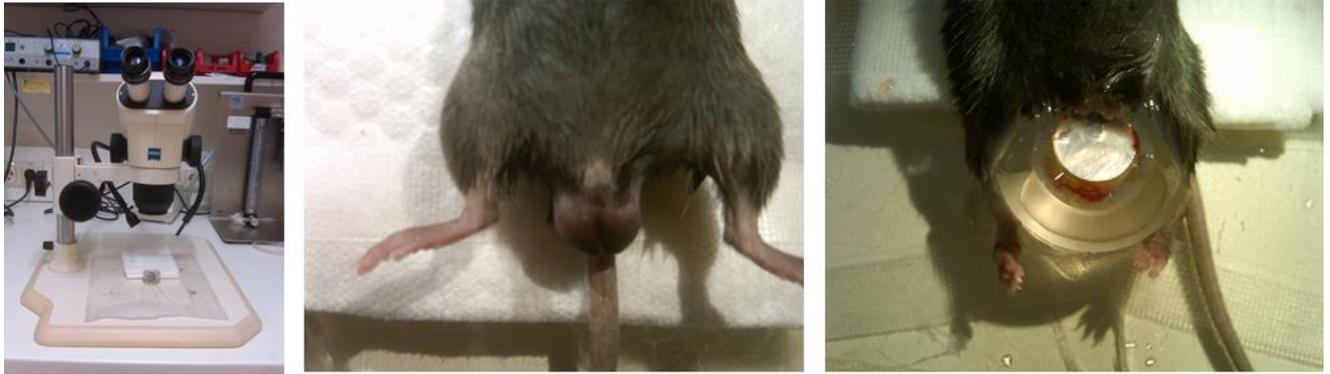


Abbildung 14: Aufbau des Versuchsplatzes (links), Exposition des murinen Skrotums vor der Präparation (mittig) und Präparation und Aufspannen des Musculus cremaster auf dem Plexiglas-Plateau mittels „L-shape“-Kanülen (rechts).

3.3.2.2.3 ÜBERSICHT ÜBER DEN VERSUCHSAUFBAU

Das Modell des Musculus cremaster mit der „Reflected-Light Oblique Transillumination“-Mikroskopie (kurz: RLOT) wird jeweils an einer definierten Anzahl von Tieren der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} sowie der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} im Alter von 9-11 Wochen durchgeführt.

Nach Induktion der Anästhesie und Präparation des Musculus cremaster, welche in der Regel etwa 10-20 Minuten dauert, wird das Versuchstier zunächst auf einer Wärmeunterlage unter kontinuierlicher Nah-Infrarotbestrahlung (Infrarotlampe SANITAS SIL 16, 150 Watt, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler) zur Reduktion der Myo- und Hämoglobinextinktion und Verringerung der Phototoxizität unter einem RLOT-Mikroskop (ZEISS Axioskop 2 FS Plus, Carl Zeiss AG, Jena) platziert. Im weiteren Verlauf wird das Verhalten der zu untersuchenden Immunzellen, nämlich die Adhäsion an die Gefäßwand, das „Rolling“ und die transendotheliale Transmigration von Leukozyten näher beobachtet, und präzise in einem Versuchsprotokoll festgehalten.

Im Anschluss an den operativen Teil wird eine Punktion der Vena facialis zur Blutentnahme und Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl vorgenommen, um darüber eine Aussage treffen zu können, ob die durch intraskrotale Injektion von Tumornekrosefaktor-alpha (kurz: TNF- α) induzierte

Inflammation die Anzahl zirkulierender Leukozyten beeinflusst. Danach wird das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet.

3.3.2.2.4 VERSUCHSPROTOKOLL / DOKUMENTATION

Zu jedem Versuch wird ein Versuchsprotokoll mit folgenden Informationen angefertigt: Versuchsdatum, Tiernummer, Tierstamm, Geburtsdatum (Alter in Wochen), Geschlecht, Genotyp, Elterntiere mit Tiernummern, Menge der benötigten Kombinationsanästhesie, eventuelle Komplikationen, Versuchsablauf, Videoaufzeichnungen, und Blutentnahme zur systemischen Leukozytenbestimmung.

Cremaster - Modell: Versuchsprotokoll Leukozyten-*trans*-migration nach TNF-Injektion

Datum:

Tier:

Nummer:	Stamm:	Genotyp:
Geburtsdatum:	Alter in Wochen:	Geschlecht:
Mutter:	Vater:	

Narkose:

MMF (à 35 µl Fentanyl):

ausgetragen am:

Versuchsablauf:



1. Injektion mTNF-α
 Konzentration: Zeitpunkt:
 (Wartezeit nach Injektion und Präparation: 4h)

2. Präparation Cremaster re li

3. Imaging

(http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr09/amir/_Tissue/Tissue.html)

Notiz:

Videos:

#1:
#2:
#3:
#4:
#5:
#6:
#7:
#8:

Ergebnis:

Abbildung 15: Übersicht Versuchsprotokoll Modell Musculus cremaster.

3.3.2.2.5 RLOT (“REFLECTED-LIGHT OBLIQUE TRANSILLUMINATION”) – INTRAVITALMIKROSKOPIE

3.3.2.2.5.1 PRINZIPIEN DER RLOT

Mit Hilfe der RLOT („Reflected-Light Oblique Transillumination“)-Intravitalmikroskopie gelingt es, dynamische Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, nämlich Rolling weißer Blutkörperchen am Gefäßendothel, feste Leukozytenadhäsion und eine konsekutive gerichtete transendotheliale Transmigration von Leukozyten in das Interstitium intravitalmikroskopisch in einer *pseudo-dreidimensionalen* Echtzeit-Analyse *in vivo* nach Applikation von Chemo- beziehungsweise Zytokinen [161] durch einen anaxialen Strahlengang und die damit verbundene Trennung des Lichtes in diverse Phasengradienten zu analysieren.

„Oblique Transillumination“ bezeichnet in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass ein spiegelnder Reflektor direkt unter dem zu untersuchenden Gewebe (hier: Musculus cremaster) platziert wird und dessen Neigungswinkel je nach Präparat unterschiedlich gewählt werden kann, um im Gegensatz zur klassischen Transillumination (Reflektorneigung: 0°) unterschiedlich starke Schattierungen hervorzurufen. Durch sukzessiv gesteigerte Neigung des spiegelnden Reflektors gewinnen die intravitalmikroskopischen Echtzeit-Aufnahmen durch die unterschiedlich starken Schattierungen an Plastizität, und machen ein frühes Visualisieren zellulärer Vorgänge möglich [161]. So werden sowohl bindegewebige Strukturen als auch intra- sowie extravasal befindliche Leukozyten sichtbar.

Der spiegelnde Reflektor besteht aus einem runden Deckglas der Dicke 0,19-0,22 mm und einem Durchmesser von 11,8 mm, welches zuvor mit einer Aluminiumschicht überzogen wurde (Freichel & Co. oHG, Kaufbeuren, Deutschland). Der Reflektor wird für den Versuch in unmittelbaren Kontakt mit dem darüber liegenden Musculus cremaster gebracht.

Für die intravitalmikroskopischen Echtzeit-Aufnahmen kommt ein Aufrechtmikroskop (ZEISS, Axioskop 2 FS Plus, 20/0,50 W Ph2, Carl Zeiss AG, Jena) zum Einsatz, welches für stroboskopische Fluoreszenz-Epiilluminationsmikroskopie ausgerüstet ist. Als Lichtquelle dient eine 75-W-

Xenonlampe, welche monochromatisches Licht der Wellenlänge 679 nm mit Hilfe eines galvanometrischen Scanners (Polychrome Manual Control II, TILLPhotonics, Gräfelfing, Germany) und durch einen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) - Filterblock und dichroitische Filter sowie Emissionsfilter (DCLP 500, LP515, Olympus Mikroskopie) auf das zu untersuchende Präparat abgibt. Die Videoaufzeichnungen erfolgen mit Hilfe von Wasserimmersionslinsen (Olympus Mikroskopie, 20x/Numerische Apertur (NA) 0.5). Über eine digitale CCD – Kamera (Imago; T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) können die zellulären Vorgänge *in vivo* auf einem angeschlossenen Computer zur Darstellung gebracht werden. Mit der speziellen Computersoftware TILLvisION 4.0 (T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) erfolgt die gesamte Erfassung, Dokumentation, Bearbeitung und Auswertung der Videoaufzeichnungen.

3.3.2.2.5.2 DURCHFÜHRUNG DER RLOT

Die Durchführung der RLOT-Intravitalmikroskopie zur Analyse der dynamischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgt 4 Stunden post injectionem von 300ng/350µL TNF- α , einem inflammatorischen Stimulus, in den Hodenzwischenraum unmittelbar nach Platzierung des Versuchstieres unter dem Standmikroskop mit einer 20-fachen Vergrößerung unter ständiger Superfusion mit isotonischer Natriumchloridlösung. Es werden zufällig ausgewählte Venensegmente eines mittleren Durchmessers von 25-30 µm nach einem feststehenden Protokoll (size 640 x 480, bin 1 x 1, repeat 600 times, cycle time 100 ms) aufgenommen. Diese sollen nach Möglichkeit in ihrem Verlauf keine Zuflüsse von Venolen erhalten. Pro Versuchstier werden mindestens 4 Aufnahmen aufgezeichnet.

3.3.2.2.5.3 TNF-ALPHA

Für die RLOT-Intravitalmikroskopie werden den Versuchstieren 300ng/350µL Tumornekrosefaktor-alpha (Verweis auf Kapitel 2.1.4) intraskrotal injiziert.

3.3.2.2.6 AUSWERTUNG DER VIDEOAUFZEICHNUNGEN

Die Auswertung der Videoaufnahmen erfolgt mit dem Computerprogramm TILLvisION. Evaluiert werden alle aufgezeichneten Venensegmente pro Versuchstier. Dazu werden die gespeicherten intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen aufgerufen, und jeweils fest adhärente, rollende sowie transmigrierte Leukozyten durch Auszählung erfasst.

Als „fest adhärent“ werden diejenigen Leukozyten charakterisiert, welche über die Gesamtaufnahmedauer ihre Position beziehungsweise Lage nicht verändern und dem Gefäßendothel fest anhaften. Ihre Anzahl wird auf 100 µm Länge des Gefäßes bezogen in einer zuvor erstellten Tabelle festgehalten. Die Endothelzelloberfläche setzt sich aus dem Durchmesser des zu untersuchenden Gefäßabschnittes und der Länge des Venensegments zusammen; eine zylindrische Geometrie wird vorausgesetzt.

Als „rollend“ werden dagegen diejenigen Leukozyten bezeichnet, die sich aufgrund von Margination und Endothelzellkontakt im Vergleich zur Blutflussgeschwindigkeit langsamer bewegen; sie werden über den gesamten Aufnahmezeitraum als eindeutig sichtbar das Gefäßsegment passierend gemessen. Auch dieser Zahlenwert wird entsprechend 100 µm Gefäßlänge in einer Datenbank vermerkt.

Die Quantifizierung transmigrierter Leukozyten erfolgt auf beiden Seiten des Venensegments in sogenannten Regions of interests (kurz: ROIs); diese Messfelder weisen eine Fläche von 100x50 µm auf. Um die transendotheliale Migration von Leukozyten zu untersuchen, wird jeweils die Anzahl der transmigrierten Zellen in den ROIs ausgezählt, und ebenfalls in einer Tabelle (als $n \times 10^4 \mu\text{m}^2$) protokolliert.

Die quantitativ erfassten Ergebnisse werden im Anschluss unter Zuhilfenahme einer Statistiksoftware objektiv beurteilt.

3.3.3 BESTIMMUNG DES AUSPRÄGUNGSGRADES DER ATHEROSKLEROTISCHEN VERÄNDERUNGEN

3.3.3.1 PROBENGEWINNUNG

3.3.3.1.1 BLUTABNAHME DURCH PUNKTION DER VENA FACIALIS ZUR BESTIMMUNG DER SYSTEMISCHEN LEUKOZYTENZAHL

Diese Blutabnahmetechnik ermöglicht unter Berücksichtigung der empfohlenen maximalen Blutvolumina [162] die Entnahme von etwa 100 µl Vollblut.

An einem gemeinsamen Punkt, an dem verschiedenste Gesichtsvenen zusammenfließen, können Blutproben entnommen werden (siehe Abbildung 16). Nach Induktion einer kurzen Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Verweis auf Kapitel 3.3.1.1) wird das Versuchstier vorübergehend betäubt. Im Anschluss wird die V. facialis einerseits durch Fixierung der Haut im Nacken und andererseits durch Straffung der Gesichtshaut mit zwei Fingern gestaut. 3-5 mm dorsokaudal des Haarwirbels an der Oberkante der Mandibula wird mit einer sterilen Blutlanzette (Feather Blood Lancet, Feather Safety Razor Co., Osaka, JP) eingestochen und die Vena facialis punktiert. Die sichtbar werdenden Blutstropfen werden mit Hilfe eines ETDA-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 100 µl (Microvette® 100 K3E, SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg) aufgefangen. Zur Stillung der Blutung und Vermeidung einer Hämatomentwicklung wird im Anschluss an die Punktion etwa 1-2 Minuten die Einstichstelle mit einem Wattestäbchen (Cotton buds, Hartmann, BelPremium, CMC Consumer Medical Care GmbH, Düren) komprimiert [163].

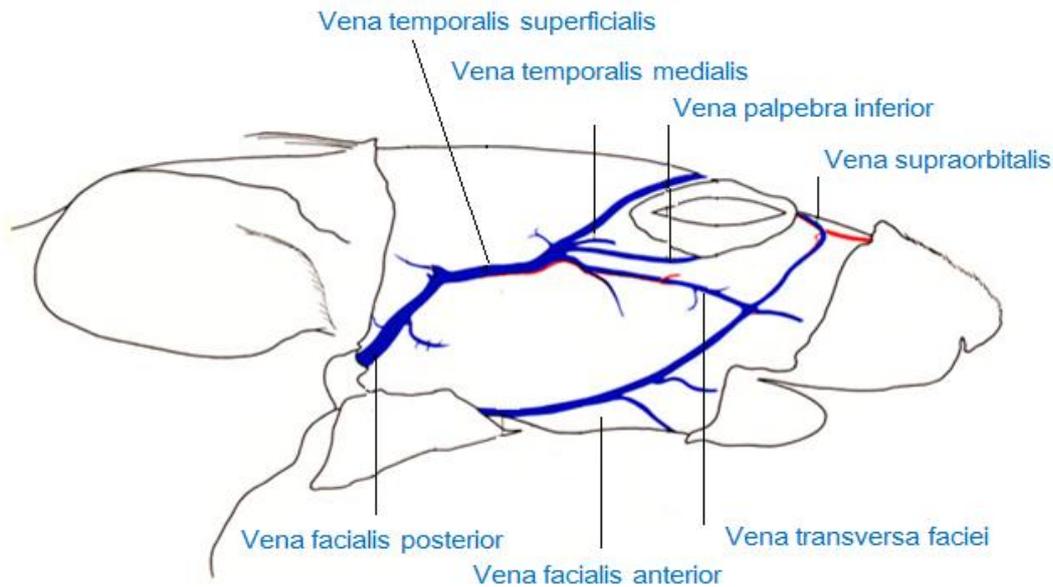


Abbildung 16: Darstellung der Vena facialis, modifiziert nach [152].

Das so gewonnene Blut wird zur Erstellung eines kleinen Blutbildes einem vollautomatischen Analysegerät (SYSMEX Hämatologie-System XE-5000, SYSMEX Deutschland GmbH, Norderstedt) zugeführt.

3.3.3.1.2 INTRAKARDIALE BLUTENTNAHME ZUR BESTIMMUNG VON LIPIDSTOFFWECHSELPARAMETERN

Die Blutentnahme von 800-2000 µl Vollblut zur Analyse der Lipidstoffwechselfparameter durch direkte intrakardiale Punktion stellt einen Terminalversuch dar [162], der sich dem eigentlichen Versuch anschließt. Durch den Blutentzug wird die narkotisierte Maus getötet. Hierzu wird das Versuchstier zunächst im bereits narkotisierten Zustand in Rückenlage mit Klebeband fixiert. Nach oberflächlicher Desinfektion (Cutasept, Bode Chemie, Hamburg) des gesamten Thoraxbereiches wird die äußere Haut eröffnet, und das Herz auf Höhe der zweiten Rippe links parasternal mit einer senkrecht positionierten 26G-Kanüle (BD Microlance, Becton Dickson, Heidelberg) punktiert. Unter Aspiration wird das Blut in einem Heparin-Röhrchen (Li-Heparin LH/1.2 ml, SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg) gesammelt.

Die quantitative Bestimmung des Gesamtcholesterins erfolgt mit einem COBAS INTEGRA ® System (COBAS INTEGRA ® 400/800, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzach-Wyhlen), das auf einem enzymatischen Farbtest beruht: die Cholesterinester werden unter Einwirkung des Enzyms Cholesterin-Esterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Enzym Cholesterin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Cholesterin durch Sauerstoff zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid. Das so entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminoantipyrin und Phenol unter Mitwirkung der Peroxidase einen roten Chinonimin-Farbstoff, dessen Farbintensität sich direkt proportional zur Cholesterinkonzentration verhält. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 512 nm bestimmt [164-166].

Die quantitative Bestimmung des High Density Lipoproteins (kurz: HDL) erfolgt ebenfalls mit einem COBAS INTEGRA ® System (COBAS INTEGRA ® 400/700/800, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzach-Wyhlen), das auf einem homogenen enzymatischen Farbtest beruht: in Gegenwart von Magnesiumionen und Dextransulfat kommt es zur Ausbildung wasserlöslicher Komplexe mit LDL, VLDL und Chylomikronen. Diese Komplexe erweisen sich als resistent gegen PEG-modifizierte Enzyme. Die Konzentration des HDL-Cholesterins wird unter Mitwirkung von Cholesterin-Esterase und Cholesterin-Oxidase enzymatisch bestimmt. Auch bei dieser Technik werden die Cholesterinester unter katalysierender Wirkung der Cholesterin-Esterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. In Gegenwart von Sauerstoff wird das Cholesterin durch die Cholesterin-Oxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Die Farbintensität des so entstandenen blauen Chinonimin-Farbstoffs verhält sich direkt proportional zur HDL-Konzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 583 nm bestimmt [164, 167].

3.3.3.2 HISTOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.3.2.1 ORGANENTNAHME

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie und Tötung des Versuchstieres werden unter einem Stereomikroskop (ZEISS Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Jena) Organentnahmen für spätere

histopathologische Untersuchungen vorgenommen. Hierzu wird die tote Maus in Rückenlage positioniert, und sowohl Abdomen als auch Thorax durch mediane Schnittführung eröffnet und die Organe in festgesetzter Reihenfolge Schritt für Schritt entnommen: zunächst werden Anteile der Haut der ventralen Halsregion, Anteile der Leber, die Milz, die Nieren, die Ureteren und Anteile der Harnblase herausgenommen. Nach intrakardialer Spülung des Kreislaufs der Maus mit etwa 5-6 ml isotonischer Natriumchloridlösung, um ein postmortales Gerinnen des noch in den Gefäßen verbleibenden Blutes zu verhindern, werden zuletzt noch Arcus aortae, die beiden Arteriae carotides sowie die Aorta abdominalis entnommen. Bei männlichen Versuchstieren kommt es zusätzlich noch zur Entnahme von Hoden und Nebenhoden.

Nach der Entnahme wird ein Teil der Organe (Arcus aortae, Arteria carotis, Niere, Ureter, Harnblase anteilig, Haut, Hoden, Nebenhoden) für 24 Stunden in einer verdünnten und phosphatgepufferten 4%igen Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd, 4 %, Thermo Scientific, Rockford, USA) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5ml/2ml, Eppendorf AG, Hamburg) fixiert. Die restlichen Organe (Arteria carotis, Aorta abdominalis, Haut, Leber, Niere, Ureter, Hoden, Nebenhoden) werden unmittelbar nach der Entnahme in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter schockgefroren, und in einem -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

3.3.3.2.2 FÄRBUNGEN

3.3.3.2.2.1 ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Im Anschluss an die Organentnahmen sollen die histopathologischen Untersuchungen Aufschluss über den Ausprägungsgrad der atherosklerotischen Veränderungen geben.

Nach 24-stündiger Fixierung der entnommenen Proben in 4%iger Formaldehydlösung werden die Organe in klassische Einbettkassetten (Tissue-Loc® Cassettes, Histo-Screen® Lilac, Richard-Allan-Scientific®, Kalamazoo, Michigan, USA) gelegt, etwa 5-10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend in 70%iges Ethanol gegeben. Unter Zuhilfenahme eines vollautomatischen Einbettautomaten (STP-120, Microm International GmbH, Walldorf) werden die

Organe zunächst entwässert, und in der Folge mit heißem Paraffin (Paraffin (Type 9, Richard-Allan-Scientific®, Kalamazoo, Michigan, USA) in einer sogenannten Ausgießstation (AP 280-2, Microm International GmbH, Walldorf) zu Paraffinblöcken verarbeitet. Zur Abkühlung werden die Proben auf einer Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP20, Medite GmbH, Burgdorf) gelagert.

Zur weiteren histopathologischen Verarbeitung werden etwa 1-2 µm dicke histologische Schnitte in einem definierten Abstand (von jeweils 20 µm) an einem Rotationsmikrotom (Mikrotom HM 340, Microm International GmbH, Walldorf) angefertigt, diese mit Hilfe eines feinen Pinsels aufgelesen und in ein 42°C-warmes Wasserbad (HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch) überführt, um die zuvor angefertigten seriellen Schnittpräparate in die Länge zu ziehen und so von etwaigen Falten zu befreien. Daraufhin werden sie auf beschriftete und beschichtete Objektträger (Superfrost ® Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen, und in einem 37°C-warmen Brutschrank bis zum Färbevorgang deponiert, um sie einerseits endgültig trocknen zu lassen und andererseits eine bessere Haftung der Präparate auf dem Objektträger sicherzustellen.

3.3.3.2.2.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin (kurz: HE) - Färbung [158] stellt eine Routine-Färbung in der Histologie dar. Sie dient der Darstellung verschiedenster feingeweblicher Strukturen, wobei zwischen Zellkernen und Zytoplasma eindeutig differenziert werden kann: Zellkerne erscheinen blau bis violett, Zytoplasma dagegen eher rosa bis rot. Bei Hämatoxylin handelt es sich um eine Farbvorstufe, welche noch keine färbende Potenz besitzt. Erst durch Oxidation wird es in das färbende Hämalaun überführt; es kommt zu einer Blaufärbung aller basophilen beziehungsweise sauren Zellstrukturen. Eosin ist ein saurer Zytoplasma-Farbstoff, der zu einer Rotfärbung aller basophilen beziehungsweise azidophilen Zellstrukturen führt. Die vorbereiteten Paraffinschnitte werden zur HE-Färbung dem herkömmlichen Färbeprotokoll zugeführt.

3.3.3.2.3 ELASTIKA-VAN-GIESON-FÄRBUNG

Bei der Elastika-van-Gieson-Färbung handelt es sich um eine häufige histologische Färbemethode, bei der vor allem bindegewebige Strukturen und Muskulatur zur Darstellung kommen. Hierzu wird zunächst mit Hämatoxylin gefärbt, und der dann eine Gegenfärbung mit Pikrinsäure-Thiazinrot angeschlossen.

Zellkerne treten schwarzblau bis schwarzbraun, Zytoplasma und Muskelgewebe gelb, elastische Fasern schwarzviolett, und Kollagenfasern rot in Erscheinung.

Die Paraffinpräparate werden nach dem bewährten Verfahren behandelt [158].

3.3.3.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE

Immunhistochemie (kurz: ICH), häufig auch als Immunhistologie oder Antikörperfärbung bezeichnet, stellt eine Färbemethode dar, mit der Antigene in Gewebeschnitten detektiert und dadurch Proteine und auch andere Strukturen im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden können. Zu diesem Zweck werden die Gewebeschnitte gezielt Fluoreszenz-markierten Antikörpern ausgesetzt, die spezifische Epitope im Gewebe erkennen und an diese binden. Bei der Immunhistochemie werden zwei verschiedene Methoden der Detektion unterschieden: zum einen gibt es die direkte Immunmarkierung, bei der ein markierter Primärantikörper direkt das Antigen bindet, und zum anderen die indirekte Immunmarkierung, bei welcher ein nicht markierter Primärantikörper das Antigen bindet, und von einem markierten Sekundärantikörper, der an die F_c-Region des Primärantikörpers bindet, detektiert wird. Die direkte Methode ist relativ einfach und schnell durchführbar, besticht durch weniger unspezifische Signale und Hintergrundmarkierungen und erlaubt Mehrfachmarkierungen. Die indirekte Methode bietet dagegen den Vorteil, dass diverse Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können; es kommt zu einer Signalverstärkung.

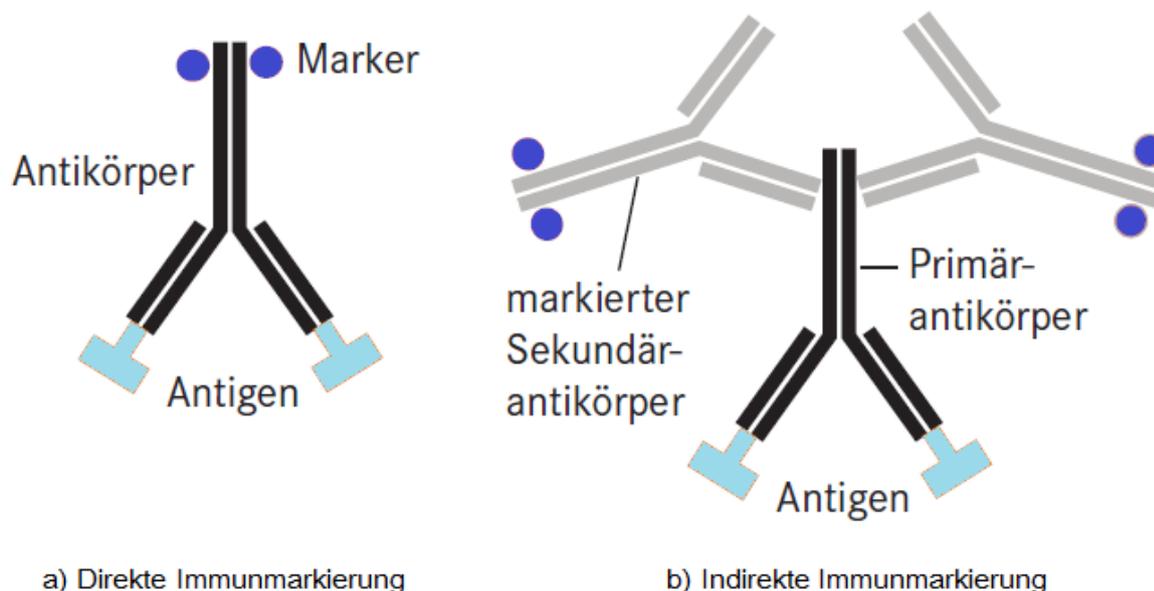


Abbildung 17: Direkte (a) und indirekte (b) Immunmarkierung, modifiziert nach [158].

3.3.3.2.3.1 ANFERTIGUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

Für immunhistochemische Untersuchungen beziehungsweise die Antikörperfärbung kommen Gefrierschnitte zur Anwendung. Hierzu werden die jeweiligen Organe in ein durchsichtiges Stück halbierten Plastikschauchs (Tube Silicone „Novosil“, 5m, 3 x 6 mm, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch Cedex, FR) auf einer dünnen Schicht von Einbettmedium zum Kryoschneiden (Tissue-Tek® O.C.T™, Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) gebettet und in einer mit Trockeneis gefüllten Box (Kühlbox, KGW Isotherm, Karlsruhe) gefrierkonserviert. Bis zur weiteren Verarbeitung an einem Kryostat (Kryostat CM 1850, Leica Biosystems, Nussloch) werden die eingefrorenen Proben in einer beschrifteten Petrischale in einem -80°C-Gefrierschrank (Heraeus Herafree, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) gelagert.

Zum Anfertigen von Gefrierschnitten werden die kryokonservierten Präparate zunächst in einem Kryostat (Kryostat CM 1850, Leica Biosystems, Nussloch) auf etwa -25°C erwärmt, und unter Verwendung des Einbettmediums auf vorgekühlten Stempeln fixiert. So lassen sich anschließend

etwa 3-5 µm dicke Schnittpräparate herstellen, welche nachfolgend auf beschriftete und beschichtete Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgebracht werden. Die Lagerung der erstellten Schnittpräparate erfolgt bis zur immunhistochemischen Färbung in einem -20°C-Gefrierschrank.

3.3.3.2.3.2 IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung werden die Objektträger bis auf Weiteres in einer schwarzen, für Licht nicht zugänglichen Färbekammer positioniert, die zum Schutz der Gefrierschnittpräparate vor Austrocknung leicht mit Wasser gefüllt ist. Um ein Abschwemmen der später aufzutragenden Lösungen und damit ein Austrocknen der Schnittpräparate zu verhindern, werden diese mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) mehrfach umrandet.

3.3.3.2.3.2.1 DOPPELFÄRBUNG

Die immunhistochemischen **Doppelfärbungen** erfolgen nach folgendem Färbeprotokoll:

Anfänglich werden die Objektträger zur Fixierung für 3 Minuten bei Raumtemperatur in eine mit frisch angesetzter 4%iger Formaldehydlösung (Formaldehyd, 4 %, Thermo Scientific, Rockford, USA) gefüllte Waschküvette gegeben, und im Anschluss dreimal mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) + 0,1% Tween (TWEEN® 20, SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA) sorgfältig gewaschen. In einem nächsten Schritt wird 10% fetales bovines Serum (kurz: FBS) in dPBS 1x (dPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x, GIBCO®, Invitrogen) + 0,1% Tween auf die Objektträger gegeben und diese für etwa 2-3h bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungen am F_c-Rezeptor zu blockieren. Nach erfolgter Inkubation wird diese Lösung lediglich von den Objektträgern abgeklopft; eine Waschung wird unter keinen Umständen vorgenommen. Anschließend werden jeweils 100 µl 1% FBS in dPBS 1x + 0,1% Triton und der Primärantikörper (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen: Proteintech Europe, Cat No: 18410-1-AP, Rabbit PolyAb Anti – GRN,) in entsprechender Verdünnung auf die Objektträger aufgetragen, und für

weitere 2 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Ein identischer Antikörper der gleichen IgG-Klasse, welcher gegen ein irrelevantes Antigen der Ratte gerichtet ist, dient als Isotypkontrolle. Zur Evaluation der Spezifität des Antikörpers wird im gleichen Ansatz eine Negativkontrolle (Dako, Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase-absorbed), 15 g/L, Dako Denmark A/S, Glostrup, DK) durchgeführt. Nach der zweistündigen Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Objektträger mit einer mit PBS 1 + 0,1% Tween-Lösung etwa 5 x 5 Minuten lang gewaschen. Danach werden 100 µl 1% FBS in dPBS 1x + 0,1% Tween und als Sekundärantikörper ein fluoreszierender Alexa Fluor Zweitantikörper 488 in „grün“ in einer Verdünnung von 1:500 (Alexa Fluor® 488 donkey, anti-rabbit IgG (H+L), 2 mg/mL, invitrogen molecular probes, Eugene, Oregon, USA) auf die Objektträger aufgebracht, und diese für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und erneuter ordnungsgemäßer Waschung der Objektträger wird zur Kernfärbung 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI Nucleic Acid Stain (10 mg), # D1306, Invitrogen, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:3000 (1 µg/ml) für wenige Sekunden bis maximal einer Minute verwendet. Die Präparate werden daraufhin erneut einer 5 x 5-minütigen Waschung unterzogen. Dann werden die Objektträger abgeklopft, und mit einem Deckglas (Cover Slips, 24 x 50 mm, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs – GmbH, Braunschweig) abgedeckt und bis zum Abfotografieren bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3.2.3.2.2 DREIFACHFÄRBUNG

Die immunhistochemischen **Dreifachfärbungen** erfolgen dagegen nach folgendem Färbeprotokoll:

Anfänglich werden die Objektträger zunächst zur Fixierung für 3 Minuten bei Raumtemperatur in eine mit frisch angesetzter 4%iger Formaldehydlösung (Formaldehyd, 4 %, Thermo Scientific, Rockford, USA) gefüllte Waschküvette, im Anschluss weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur in eine weitere mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) + 2 % Glycin gefüllte Waschküvette gegeben, und schließlich einmal mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) sorgfältig gewaschen. Vor dem Blocken werden die Zellen für 15 Minuten mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) und 0,1 % Triton (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA) permeabilisiert und dreimal

mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) + 0,1% Tween (TWEEN® 20, SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA) sorgfältig gewaschen.

In einem nächsten Schritt wird ein gereinigtes Fc-Blocking Reagent (anti mouse CD16/32 purified, Clone: 93, eBiosciences, San Diego, CA 92121, USA) in einer Verdünnung von 1:200 (kurz: FBS) in dPBS 1x (dPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x, GIBCO®, Invitrogen) auf die Objektträger gegeben und diese für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen am F_c-Rezeptor zu blockieren. Nach erfolgter Inkubation wird diese Lösung lediglich von den Objektträgern abgeklopft; eine Waschung wird unter keinen Umständen vorgenommen. Anschließend werden sowohl 100 µl 0,5 % BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in dPBS 1x und der Primärantikörper gegen das Progranulin-Antigen (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, Mouse Progranulin Affinity Purified Polyclonal Ab, Sheep IgG, Cat No: AF2557, 0.2 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:50 als auch 100 µl 0,5 % BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in dPBS 1x und der Primärantikörper gegen das CD45-Antigen (eBioscience, San Diego, CA 92121, USA, ratIgG2b, clone: 30F-11, Anti-Mouse CD45 Purified, Catalog Number: 14-0451, 0.5 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:100 auf die Objektträger aufgetragen, und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Identische Antikörper der gleichen IgG-Klasse, welche sowohl gegen ein irrelevantes Antigen des Schafes (Purified polyclonal sheep IgG) als auch gegen ein irrelevantes Antigen der Ratte (Purified Rat IgG2b) gerichtet sind, dienen als Isotypkontrollen. Nach der dreistündigen Inkubation mit den Primärantikörpern werden die Objektträger zuerst mit einer mit PBS 1 + 0,1% Tween-Lösung etwa 2 x 5 Minuten lang, im Anschluss daran einmal mit PBS 1 x (PBS pH 7.4, Phosphate Buffered Saline 10x, GIBCO®, invitrogen; Darmstadt) gewaschen. Danach werden 100 µl 0,5 % BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in dPBS 1x und als Sekundärantikörper sowohl ein fluoreszierender Alexa Fluor Zweitantikörper 594 in „grün“ in einer Verdünnung von 1:100 (Alexa Fluor® 594 donkey, anti-sheep IgG (H+L), A-11016, 2 mg/mL, invitrogen molecular probes, Eugene, Oregon, USA) als auch ein fluoreszierender Alexa-Fluor Zweitantikörper 488 in „rot“ in einer ebenfalls Verdünnung von 1:100 (Alexa Fluor® 488 goat, anti-FITC IgG (H+L), 2 mg/mL, invitrogen molecular

probes, Eugene, Oregon, USA) auf die Objektträger aufgebracht, und diese für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und erneuter ordnungsgemäßer Waschung der Objektträger wird zur Kernfärbung 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI Nucleic Acid Stain (10 mg), # D1306, Invitrogen, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:3000 (1 µg/ml) für wenige Sekunden bis maximal einer Minute verwendet. Die Präparate werden daraufhin erneut einer 2 x 5-minütigen Waschung unterzogen. Dann werden die Objektträger abgeklopft, und mit einem Deckglas (Cover Slips, 24 x 50 mm, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs – GmbH, Braunschweig) abgedeckt und bis zum Abfotografieren bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3.2.4 SUDAN-III-FÄRBUNG

Die Sudan-III-Färbung, die häufig auch als Ölrot-Färbung (oil-red-staining) bezeichnet wird, ist eine histologische Färbetechnik, die dazu dient, Lipide nachzuweisen. Durch eine Rotfärbung fetthaltiger Einlagerungen lassen sich atherosklerotische Plaques in der Gefäßwand darstellen und quantifizieren.

Zur Durchführung der Färbung wird nach der Tötung des Versuchstieres zunächst der Arcus aortae (Aortenbogen) vorsichtig freipräpariert, und anschließend entnommen. In einem nächsten Schritt wird der entnommene Gefäßabschnitt sorgsam mit isotonischer Natriumchloridlösung durchspült. Zur Fixierung wird die Probe in toto für 12 bis 24 Stunden in 4%-igem Formalin eingelegt (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). Danach wird das Gefäß einem feststehenden Färbeprotokoll zugeführt. Dieses beinhaltet zunächst eine Überführung des Aortenbogens in Aqua bidest für 2 Minuten. Anschließend wird die Probe für etwa 3 Minuten in 75% Ethanol (Emplura®, Ethanol absolute: Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn), dann für weitere 25-30 Minuten in die Sudan-III-Färbelösung ((Sudan III C.I. 26100, Merck, Darmstadt), und zuletzt erneut für 2 Minuten in Aqua bidest eingelegt. Nach dem Färbevorgang wird das Gefäß zunächst auf einer Petrischale ausgelegt und dieses von restlichem periarteriellm Fett- und Bindegewebe befreit. Durch ein Deckgläschen (Cover Slips, 24 x 50 mm, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig) wird der Aortenbogen in Position gehalten und mit Aqua bidest unterspült. Letztlich wird dieser unter einem Auflichtmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss AG, Jena) mit einem 2,5x-Objektiv durch kontinuierliche

Zufuhr einer externen Lichtquelle digital *en-face* abfotografiert (AxioCam, Carl Zeiss AG, Jena). Unter Zuhilfenahme eines Computerprogrammes für Bildanalyse (CapImage, Version 7.4.1, Dr. Zeintl, Heidelberg) werden die Flächen der sich in rot darstellenden atherosklerotischen Läsionen quantifiziert und in Relation zur Gesamtfläche des Aortenbogens gesetzt.

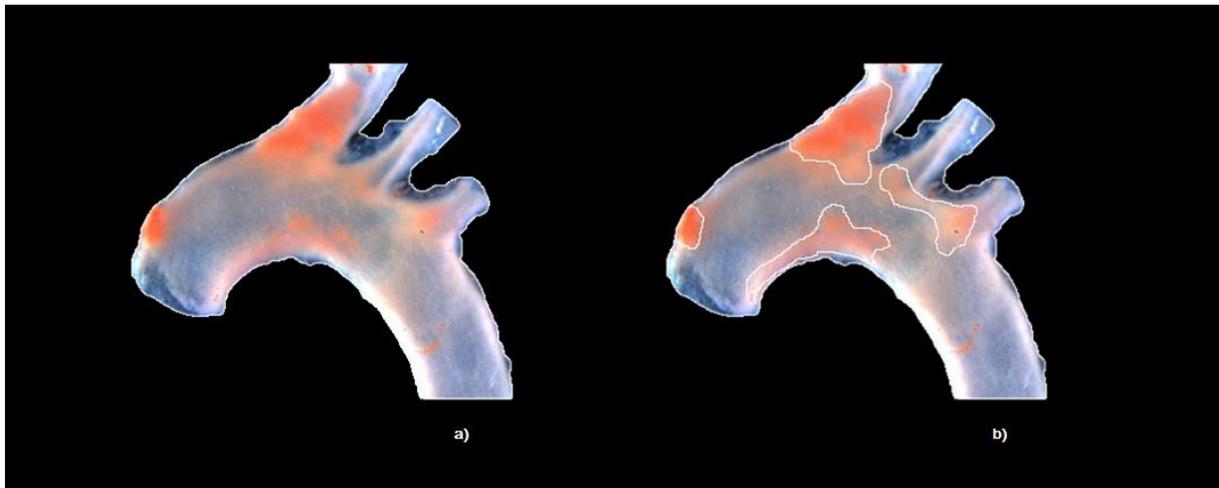


Abbildung 18: Ermittlung der relativen Plaquefläche: **a)** im linken Teil der Abbildung wird durch Umfahrung des Aortenbogens die Gesamtfläche des Gefäßes ermittelt; **b)** im rechten Teil der Abbildung wird im Gegensatz dazu die absolute Plaquefläche innerhalb der zuvor bestimmten Gesamtfläche gemessen. Die relative Plaquefläche lässt sich aus dem Verhältnis der beiden Flächen zueinander ableiten.

3.3.4 STATISTISCHE BERECHNUNGEN

Für die statistische Auswertung werden alle erhobenen Daten im Programm Excel (Excel 2013, Microsoft Corporation) tabellarisch aufgelistet, ausgewertet und graphisch mit Hilfe von Balkendiagrammen zur Darstellung gebracht.

Um Aufschluss über die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen zu erhalten, werden im Anschluss im Programm Sigma Stat® 3.5 (Systat Software GmbH) für Windows diverse Tests der deskriptiven Statistik durchgeführt: ein nicht-parametrischer, unverbundener Test dient zur statistischen Berechnung. Sind die Mittelwerte der jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppe

unverbunden und normalverteilt, werden diese mit dem t-Test verglichen, und auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Sind die Stichproben dagegen unverbunden und nicht normalverteilt, erfolgt ein Mann-Whitney Rank Sum Test. Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wird ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen, und dieser in den Schaubildern über den Balkendiagrammen dokumentiert.

Part 4. ERGEBNISSE

4.1 ERGEBNISSE DES A. CAROTIS-MAUSMODELLS

4.1.1 KÖRPERGEWICHT DER VERSUCHSTIERE

Die Versuchstiere, die für das A. carotis-Mausmodell vorgesehen sind, werden jeweils vor Versuchsbeginn gewogen, um vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu gewährleisten.

Im Wildtyp-Kontrollstamm $PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}$ beträgt das mittlere Körpergewicht der Versuchstiere in einem Alter von 16 Wochen (4 Wochen + 12 Wochen HCD) $28,59 \pm 3,52$ g (Anzahl der Versuchstiere $n = 11$). Im transgenen Mausstamm $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ beläuft sich das ermittelte mittlere Eigengewicht der Versuchstiere auf $26,06 \pm 4,55$ g (Anzahl der Versuchstiere $n = 10$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gewichten der einzelnen Gruppen können nicht aufgezeigt werden ($p = 0,168$ vs. $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$).

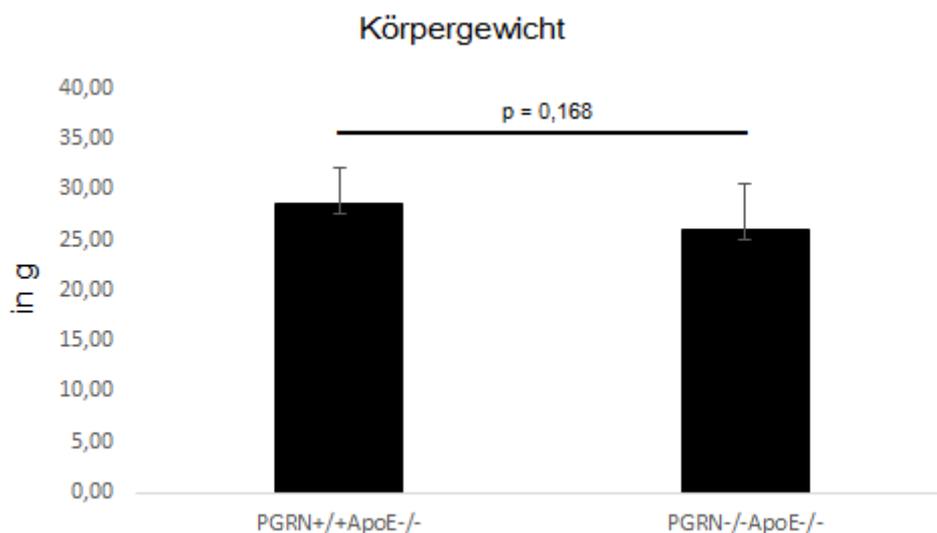


Abbildung 19: Ermitteltes mittleres Körpergewicht: links: $PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}$ ($n = 11$) vs. rechts: $PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}$ ($n = 10$), $p = 0,168$.

Das mittlere Körpergewicht der Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} nimmt in einem Alter von 20 Wochen (4 Wochen + 4 + 12 Wochen HCD) einen Wert von 24,44 ± 2,48 g (Anzahl der Versuchstiere n = 11), das der Chimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} in einem Alter von 20 Wochen (4 Wochen + 4 + 12 Wochen HCD) einen Wert von 24,77 ± 2,78 g (Anzahl der Versuchstiere n = 12) an (p = 0,765 vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}).

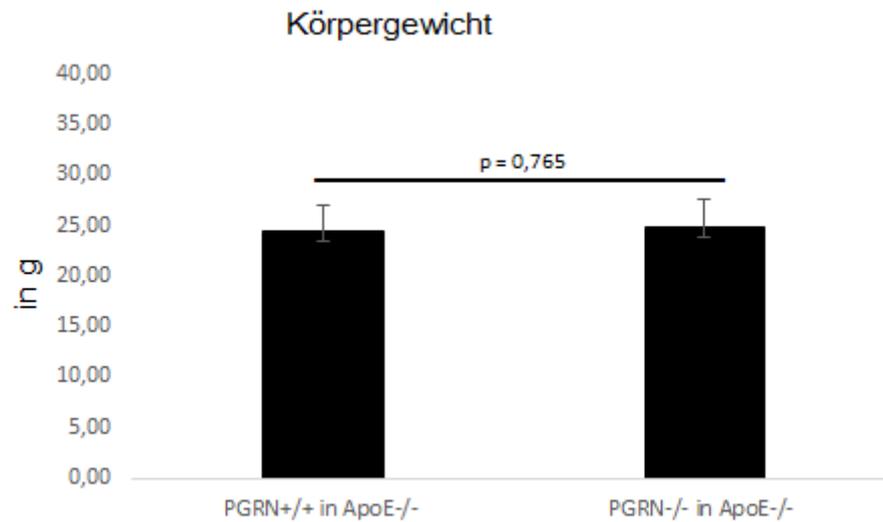


Abbildung 20: Ermitteltes mittleres Körpergewicht: links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 11) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 12), p = 0,765.

4.1.2 BESTIMMUNG DER GESAMTLEUKOZYTENZAHL, DES PLASMA-CHOLESTERINS UND DES HIGH-DENSITY-LIPOPROTEINS (HDL)

Beim transgenen Mausstamm PGRN^{-/-}-ApoE^{-/-} und der entsprechenden Kontrollgruppe PGRN^{+/+}-ApoE^{-/-} sowie bei den Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} werden verschiedene Laborparameter bestimmt. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)		Plasma-Cholesterin (mg/dl)		HDL (mg/dl)	
PGRN ^{+/+} ApoE ^{-/-}	8,87 ± 2,64	p = 0,054	1393,72 ± 332,39	p = 0,524	520,48 ± 190,24	p = 0,730
PGRN ^{-/-} ApoE ^{-/-}	6,53 ± 2,50		1235,07 ± 502,52		478,55 ± 250,06	
PGRN ^{+/+} in ApoE ^{-/-}	13,16 ± 4,94	p = 0,255	286,02 ± 86,08	p = 0,232	81,93 ± 18,49	p = 0,708
PGRN ^{-/-} in ApoE ^{-/-}	11,12 ± 3,51		337,09 ± 71,67		79,13 ± 8,84	

Tabelle 9: Peripheres Blutbild vor Versuchsbeginn: WBC ($10^3/\mu\text{L}$), Plasma-Cholesterin- (mg/dl), und HDL-Spiegel (mg/dl).

Neben der Bestimmung der Anzahl der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) zur Feststellung der Entzündungsreaktion im Setting der Atherosklerose erfolgt die Bestimmung des plasmatischen Cholesterin- und HDL („High-Density-Lipoprotein“) - Spiegels, um einen Eindruck über den Grad der Veränderungen des Fettstoffwechsels zu gewinnen.

Im Wildtyp-Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} lässt sich eine Gesamtleukozytenzahl von $8,87 \pm 2,64 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Anzahl der Versuchstiere n = 12), ein Plasma-Cholesterin von $1393,72 \pm 332,39$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 6), sowie ein HDL von $520,48 \pm 190,24$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 7) quantifizieren. Im transgenen Mausstamm PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} beläuft sich die Gesamtleukozytenzahl auf $6,53 \pm 2,50 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Anzahl der Versuchstiere n = 9), das Plasma-Cholesterin auf $1235,07 \pm 502,52$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 7) und das HDL auf $478,55 \pm 250,06$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 7).

In der Doppel-Knockout-Maus lassen sich zwar jeweils niedrigere Parameter für die Gesamtleukozytenzahl, den Plasma-Cholesterin-, und den HDL-Spiegel im peripheren Blut messen, ein signifikanter Unterschied kann jedoch nicht festgestellt werden (Gesamtleukozytenzahl: p = 0,054 vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}, Plasma-Cholesterin: p = 0,524 vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}; HDL: p = 0,730 vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}).

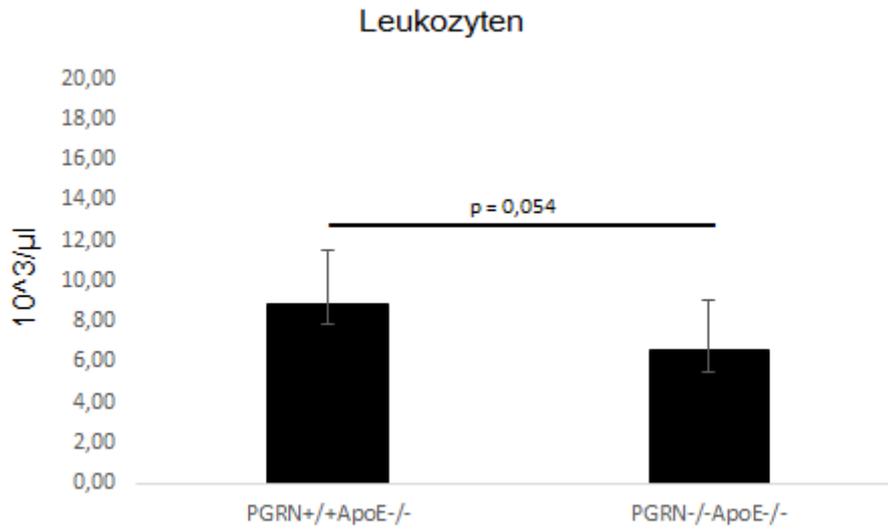


Abbildung 21: Gesamtleukozytenzahl: links: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (n = 12) vs. rechts: PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (n = 9), p = 0,054.

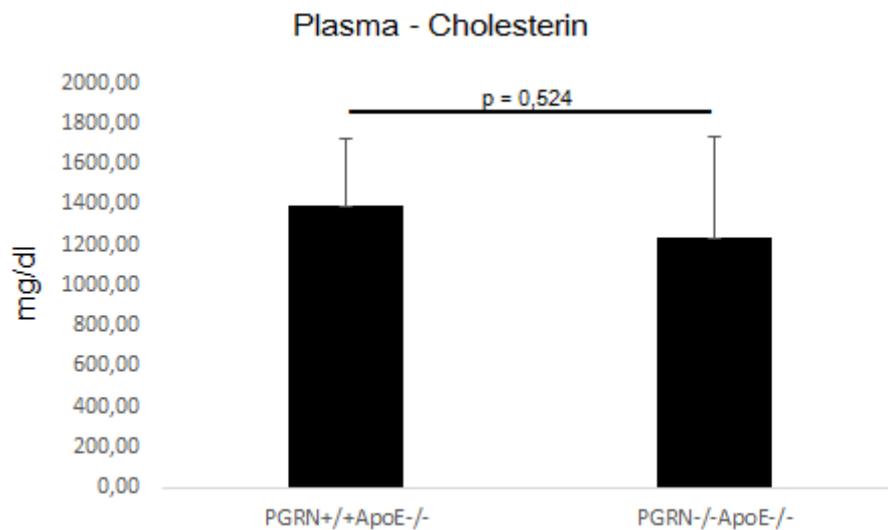


Abbildung 22: Plasma-Cholesterin-Spiegel: links: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (n = 6) vs. rechts: PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (n = 7), p = 0,524.

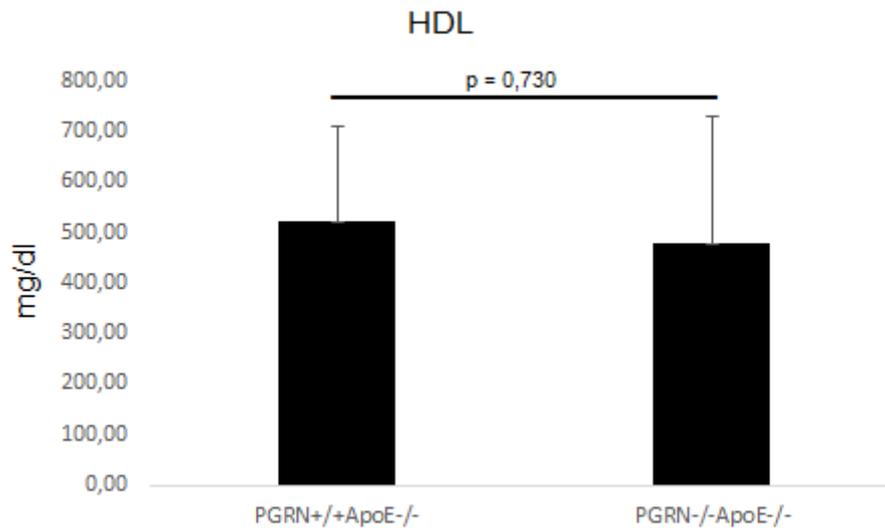


Abbildung 23: HDL-Spiegel: links: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (n = 7) vs. rechts: PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (n = 7), p = 0,730.

Die Chimären-Gruppe weist im Gegensatz dazu eine höhere Leukozyten-Gesamtzahl auf, das Plasma-Cholesterin- und HDL-Level nimmt dagegen auffallend geringere Werte im Vergleich zu den bereits genannten Versuchsgruppen PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} ein. Es finden sich jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede (Gesamtleukozytenzahl: p = 0,255 vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}, Plasma-Cholesterin: p = 0,232 vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}; HDL: p = 0,708 vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}): bei den Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} lassen sich im Mittel $13,16 \pm 4,94 \times 10^3/\mu\text{L}$ Leukozyten (Anzahl der Versuchstiere n = 12), $286,02 \pm 86,08$ mg/dl Plasma-Cholesterin (Anzahl der Versuchstiere n = 7) und $81,93 \pm 18,49$ mg/dl HDL (Anzahl der Versuchstiere n = 7) quantifizieren. In der Gruppe PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} beträgt die Gesamtleukozytenzahl $11,12 \pm 3,51 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Anzahl der Versuchstiere n = 12), das Plasma-Cholesterin $337,09 \pm 71,67$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 8) und das HDL $79,13 \pm 8,84$ mg/dl (Anzahl der Versuchstiere n = 8).

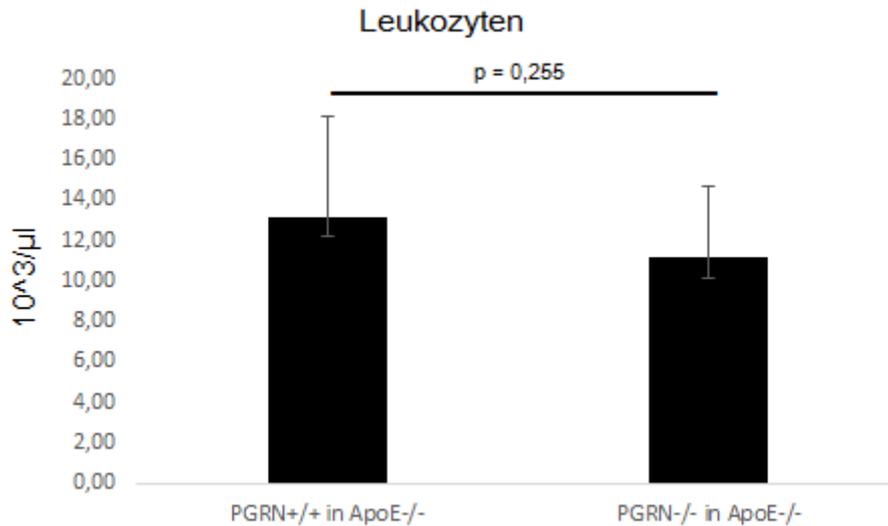


Abbildung 24: Gesamtleukozytenzahl: links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 12) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 12), p = 0,255.

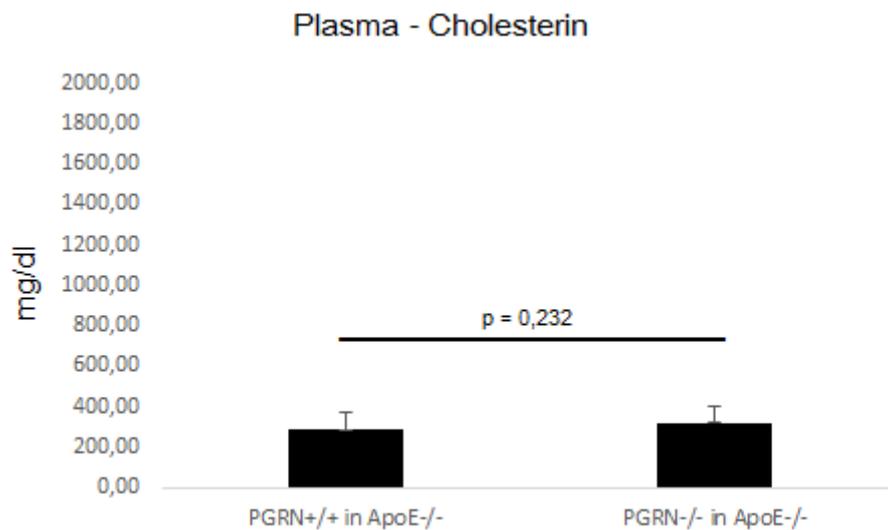


Abbildung 25: Plasma-Cholesterin-Spiegel: links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 7) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 8), p = 0,232.

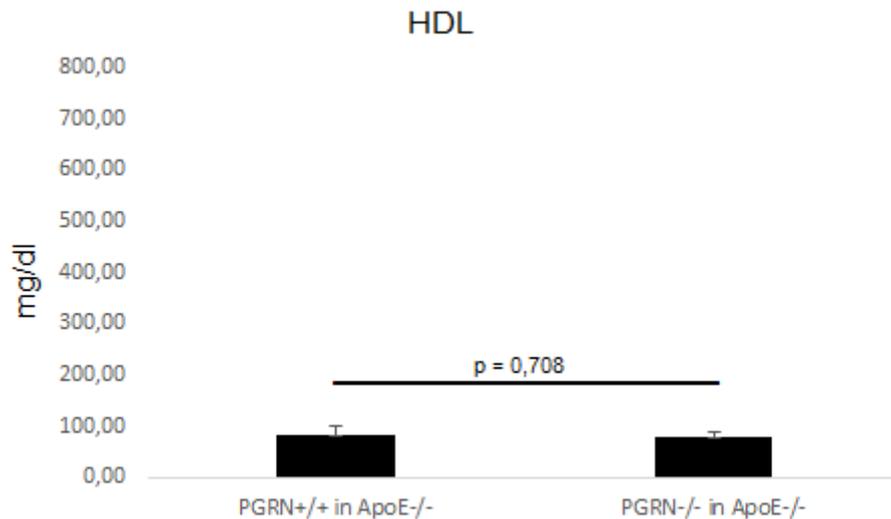


Abbildung 26: HDL-Spiegel: links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 7) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 8), p = 0,708.

4.1.3 HAUTVERÄNDERUNGEN

Die Mäuse aller Versuchsgruppen (PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}, Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}, Knochenmarkchimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}), die für das A. carotis-Mausmodell vorgesehen sind, werden nach Einleitung der Kombinationsnarkose und vor Versuchsbeginn unter Verzicht auf weitergehende Analysen abfotografiert, um möglicherweise auffällige makroskopische, phänotypische Veränderungen, welche gegebenenfalls Ausdruck des Gesundheitszustandes und charakteristisch für den jeweiligen Genotyp sind, zu erfassen.

Wie bereits für das ApoE – defiziente – Mausmodell bekannt [168-170], entwickeln PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Versuchstiere erwartungsgemäß sowie PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Versuchstiere makroskopisch sogar vielleicht in gesteigertem Maße imponierende, progressive Hautveränderungen, die sich auf den entgleisten Lipidstoffwechsel (Dyslipoproteinämie) und die gemeinhin gesteigerte inflammatorische Reaktion zurückführen lassen: es finden sich neben vermehrter trockener Hautschuppung, gesteigertem

Haarausfall (Alopezie) insbesondere von lateraler Gesichts- und ventraler Halspartie, Verdickung und Verhärtung aller Hautschichten einer Pachydermie entsprechend, Weichteilschwellungen durch Dysfunktionalität des lymphatischen Systems auch kleinere und größere Substanzdefekte der Haut unterschiedlichster Lokalisationen (bevorzugt laterale Gesichtsregion, Hals, Nacken, Rücken) im Sinne von Kratzspuren durch den vermehrten Pruritus, Exkoriationen sowie lipomatöse Geschwüre im Bereich des murinen Anus Xanthomen DD Lipomen entsprechend.

Bei den Chimären-Versuchsgruppen PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} lassen sich oben genannte Hautveränderungen nicht dokumentieren. Die einzige Auffälligkeit besteht in der Farbgebung des Mauseffells: hier zeigt sich ein vorzeitiges Ergrauen der Haare.

4.1.4 ROLLE VON LEUKOZYTEN IN DER ATHEROPROGRESSION *IN VIVO*

Unter Verwendung der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie lassen sich Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel im Prozess der Atheroprogression in Echtzeit darstellen und quantifizieren. Untersucht wird in diesem Versuchsmodell die feste Adhäsion von Leukozyten an der inneren Auskleidung der Arteria carotis interna, welche durch parenterale Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange über den zentralvenösen Katheter markiert, und somit visualisiert werden. Ein Vergleich der fest adhären Leukozyten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}, Chimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}, Chimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}) soll aufdecken, ob der Gendefekt, nämlich die Defizienz von Progranulin, zu einer Zunahme der Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand im atherosklerotischen Prozess führt.

Im Wildtyp-Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} werden bei 11 Versuchstieren (6: männlich, 5: weiblich) insgesamt 19 Carotiden analysiert. In der Versuchsgruppe PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} gehen insgesamt 12 Carotiden von 7 Versuchstieren (5: männlich, 2: weiblich) in die Analyse mit ein.

In der Chimären-Versuchsgruppe PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} werden von 10 Versuchstieren (5: männlich, 5: weiblich) insgesamt 15 Carotiden untersucht; in der Chimären-Gruppe PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} wird die

Leukozyteninteraktion mit dem Gefäßendothel an insgesamt 16 Carotiden von 9 Versuchstieren (5: männlich, 4: weiblich) ermittelt.

In einigen Fällen gelingt eine für die intravitalmikroskopische Analyse notwendige Präparation der Arteria carotis communis und seiner Bifurkation in den Versuchsgruppen nicht. Darüber hinaus kommt es bei insgesamt zwei Versuchstieren durch unbeabsichtigte Manipulation am Gefäß bei der Umlagerung zu einer zunehmenden Kontraktion der Arterie. Dadurch erklären sich die obig dargestellten, uneinheitlichen, n-Zahlen der erfolgreich analysierten Carotis-Abschnitte.

In der frühen Phase der Atherosklerose lässt sich bereits bei den PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}- Mäusen sowie bei den PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}- Mäusen jeweils in einem Alter von 16 Wochen (4 Wochen + 12 Wochen HCD) und bei den Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} jeweils in einem Alter von 20 Wochen (4 Wochen + 4 + 12 Wochen HCD) eine Leukozytenadhäsion sowohl an der Prädilektionsstelle für atherosklerotische Plaques, nämlich „bifurkationsnah“, als auch „bifurkationsfern“ in der Arteria carotis communis beobachten, d.h. die weißen Blutkörperchen treten in dauerhaften Kontakt mit dem Gefäßendothel der Arteriae carotides. Bei Aufnahme der Videosequenzen bedecken in der Versuchsgruppe des Wildtyp-Kontrollstamms PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} $1,51 \pm 0,59$ Leukozyten „bifurkationsnah“ und $0,94 \pm 0,48$ Leukozyten „bifurkationsfern“ die Endotheloberfläche, wohingegen in der Versuchsgruppe der PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}- Mäuse $2,25 \pm 0,88$ Leukozyten „bifurkationsnah“ und $1,45 \pm 0,45$ Leukozyten „bifurkationsfern“ am Gefäßendothel fest adhären. Hieraus ist ersichtlich, dass es an der Prädilektionsstelle für Atherosklerose nahe der Carotibifurkation im Vergleich zur weiter proximal gelegenen Arteria carotis communis zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion kommt, und dass das Doppel-Knockout-Tiermodell PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} eine signifikant gesteigerte Leukozytenadhäsion im Vergleich zur Kontrollgruppe PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} sowohl „bifurkationsnah“ ($p = 0,004$) als auch „bifurkationsfern“ ($p = 0,006$) aufweist.

Ähnlich verhält es sich bei den Knochenmarkchimären: hier haften in den Versuchsgruppe PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} $1,49 \pm 0,66$ Leukozyten „bifurkationsnah“ und $1,08 \pm 0,49$ Leukozyten „bifurkationsfern“ fest an der Gefäßoberfläche der Arteria carotis, wohingegen in der Gruppe PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} $1,25 \pm 0,70$

Leukozyten „bifurkationsnah“ und $0,87 \pm 0,74$ Leukozyten „bifurkationsfern“ festen und dauerhaften Kontakt zum Gefäßendothel aufnehmen. Signifikante Unterschiede sind in beiden Versuchsgruppen PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} zwischen der Leukozytenadhäsion an „bifurkationsnahen“ ($p = 0,328$) und vergleichsweise proximal gelegenen, „bifurkationsfernen“ ($p = 0,356$) Carotis-Abschnitten nicht zu verzeichnen.

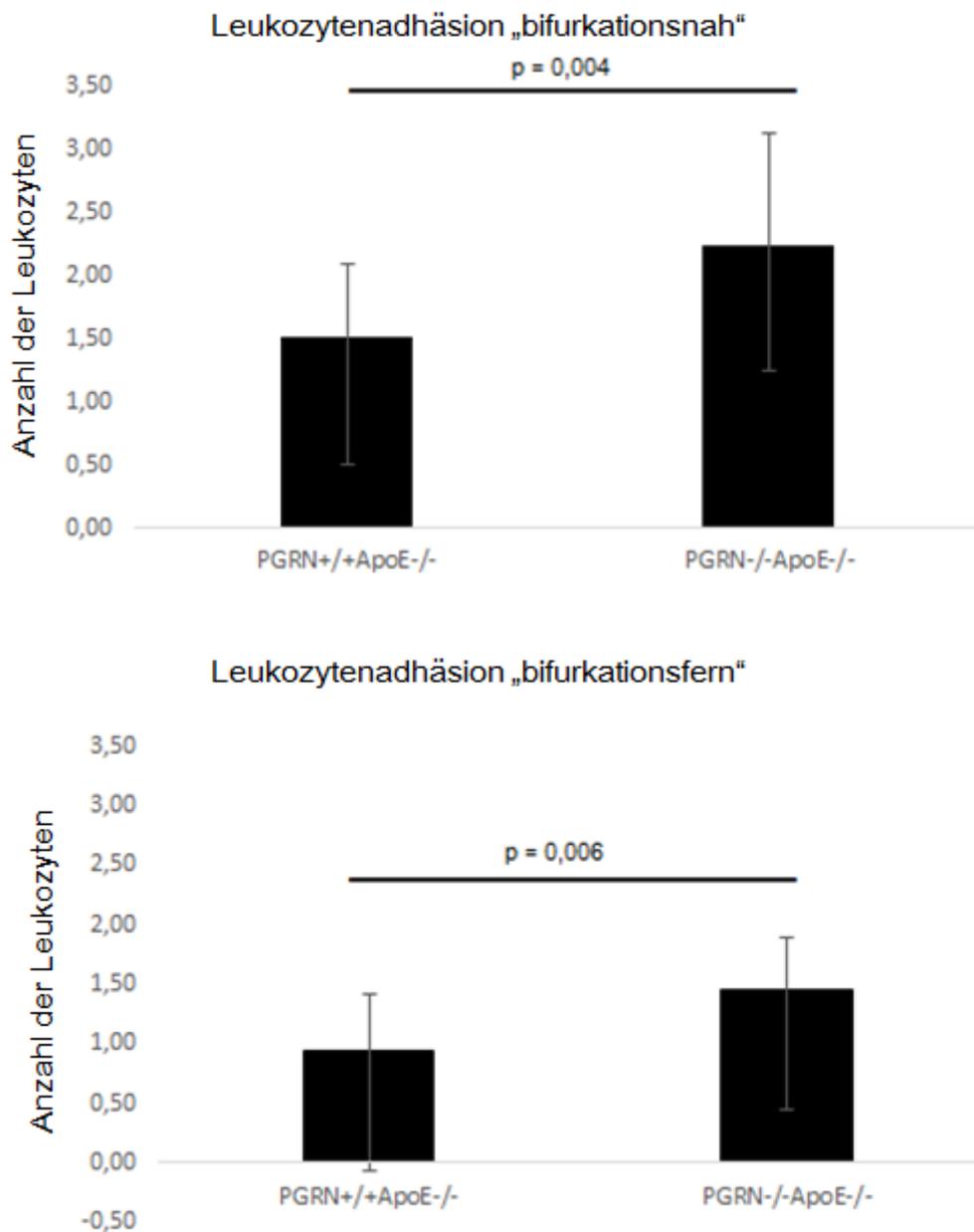


Abbildung 27:

Oben: Leukozytenadhäsion an der Prädilektionsstelle („bifurkationsnah“) für Atherosklerose von links: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen (n = 11, insgesamt 19 Carotiden) vs. rechts: PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Mäusen (n = 7, insgesamt 12 Carotiden) nach insgesamt 12-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät, p = 0,004.

Unten: Leukozytenadhäsion an weiter proximal gelegenen Abschnitten der Arteria carotis communis, somit „bifurkationsfern“ von links: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen (n = 11, insgesamt 19 Carotiden) vs. rechts: PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Mäusen (n = 7, insgesamt 12 Carotiden) nach insgesamt 12-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät, p = 0,006.

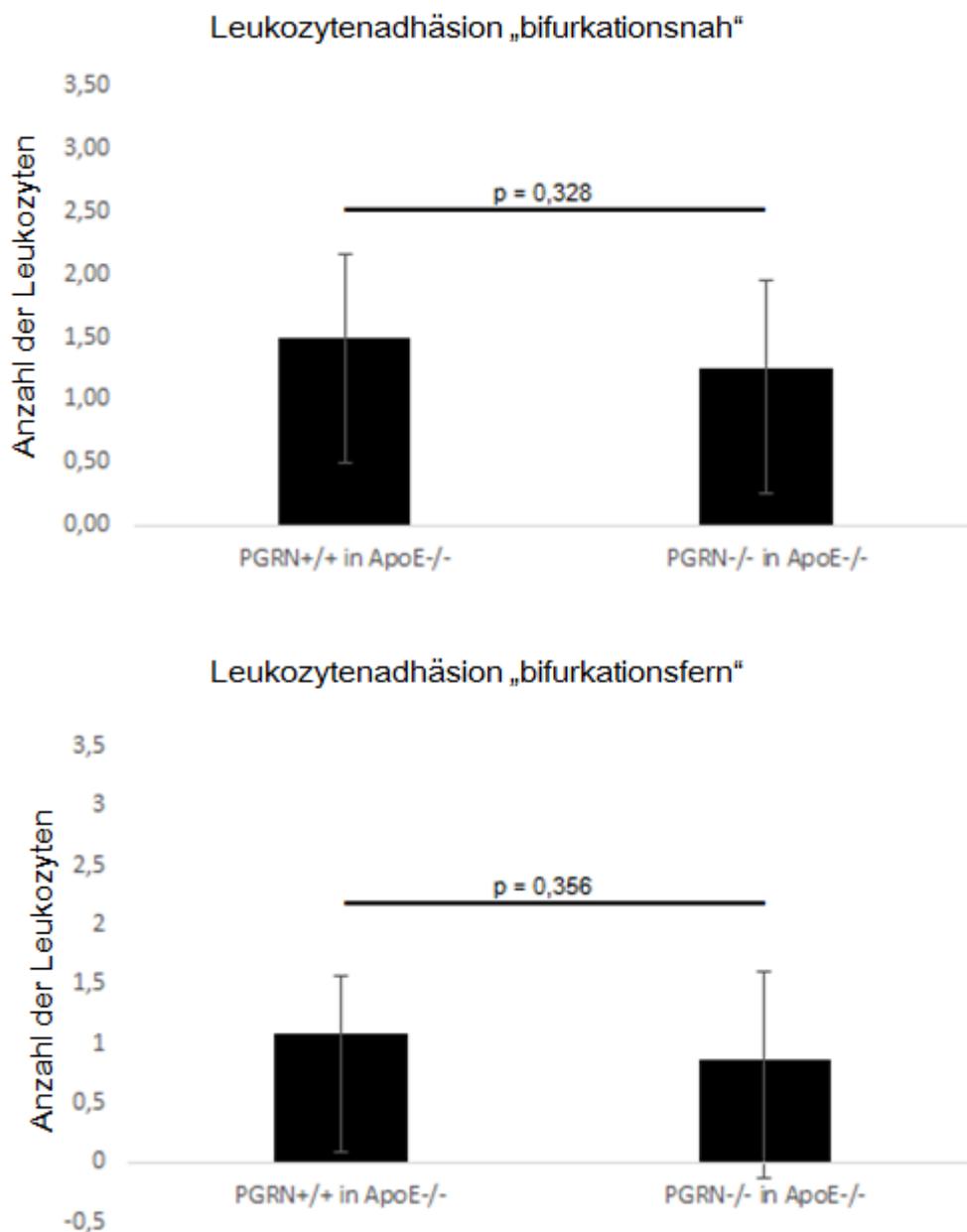


Abbildung 28:

Oben: Leukozytenadhäsion an der Prädilektionsstelle („bifurkationsnah“) für Atherosklerose von Knochenmarkchimären. Links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} - Mäuse (n = 10, insgesamt 15 Carotiden) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} - Mäuse (n = 9, insgesamt 16 Carotiden) nach insgesamt 4+12-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät, p = 0,328.

Unten: Leukozytenadhäsion an weiter proximal gelegenen Abschnitten der Arteria carotis communis, somit „bifurkationsfern“ von Knochenmarkchimären. Links: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} - Mäuse (n = 10, insgesamt 15 Carotiden) vs. rechts: PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} - Mäuse (n = 9, insgesamt 16 Carotiden) nach insgesamt 4+12-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät, p = 0,356.

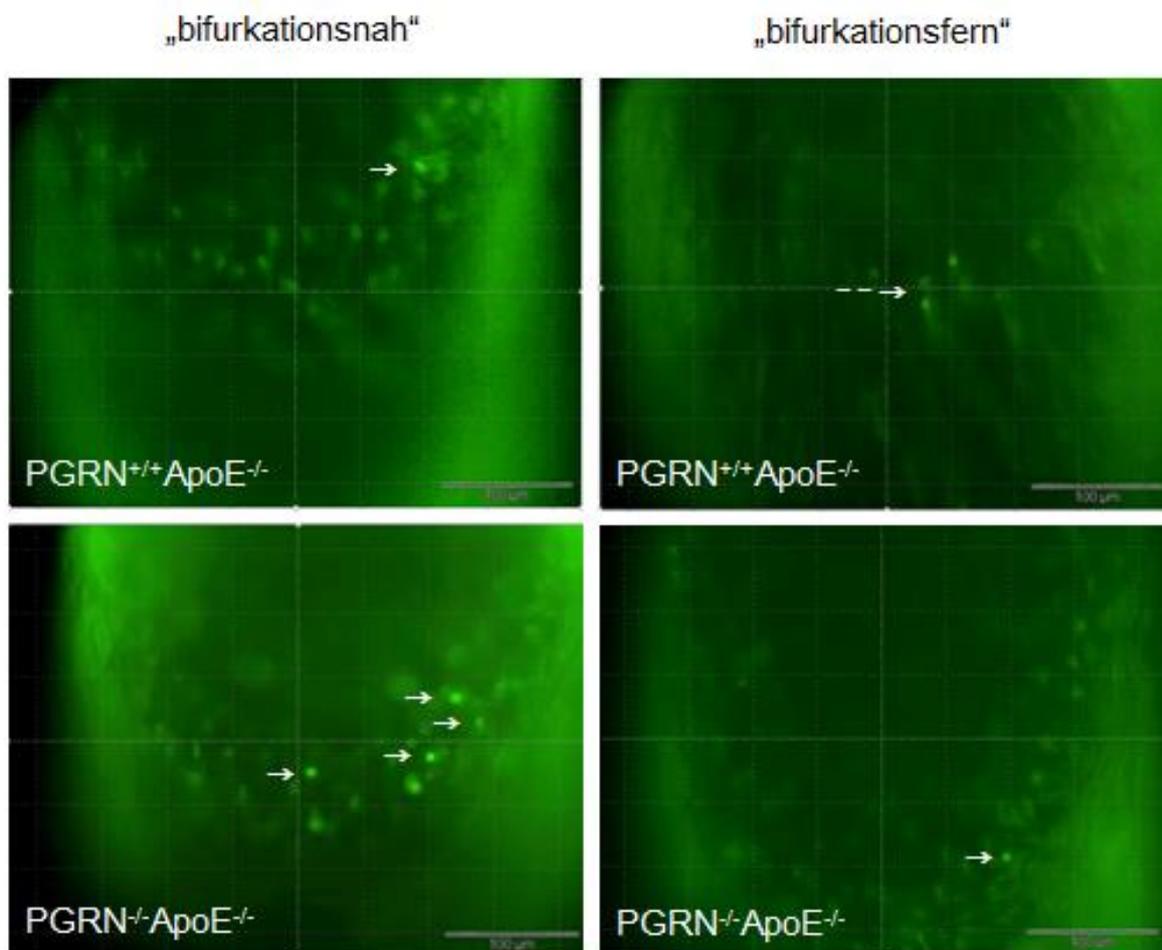


Abbildung 29: Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel von PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen (oben) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Mäusen (unten). Die Pfeile (→) deuten hierbei auf fest am Gefäßendothel adhärente Leukozyten an der Prädilektionsstelle für atherosklerotische Gefäßveränderungen („bifurkationsnah“, links) sowie an der weiter proximal gelegenen Arteria carotis communis („bifurkationsfern“, rechts). Die Videosequenz der PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Maus im bifurkationsfernen Fenster zeigt dagegen ein transient

adhärentes weißes Blutkörperchen (- - →), das sich in der darauffolgenden Videosequenz an dieser Stelle nicht mehr nachweisen lässt.

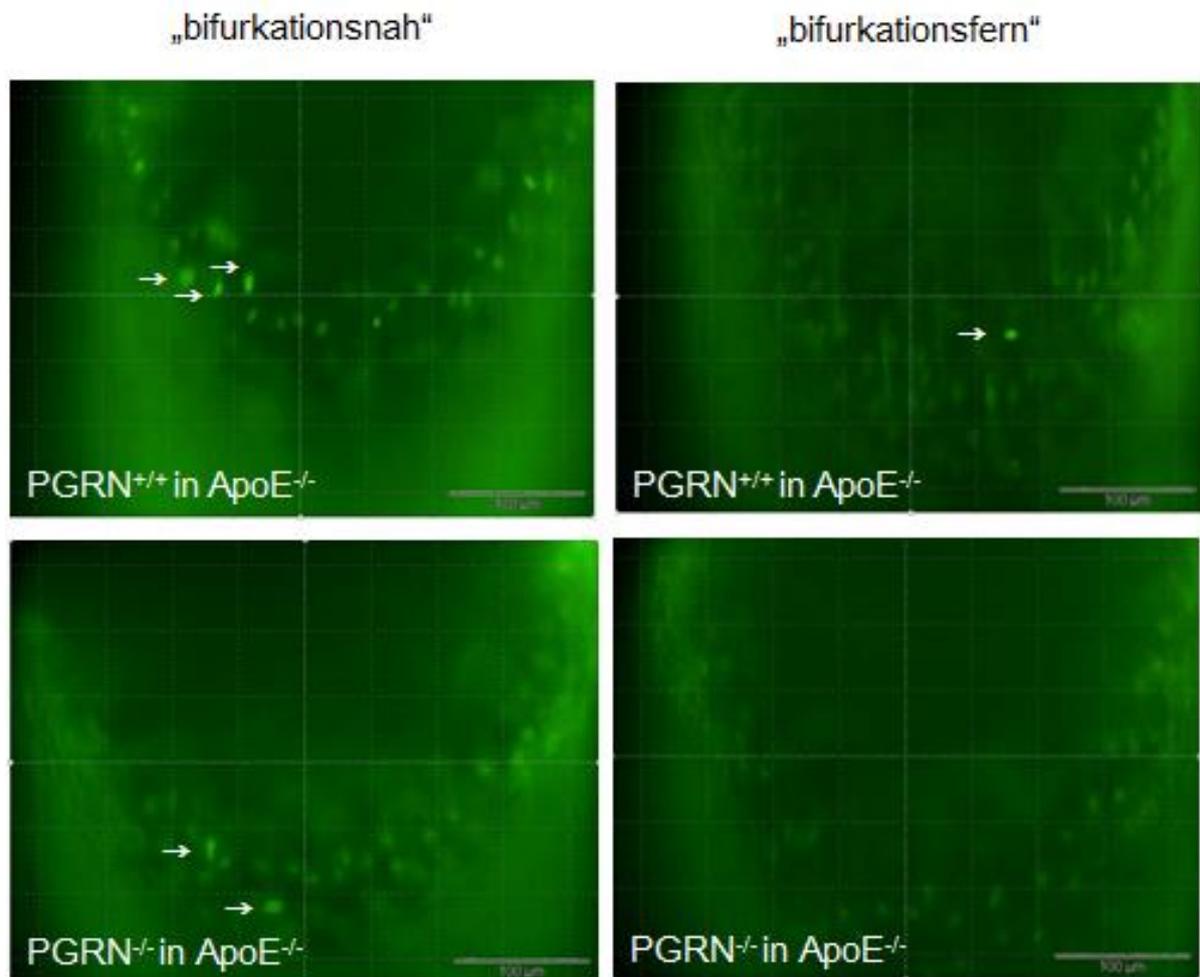


Abbildung 30: Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel von Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (oben) vs. Chimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} (unten). Die Pfeile (→) deuten hierbei auf fest am Gefäßendothel adhärente Leukozyten an der Prädilektionsstelle für atherosklerotische Gefäßveränderungen („bifurkationsnah“, links) sowie an der weiter proximal gelegenen Arteria carotis communis („bifurkationsfern“, rechts).

4.2 ERGEBNISSE DES M. CREMASTER - MAUSMODELLS

4.2.1 QUANTIFIZIERUNG DER DYNAMISCHEN LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION MITTELS „REFLECTED-LIGHT OBLIQUE TRANSILLUMINATION“ (RLOT) – INTRAVITALMIKROSKOPIE AM MODELL DES MURINEN MUSCULUS CREMASTER *IN VIVO*

Die RLOT („Reflected-Light Oblique Transillumination“) - Intravitalmikroskopie ermöglicht eine intravitalmikroskopische *pseudo-dreidimensionale* Echtzeit-Analyse der dynamischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, nämlich Rolling weißer Blutkörperchen am Gefäßendothel, feste Leukozytenadhäsion und eine konsekutive gerichtete transendotheliale Transmigration von Leukozyten in das Interstitium als Reaktion auf einen TNF- α getriggerten inflammatorischen Stimulus. Durch Einsatz eines spiegelnden Reflektors unter dem zu untersuchenden Gewebe (hier: muriner Musculus cremaster) und durch dessen sukzessiv gesteigerte Neigung gewinnen die intravitalmikroskopischen Echtzeit-Aufnahmen durch unterschiedlich starke Schattierungen an Plastizität, und machen ein frühes Visualisieren oben genannter zellulärer Vorgänge möglich.

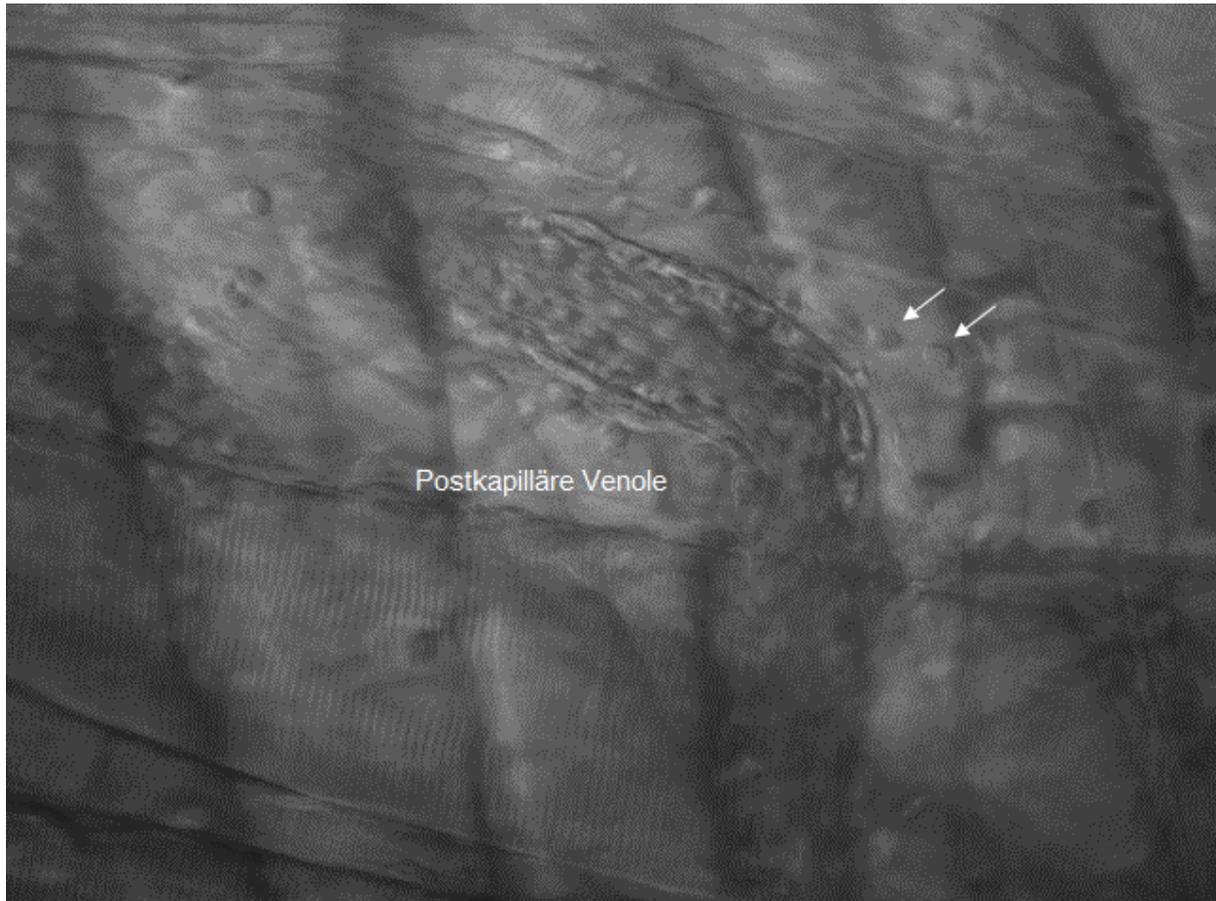


Abbildung 31: *Pseudo-dreidimensionale* Darstellung einer postkapillären Venole eines ungefähren Gefäßdurchmessers von 29 μm mittels RLOT-Intravitalmikroskopie bei 20x - Objektivvergrößerung. Intravasal lassen sich neben rollenden Leukozyten mehrere fest adhärenente Leukozyten identifizieren. Darüber hinaus zeigen sich vereinzelt ins Interstitium transmigierte Leukozyten (Pfeil \rightarrow), hier als Reaktion auf einen TNF- α getriggerten inflammatorischen Stimulus.

Die dynamische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wird am murinen Musculus cremaster an zwei männlichen Versuchsgruppen mittels „Reflected-Light Oblique Transillumination“ (RLOT) – Intravitalmikroskopie nach Applikation von TNF- α in einer Konzentration von 300ng/350 μL zur Simulierung eines Entzündungsgeschehens visualisiert und analysiert. Als Kontrollgruppe dient der Wildtyp-Stamm PGRN^{+/+} auf einem C57Bl6/J-Hintergrund (n = 8). Die Versuchsgruppe bildet die Progranulin-defiziente Maus PGRN^{-/-} (n = 7).

4.2.1.1 GESAMTLEUKOZYTENZAHL IM BLUT

Nach Abschluss des Versuches erfolgt eine Blutentnahme zur Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl, um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Versuchsgruppen sicherstellen zu können. Die Kontrollgruppe PGRN^{+/+} weist im Mittel eine Gesamtleukozytenzahl von $4,89 \pm 0,87 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Anzahl der Versuchstiere: $n = 6$) auf. In der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} lässt sich eine Gesamtleukozytenzahl von $5,22 \pm 1,68 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Anzahl der Versuchstiere: $n = 5$) quantifizieren. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der systemischen Leukozytenzahl im Blut ($p = 0,684$).

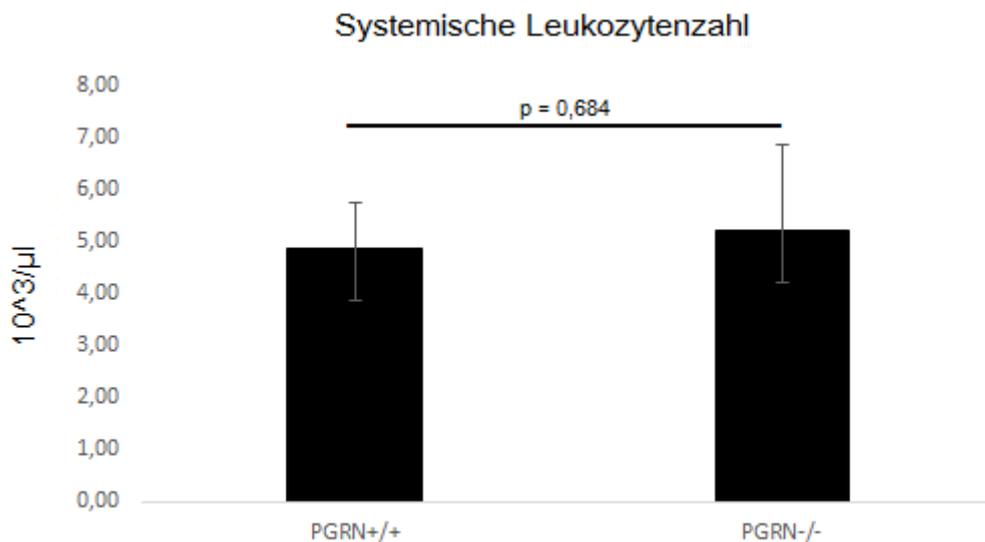


Abbildung 32: Leukozytenbestimmung im venösen Blut: links: Kontrollgruppe PGRN^{+/+} ($n = 6$) und rechts: Versuchsgruppe PGRN^{-/-} ($n = 5$), $p = 0,684$.

4.2.1.2 GEFÄßDURCHMESSER

Pro Versuchstier wird die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} an $6,75 \pm 1,16$, in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} an $6,71 \pm 3,40$ postkapillären Venolen untersucht. Um eine Vergleichbarkeit zwischen beiden Versuchsgruppen zu gewährleisten, und um valide und verlässliche

Aussagen über das Leukozyten-Verhalten zu erhalten, werden für die Auswertung postkapilläre Venolen eines mittleren Gefäßdurchmessers von $28,02 \pm 7,19 \mu\text{m}$ (Gefäßdurchmesser_{min}: $16,92 \mu\text{m}$, Gefäßdurchmesser_{max}: $47,70 \mu\text{m}$) ohne relevante Gefäßverzweigungen selektioniert. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Gefäßdurchmesser der analysierten postkapillären Venolen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ($p = 0,238$): die Kontrollgruppe PGRN^{+/+} weist einen mittleren Gefäßdurchmesser von $28,81 \pm 7,89 \mu\text{m}$, die Versuchsgruppe PGRN^{-/-} einen mittleren Gefäßdurchmesser von $27,11 \pm 6,25 \mu\text{m}$ auf.

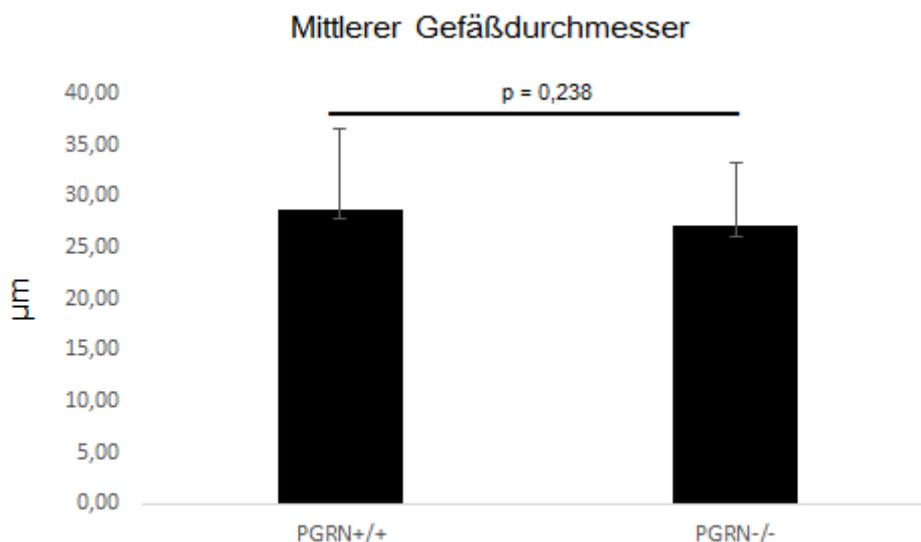


Abbildung 33: Mittlerer Gefäßdurchmesser der postkapillären Venolen des murinen Musculus cremaster: links: Kontrollgruppe PGRN^{+/+}: $28,81 \pm 7,89 \mu\text{m}$, rechts: Versuchsgruppe PGRN^{-/-}: $27,11 \pm 6,25 \mu\text{m}$, $p = 0,238$.

4.2.1.3 ANTEIL FEST ADHÄRENTER LEUKOZYTEN

Die Anzahl fest adhärenter weißer Blutkörperchen 4 Stunden nach intraskrotaler Injektion von TNF- α in einer Konzentration von $300\text{ng}/350 \mu\text{L}$ wird in den Videoaufnahmen an einem Auswertungsfenster

der Größe 100 μm x Gefäßdurchmesser quantifiziert und zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen extrapoliert zur Zahl fest adhärenter Leukozyten pro 100 μm^2 Gefäßfläche.

Die Anzahl der fest adhärenter Leukozyten in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} beträgt im initialen Auswertungsfenster (100 μm x Gefäßdurchmesser) $5,90 \pm 2,09$ (Anzahl der Versuchstiere: n = 8); in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} nehmen die fest adhärenter Leukozyten einen Wert von $8,92 \pm 2,60$ (Anzahl der Versuchstiere: n = 7) an. Da nachfolgend eine statistische Hochrechnung der Daten zur besseren Komparabilität durchgeführt wird, wird in diesem Zusammenhang auf eine Signifikanzprüfung verzichtet.

Nach Anwendung der Extrapolation finden sich damit pro 100 μm^2 Gefäßfläche in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} $21,73 \pm 7,89$ und in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} $35,18 \pm 12,18$ fest am Gefäßendothel adhärenter Leukozyten ($p = 0,023$).

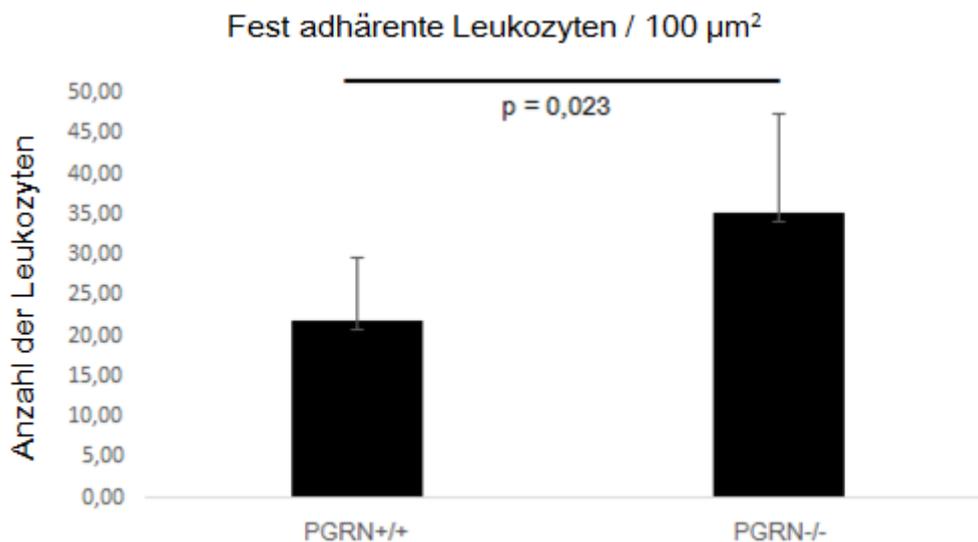


Abbildung 34:

Anzahl der fest adhärenter Leukozyten pro 100 μm^2 Gefäßfläche: links: Kontrollgruppe PGRN^{+/+}: $21,73 \pm 7,89$ (n = 8), rechts: Versuchsgruppe PGRN^{-/-}: $35,18 \pm 12,18$ (n = 7), $p = 0,023$.

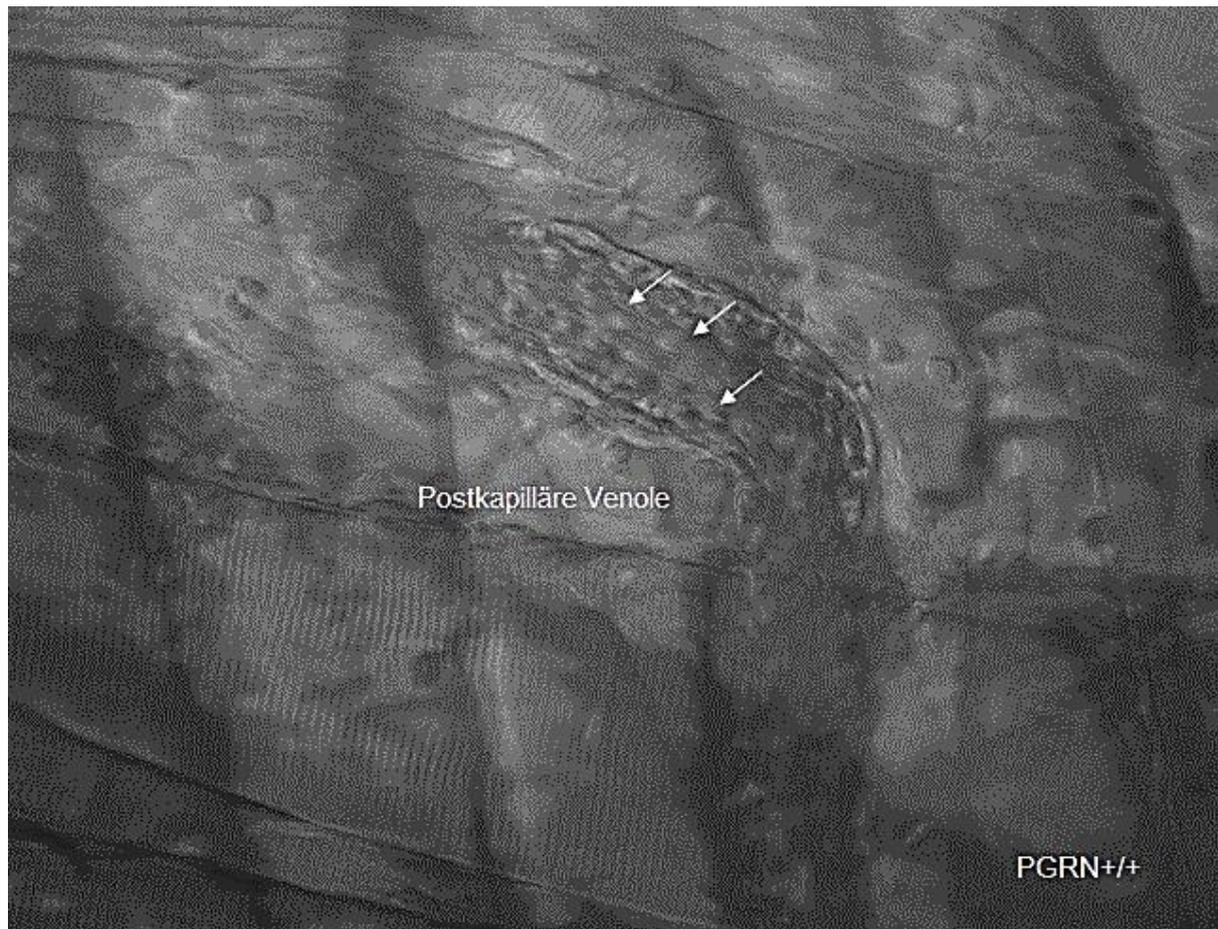


Abbildung 35: Fest adhärenente Leukozyten (Pfeil →) am Gefäßendothel einer postkapillären Venole einer PGRN^{+/+} - Maus.

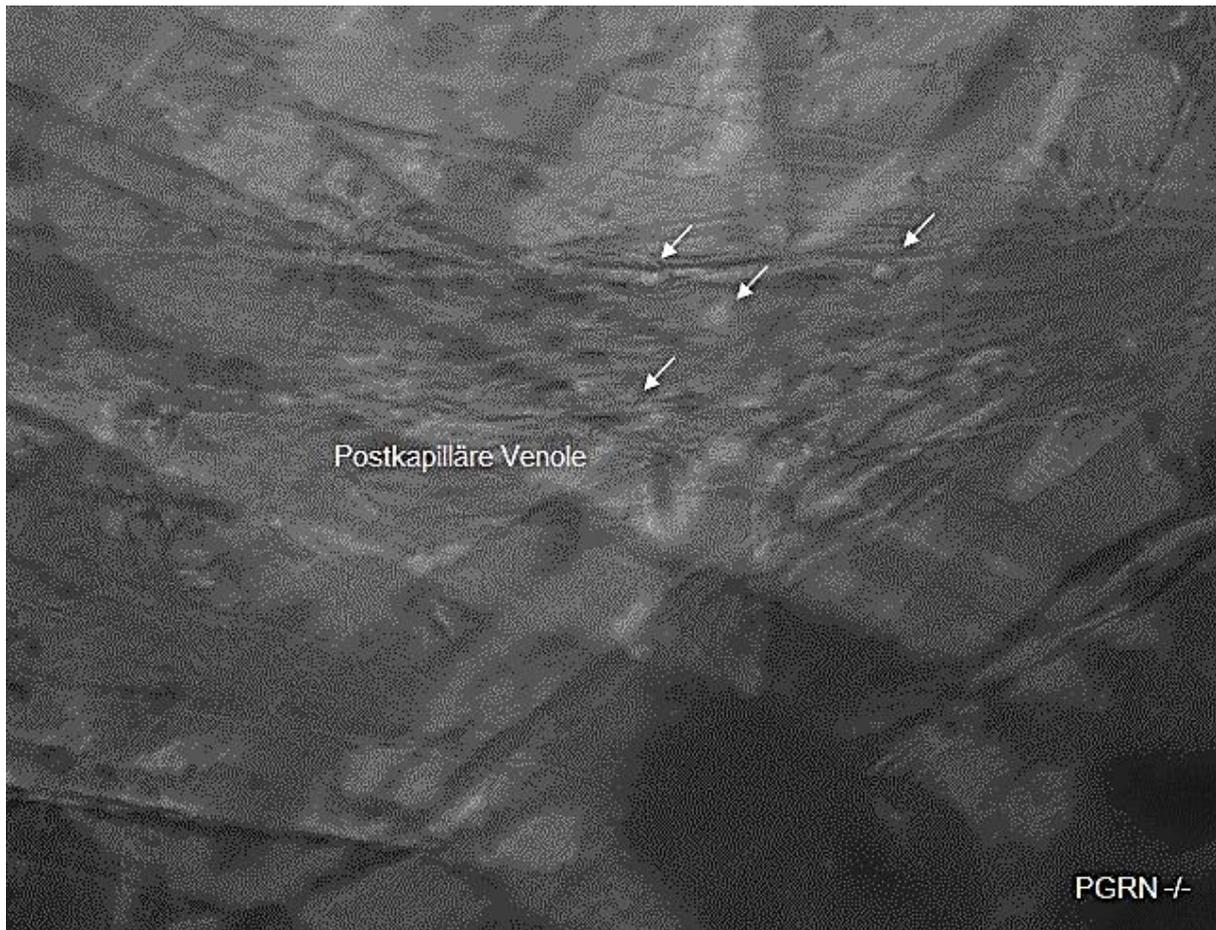


Abbildung 36: Fest adhärenente Leukozyten (Pfeil →) am Gefäßendothel einer postkapillären Venole einer PGRN^{-/-} - Maus.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Leukozytenadhäsion in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} im Gegensatz zur Kontrollgruppe PGRN^{+/+} signifikant gesteigert ist ($p = 0,023$).

4.2.1.4 ANTEIL ROLLENDER LEUKOZYTEN

Um die Anzahl der rollenden Leukozyten 4 Stunden nach intraskrotaler Injektion von TNF- α in einer Konzentration von 300ng/350 μ L zu quantifizieren, wird entsprechend dem Prinzip zur Auswertung der fest adhärenenten Leukozyten verfahren. Die rollenden Leukozyten werden zunächst in einem Auswertungsfenster der Größe 100 μ m x Gefäßdurchmesser ausgezählt, und später ebenfalls zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen extrapoliert zur Zahl rollender Leukozyten pro 100 μ m² Gefäßfläche.

Die Anzahl der rollenden Leukozyten im initialen Auswertungsfenster (100 μm x Gefäßdurchmesser) beträgt in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} $3,85 \pm 3,57$ (Anzahl der Versuchstiere: n = 7) und in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} $4,15 \pm 3,62$ (Anzahl der Versuchstiere: n = 6). Da nachfolgend ebenfalls eine statistische Hochrechnung der Daten zur besseren Komparabilität durchgeführt wird, wird auch hier auf eine Signifikanzprüfung verzichtet.

Nach Anwendung der Extrapolation ergeben sich somit pro 100 μm^2 Gefäßfläche in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} $13,77 \pm 11,18$ rollende Leukozyten und in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} $15,39 \pm 12,93$ rollende weiße Blutkörperchen ($p = 0,813$).

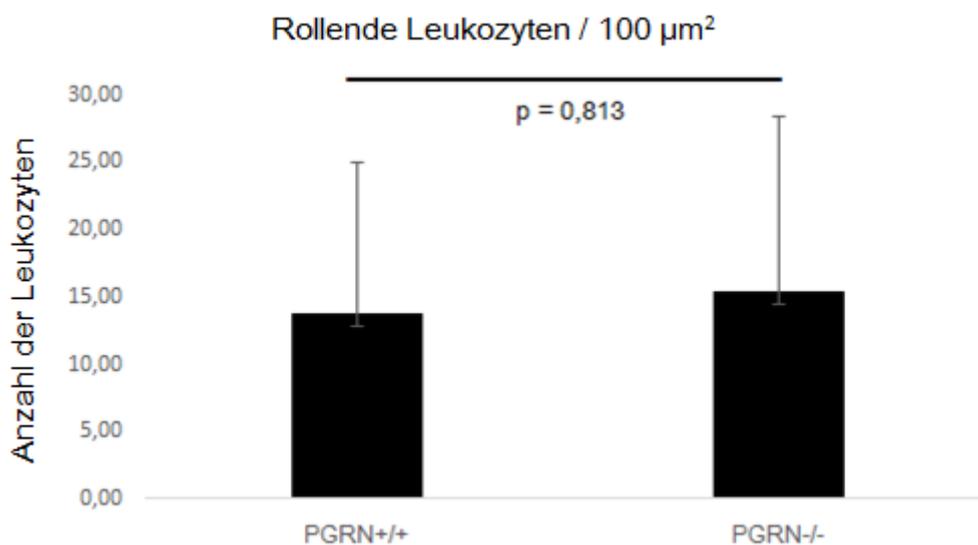


Abbildung 37:

Anzahl der rollenden Leukozyten pro 100 μm^2 Gefäßfläche: links: Kontrollgruppe PGRN^{+/+}: $13,77 \pm 11,18$ (n = 7), rechts: Versuchsgruppe PGRN^{-/-}: $15,39 \pm 12,93$ (n = 6), $p = 0,813$.

Zusammenfassend zeigt sich in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} eine Tendenz zum gesteigerten Leukozyten-Rolling; signifikante Unterschiede finden sich allerdings nicht ($p = 0,813$).

4.2.1.5 ANZAHL TRANSMIGRIERTER LEUKOZYTEN

Die Anzahl der transendothelial migrierten Leukozyten wird 4 Stunden nach intraskrotaler Injektion von TNF- α in einer Konzentration von 300ng/350 μ L in sogenannten „ROIs“ („regions of interests), welche an beide Seiten der Gefäßwand der postkapilläre Venole angrenzen, bestimmt. Die Messfelder einer solchen „ROI“ weisen eine Fläche von 100x50 μ m auf.

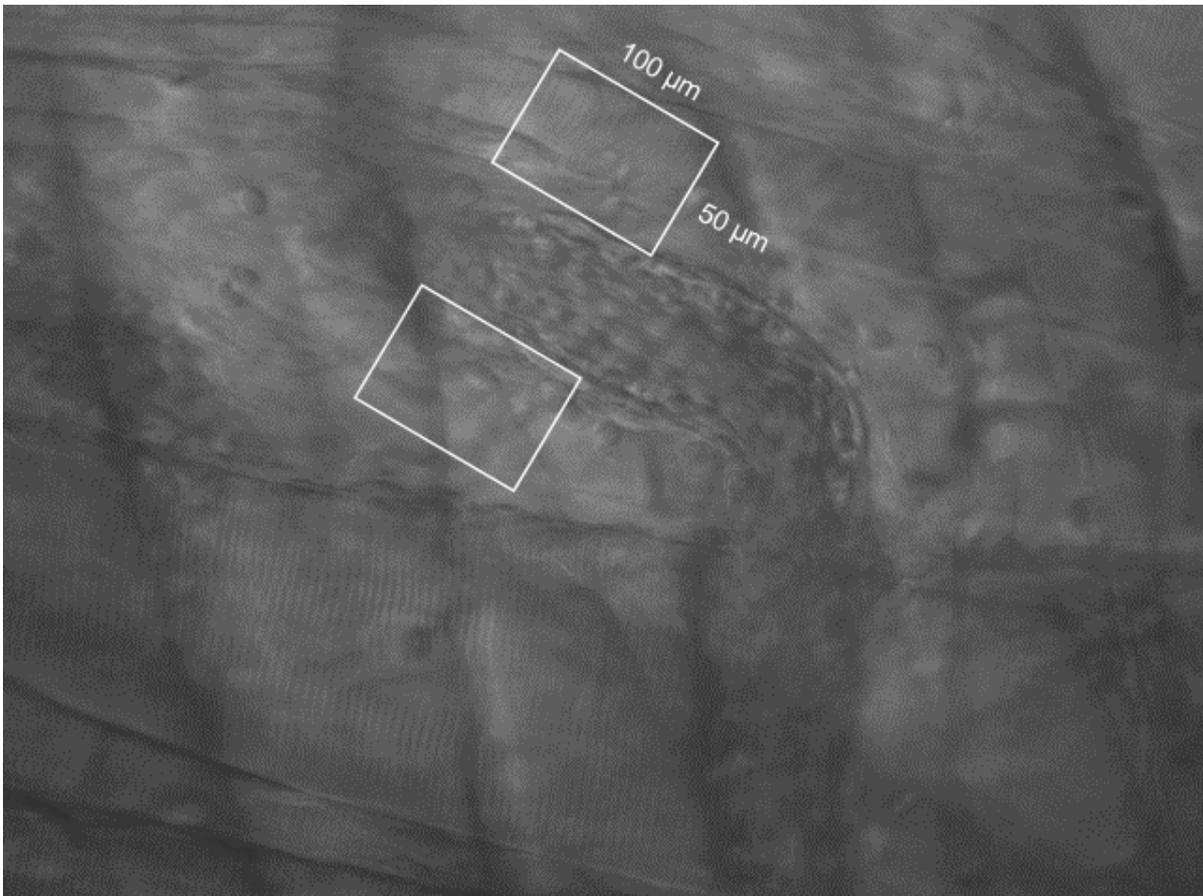


Abbildung 38: Auswertungsfenster („ROI“ – „region of interest“) der Größe 100 x 50 μ m zur Quantifizierung der transendothelial transmigrierten Leukozyten. Diese „ROI“ grenzt von beiden Seiten an die Gefäßwand der postkapillären Venole an.

Unter sogenannten „Baseline-Bedingungen“ ohne vorherige intraskrotale Injektion von Tumornekrosefaktor-alpha finden sich sowohl in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} (n = 1) als auch in der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} (n = 1) nur sehr vereinzelt transendothelial transmigierte Leukozyten im Interstitium (Leukozyten PGRN^{+/+}: 2,25 vs. Leukozyten PGRN^{-/-}: 1,71).

Durch Applikation von TNF- α in das Skrotum der Maus wird ein inflammatorischer Stimulus induziert, welcher sich durch gesteigerte transendotheliale Transmigration der Leukozyten durch das Gefäßendothel äußert. Die Anzahl der transendothelial emigrierten Leukozyten lässt sich in der Kontrollgruppe PGRN^{+/+} (Anzahl der Versuchstiere: n = 8) im Mittel mit $4,70 \pm 2,00$ beziffern. In der Versuchsgruppe PGRN^{-/-} (Anzahl der Versuchstiere: n = 7) ist dagegen noch eine weitere Zunahme der transmigrierten weißen Blutkörperchen zu verzeichnen. Hier finden sich durchschnittlich $5,62 \pm 2,11$ Leukozyten im Interstitium.

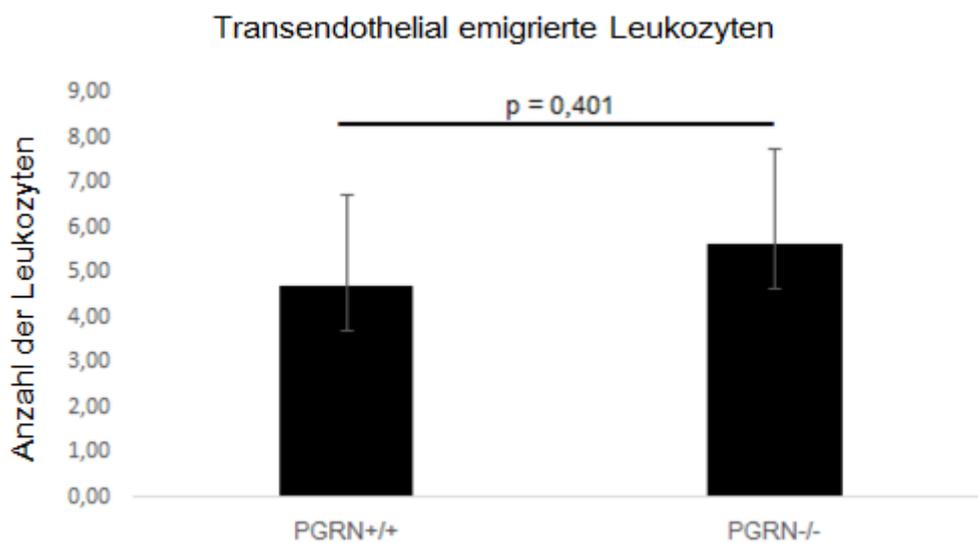


Abbildung 39: Anzahl der transendothelial transmigrierten Leukozyten: links: Kontrollgruppe PGRN^{+/+}: $4,70 \pm 2,00$ (n = 8) und rechts: Versuchsgruppe PGRN^{-/-}: $5,62 \pm 2,11$ (n = 7), p = 0,401.

Durch Verabreichung von TNF- α kommt es zwar im Vergleich zur unbehandelten Kohorte zu einer vermehrten Transmigration der Leukozyten, statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe sind jedoch nicht zu verzeichnen ($p = 0,401$).

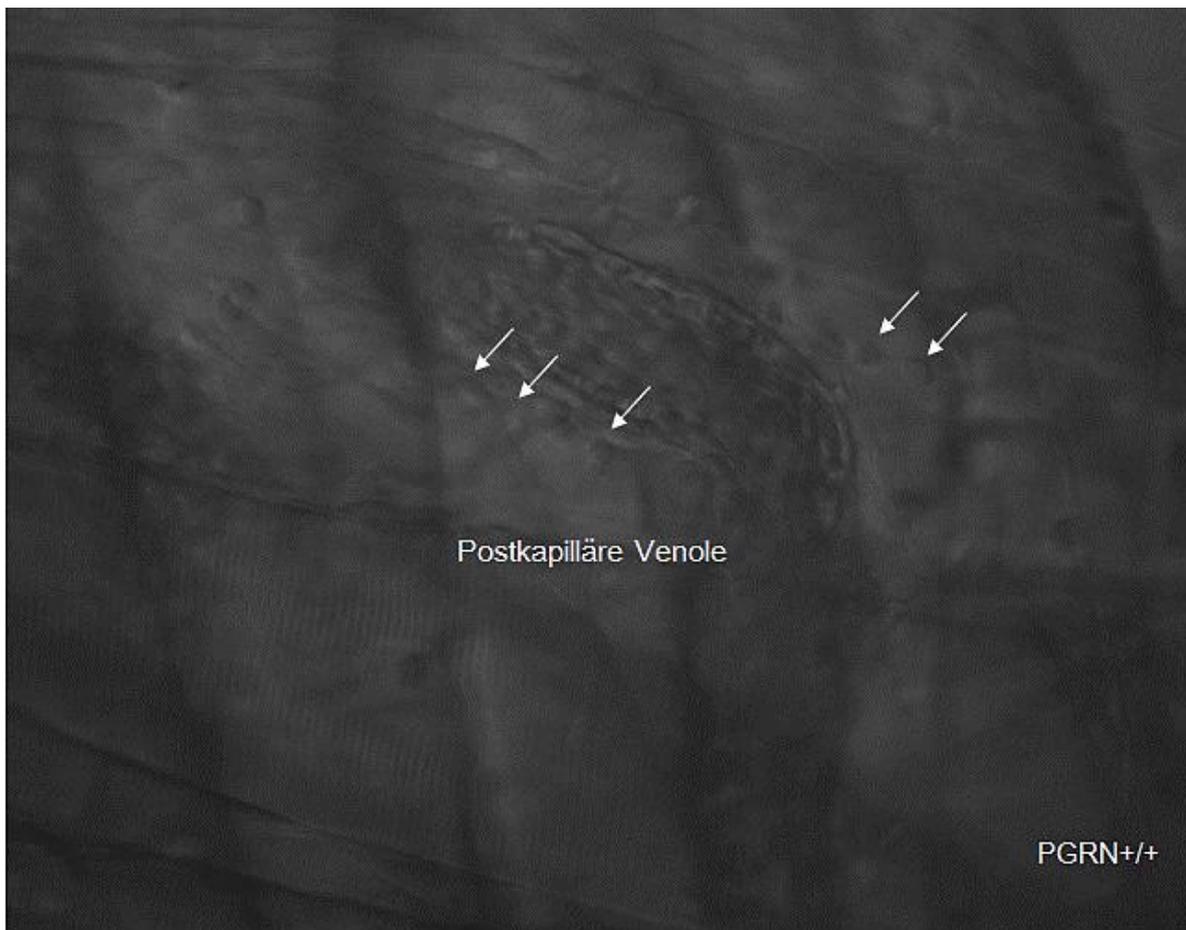


Abbildung 40: Transendothelial emigrierte Leukozyten (Pfeil →) der Kontrollgruppe PGRN^{+/+}.

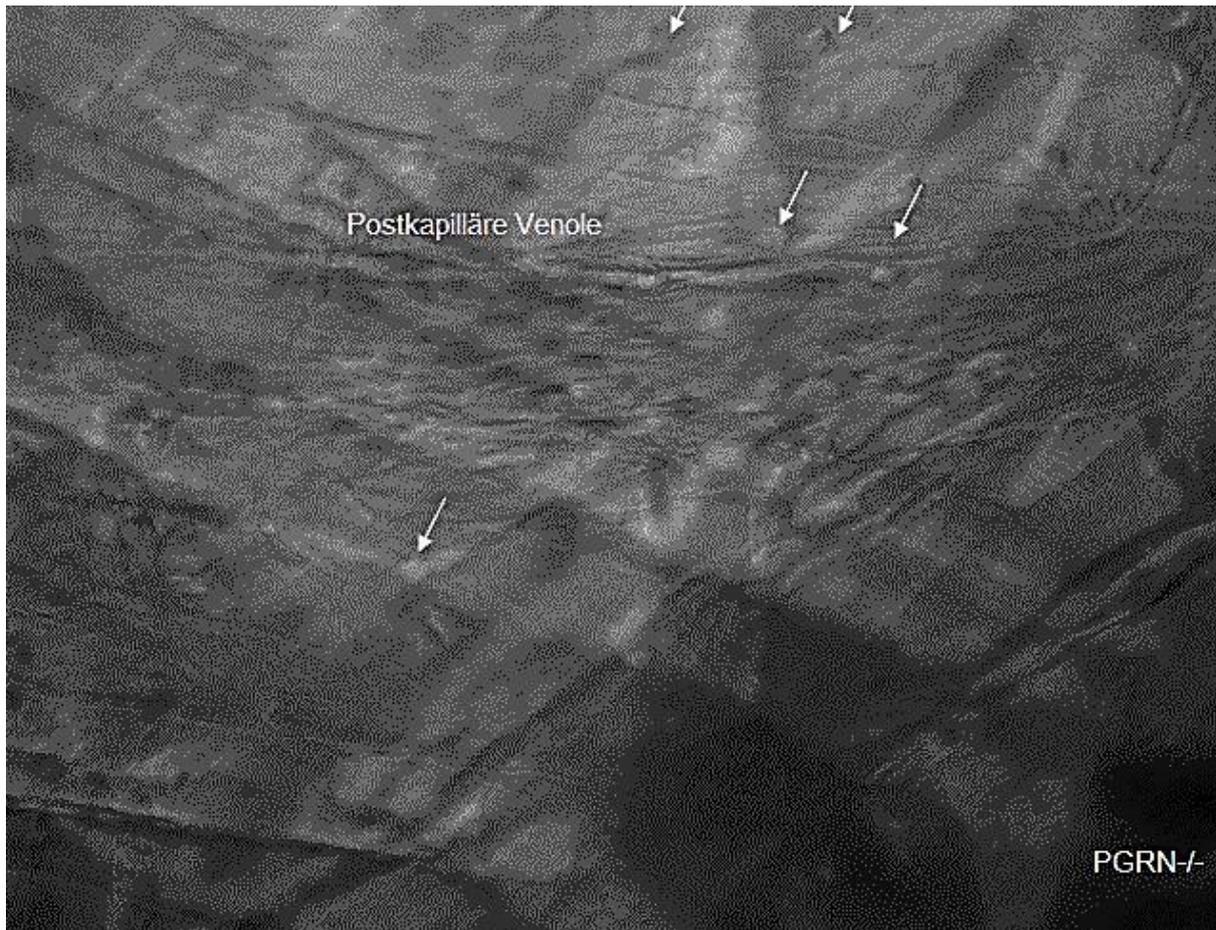


Abbildung 41: Transendothelial emigrierte Leukozyten (Pfeil →) der Versuchsgruppe PGRN^{-/-}.

4.3 ERGEBNISSE HISTOPATHOLOGISCHER UNTERSUCHUNGEN

4.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER ORGANISCHEN VERÄNDERUNGEN – HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE AN PARAFFINSCHNITTEN

Verschiedene Organe von Kontroll - (PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}, Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}) - und Versuchsgruppe (PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}, Knochenmarkchimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}) werden nach Abschluss der Intravitalmikroskopie für weiterführende histopathologische Untersuchungen entnommen, fixiert, im Verlauf verschiedenen Färbeprotokollen zugeführt, und näher untersucht.

Zur Erfassung des Ausprägungsgrades der atherosklerotischen Veränderungen wird in der vorliegenden Arbeit die Arteria carotis, welche auch bereits für die intravitalmikroskopischen

Untersuchungen dient, ausgewählt. Bereits makroskopisch lässt sich durch simple Aufsicht die charakteristische Plaquebildung, welche als weiß bis weißgelber Herd imponiert, an der Prädilektionsstelle für atherosklerotische Gefäßwandveränderungen, nämlich an der Bifurkation vor Aufteilung der Arteria carotis communis in die Arteria carotis externa und interna, erkennen. Ansonsten erweisen sich die Gefäße - soweit makroskopisch beurteilbar - als unauffällig.

Die weiterführenden histopathologischen Untersuchungen erfolgen an Gefäßquerschnitten der Arteria carotis einer Dicke von 1-2 µm, die einen definierten Abstand von jeweils ca. 20 µm aufweisen. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Elastika-van-Gieson (kurz: EvG)- und der Hämatoxylin-Eosin (kurz: HE) -gefärbten seriellen Schnittpräparate in einer 10x-Objektivvergrößerung zeigt sich neben der bereits makroskopisch sichtbaren typischen Lokalisation die für die Atherosklerose typische Histologie: sowohl in der Arteria carotis externa und interna als auch weiter proximal gelegen in der Carotisbifurkation erhebt sich jeweils eine mehr oder weniger stark ausgeprägte atheromatöse Plaque fokal über die normale innerste Gefäßwandschicht, die Intima. Diese Plaque setzt sich größtenteils aus einem zentralen Lipidkern (Akkumulation von aus dem Blut eingedrungenen Lipiden (LDL, Cholesterin, Cholesterinester)) und fettbeladenen Makrophagen, Monozyten, glatten Muskelzellen und Immunzellen zusammen, welche proliferieren und eine extrazelluläre Bindegewebsmatrix bestehend aus Kollagen, elastischen Fasern und unter anderem Proteoglykanen bilden (Abbildung 42, 43, 44). An der Oberfläche der atherosklerotischen Plaque beginnt sich eine fibröse Kappe zu bilden.

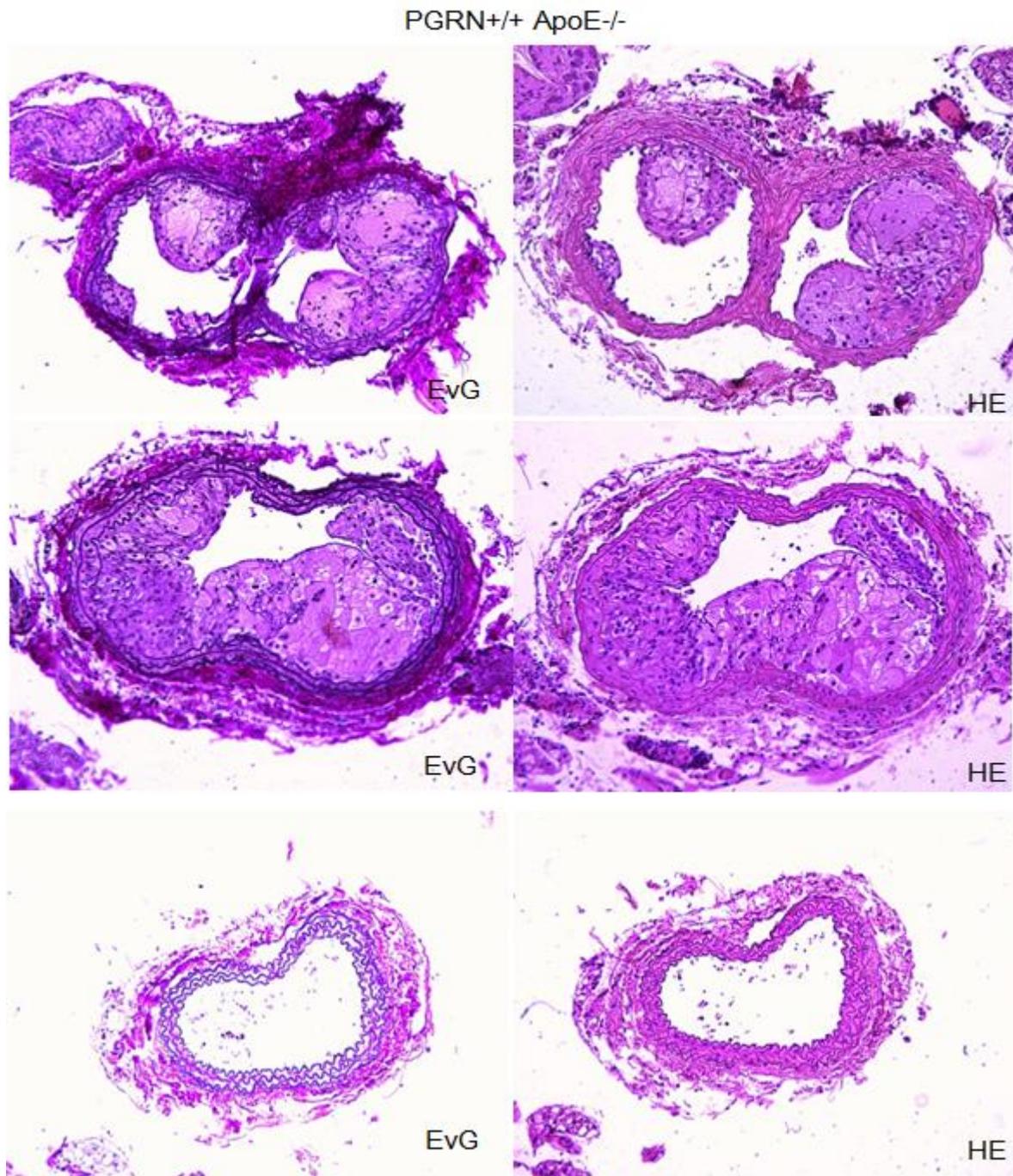


Abbildung 42: Ausprägungsgrad atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen an der Arteria carotis distal der Carotisbifurkation (oben), auf Höhe der Bifurkation (mittig) und proximal der Carotisbifurkation in der Arteria carotis communis (unten) - lichtmikroskopische Sicht (10x-Objektivvergrößerung) eines Querschnitts der Arteria carotis interna von Kontrollgruppe PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} in einem Alter von 16 Wochen nach 12-wöchiger cholesterinreicher Diät in Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG) versus Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).

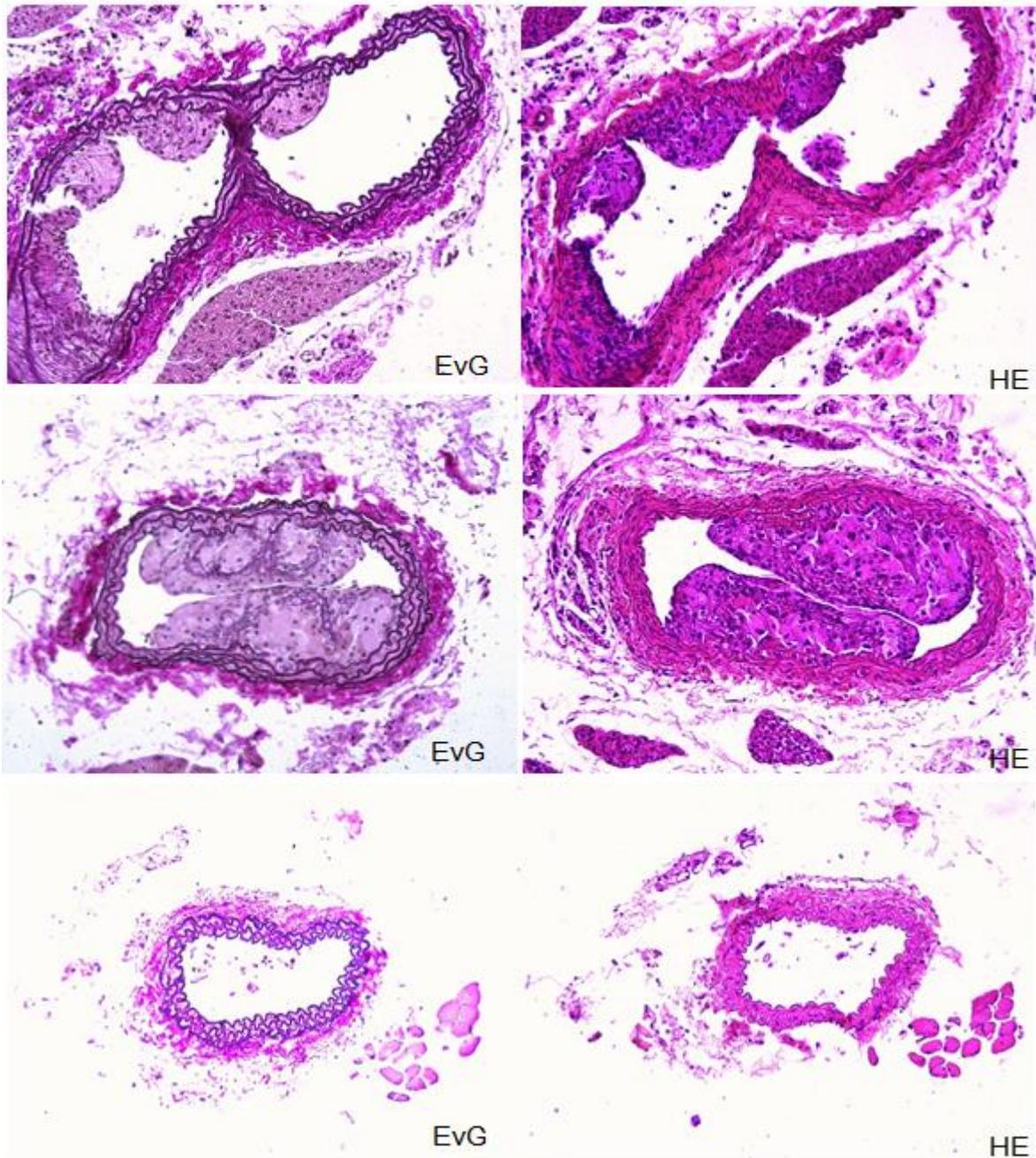
PGRN^{-/-} ApoE^{-/-}

Abbildung 43: Ausprägungsgrad atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen an der Arteria carotis distal der Carotidbifurkation (oben), auf Höhe der Bifurkation (mittig) und proximal der Carotidbifurkation in der Arteria carotis communis (unten) - lichtmikroskopische Sicht (10x-Objektivvergrößerung) eines Querschnitts der Arteria carotis interna von Versuchsgruppe PGRN^{-/-} ApoE^{-/-} in einem Alter von 16 Wochen nach 12-wöchiger cholesterinreicher Diät in Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG) versus Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).

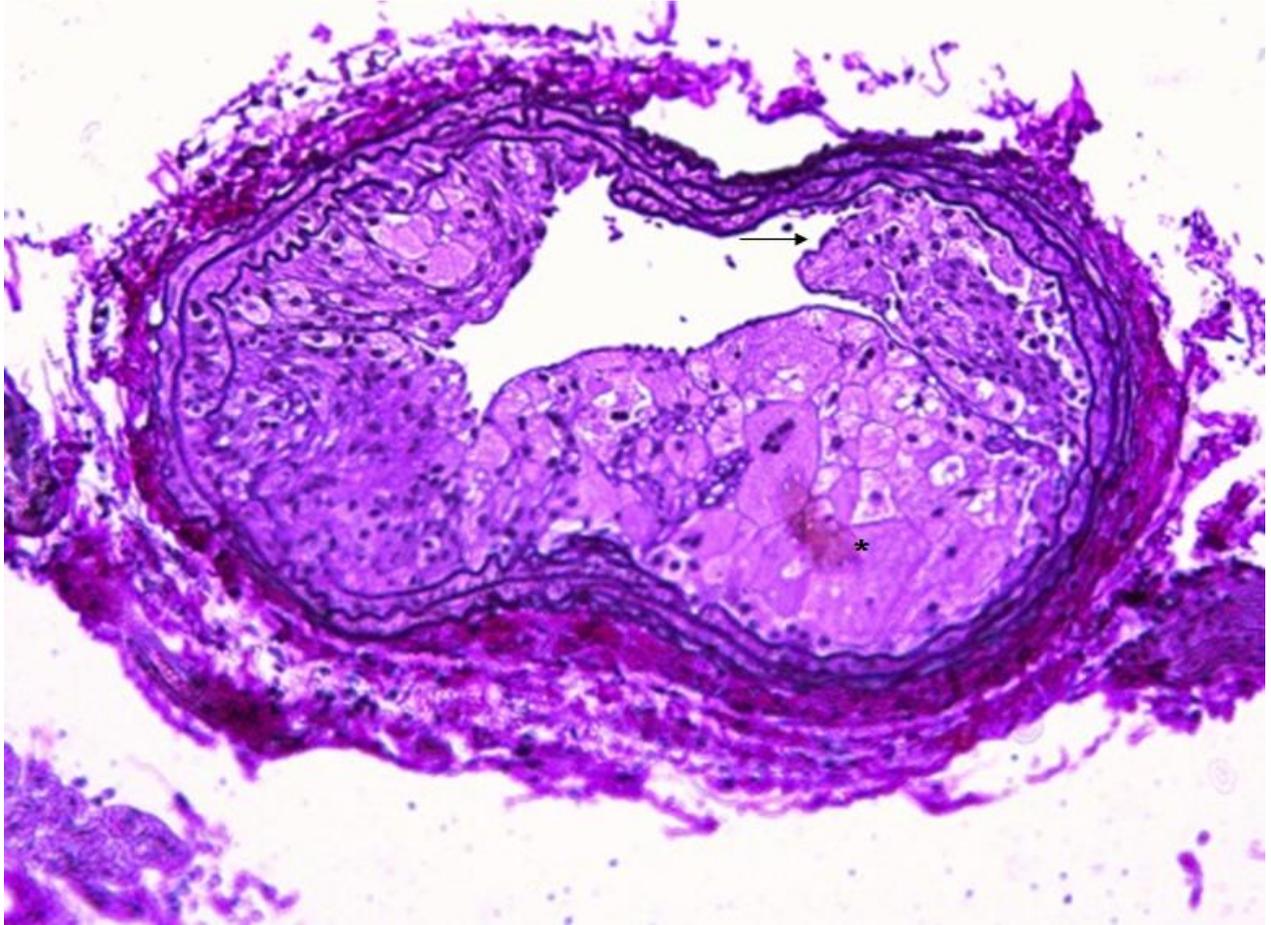


Abbildung 44: Atheromatöse Plaque (EvG) bestehend aus zentralem Lipidkern (*), Makrophagen, welche Fett in zytoplasmatischen Vakuolen speichern („Schaumzellen“), Monozyten, glatten Muskelzellen und Immunzellen. Ausgehend von der sogenannten „Schulterregion“ beginnt sich eine fibröse Kappe (→) auszubilden.

4.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER ORGANISCHEN VERÄNDERUNGEN – HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE AN GEFRIERSCHNITTEN

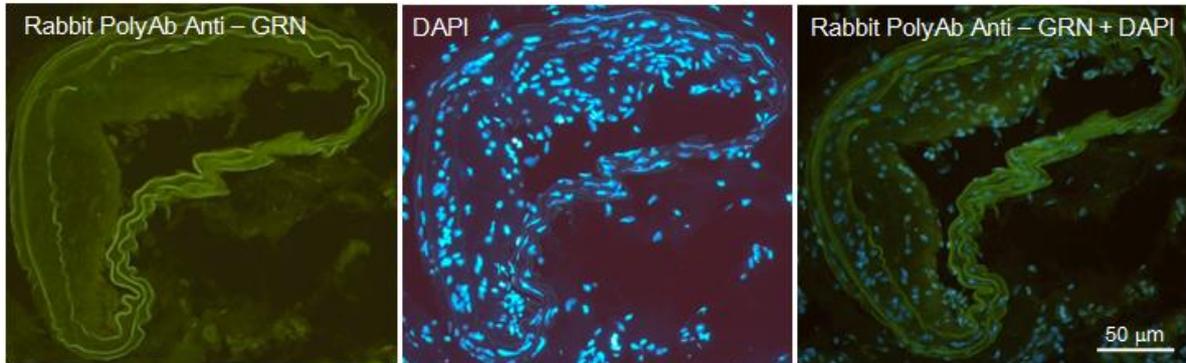
Verschiedene Organe von ausschließlich PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen werden nach Abschluss der Intravitalmikroskopie für weiterführende histopathologische Untersuchungen entnommen, fixiert, im Verlauf verschiedenen Färbeprotokollen zugeführt, und näher untersucht.

Zum Nachweis und zur Identifikation des Proteins Progranulin und seiner Lokalisation werden zunächst spezifische immunhistologische Doppelfärbungen an unterschiedlichen murinen Geweben, einschließlich Hoden, Niere und Ureter als Positivkontrolle mit bewiesenermaßen hoher Progranulin-Expression, später auch an Carotiden mit nachweislich Plaquematerial von ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt. Neben Anwendung von 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zur Kernfärbung wird an den Gefrierschnitten eine spezifische Proteinfärbung mittels Rabbit PolyAb Anti-GRN angewendet.

Die Färbung mit Rabbit PolyAb Anti-GRN zeigt auf, dass Progranulin in den atherosklerotischen Plaques, insbesondere in deren Schulterregionen, stark exprimiert wird.

Immunhistologische Doppelfärbungen (Rabbit PolyAb Anti – GRN vs. DAPI vs. Rabbit PolyAb Anti – GRN + DAPI) an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE – defizienten Mäusen

Negativkontrolle



1:12

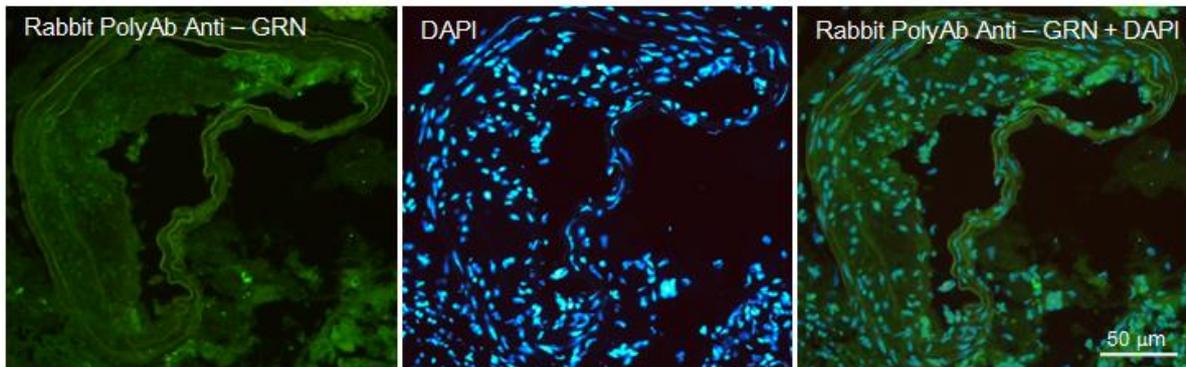


Abbildung 45: Immunhistologische Doppelfärbungen (Rabbit PolyAb Anti-GRN (grün) vs. DAPI (blau) vs. Overlay (Rabbit PolyAb Anti-GRN + DAPI) in 20x-Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten Mäusen. Maßstab = 50 µm. Negativkontrolle (oben): links: Rabbit PolyAb Anti-GRN, mittig: DAPI, rechts: Overlay (Rabbit PolyAb Anti-GRN + DAPI). Rabbit PolyAb Anti-GRN in einer Verdünnung von 1:12 (unten): links: Rabbit PolyAb Anti-GRN, mittig: DAPI, rechts: Overlay (Rabbit PolyAb Anti-GRN + DAPI). Die kernhaltigen Zellen leuchten blau und der Nachweis einer Progranulin-Expression erfolgt in leuchtendem Grün. Eine vermehrte Expression von Progranulin zeigt sich insbesondere im Bereich der Schulterregion der atherosklerotischen Plaques.

Immunhistologische Doppelfärbung, Overlay Rabbit PolyAb Anti – GRN + DAPI,
an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE – defizienten Mäusen

1:24

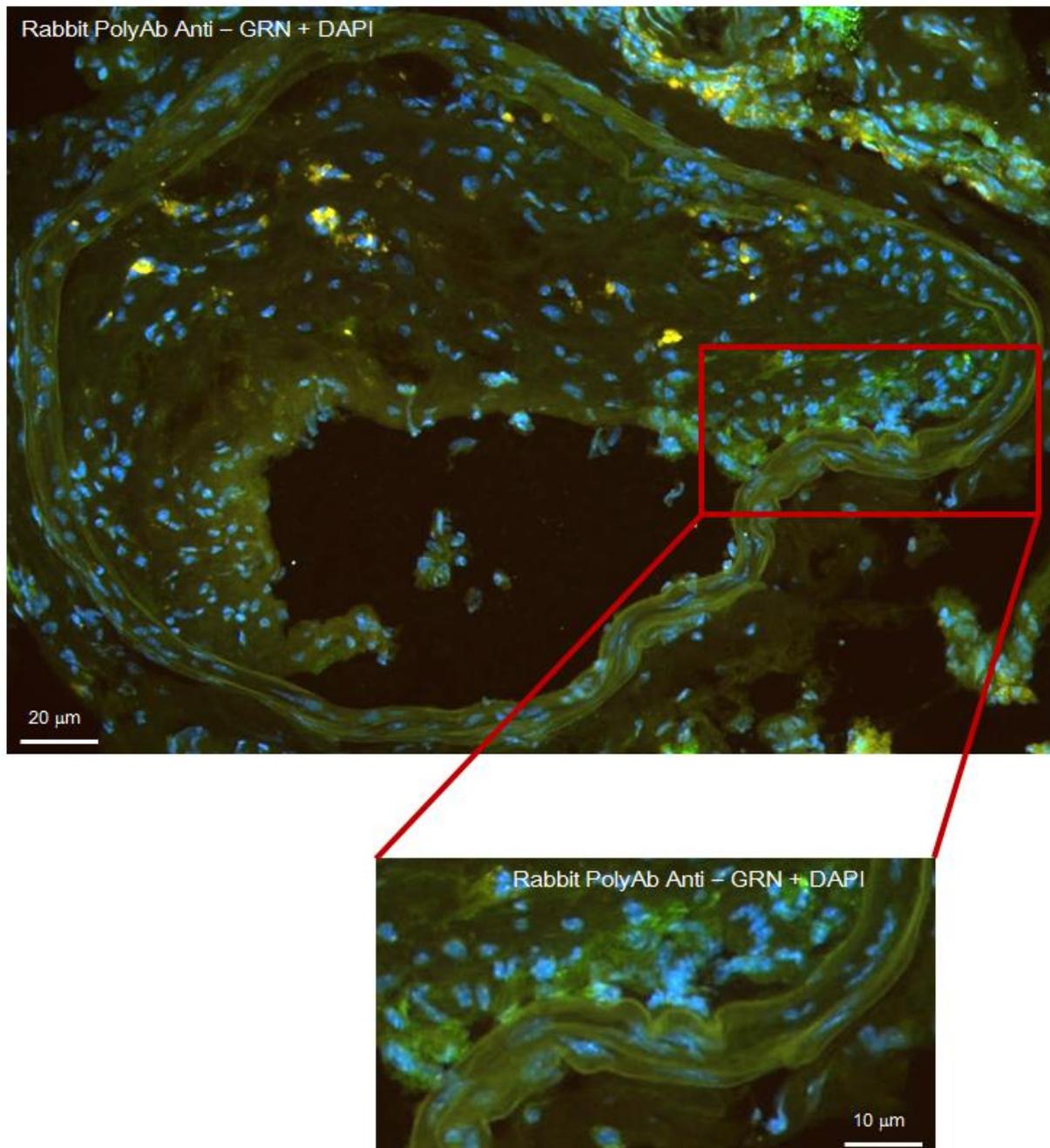


Abbildung 46: Immunhistologische Doppelfärbungen (Overlay Rabbit PolyAb Anti-GRN (grün) + DAPI (blau)) in 20x-Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten Mäusen. Maßstab = 20 µm (oben) bzw. 10 µm (unten). Rabbit PolyAb Anti-GRN in einer Verdünnung von 1:24: hier erhebt sich eine ausgeprägte atheromatöse Plaque fokale über die Tunica intima; die

kernhaltigen Zellen leuchten blau und der Nachweis einer Progranulin-Expression erfolgt in leuchtendem Grün.

Der rot markierte Bildausschnitt entspricht eine Detailaufnahme einer sogenannten „Schulterregion“ der atherosklerotischen Plaque. Insbesondere hier gelingt ein positiver Nachweis von Progranulin.

Nachdem der positive Nachweis einer Progranulin-Expression in der atheromatösen Plaque, insbesondere in der Schulterregion, erfolgt ist, werden überdies immunhistologische Dreifachfärbungen an Carotiden von ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt, um möglicherweise Zellen zu identifizieren, die maßgebliche Quelle des Progranulins in der atherosklerotischen Plaque darstellen. Neben Anwendung von 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zur Kernfärbung und Sheep PolyAb Anti-PGRN zur spezifischen Proteinfärbung wird an den Gefrierschnitten eine CD45 – Färbung mittels gereinigtem Rat FITC Anti-Mouse CD45 angewendet, welche die kernhaltigen Zellen als Leukozyten definiert.

Die immunhistologische Dreifachfärbung zeigt auf, dass Progranulin in den atherosklerotischen Plaques von Leukozyten exprimiert wird.

Immunhistologische Dreifachfärbung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE – defizienten Mäusen, Sheep PolyAb Anti – PGRN + DAPI + CD45
Detailaufnahme einer atheromatösen Plaque

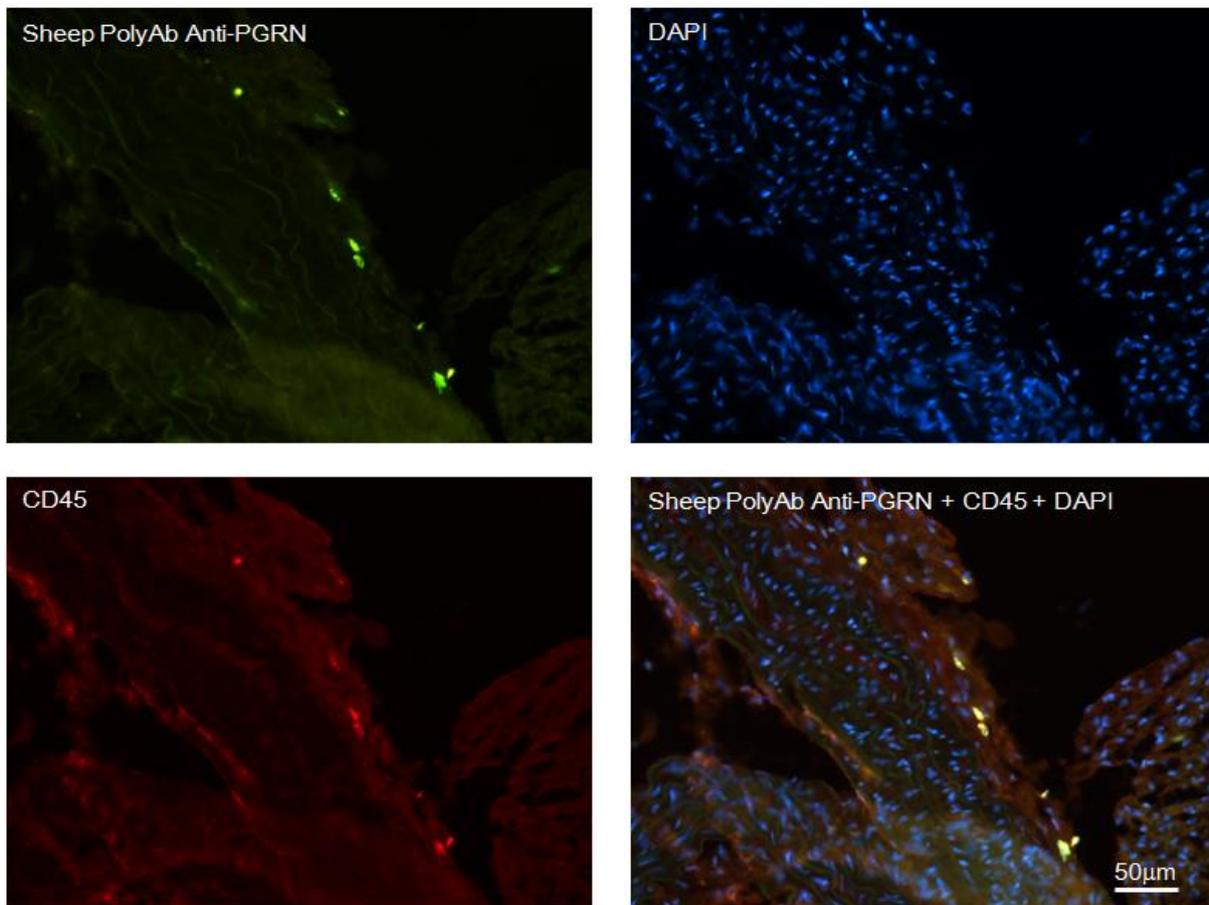


Abbildung 47: Immunhistologische Dreifachfärbungen (Sheep PolyAb Anti-PGRN (grün) vs. DAPI (blau) vs. CD45 (rot) vs. Overlay (Sheep PolyAb Anti-PGRN + DAPI + CD45) in 20x-Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten Mäusen. Maßstab = 50 μm. Der positive Progranulin-Nachweis erfolgt in leuchtendem Grün. Alle kernhaltigen Zellen leuchten blau. Leukozyten erscheinen rot. Im Overlay der drei Färbungen (Sheep PolyAb Anti-PGRN + DAPI + CD45) weisen die Leukozyten in der atheromatösen Plaque eine Progranulin-Expression auf.

4.3.3 CHARAKTERISIERUNG DER ORGANISCHEN VERÄNDERUNGEN – HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE AN SUDAN – III – PRÄPARATEN DES ARCUS AORTAE

Durch die Sudan-III-Färbung, welche häufig auch als Ölrot-Färbung (oil-red-staining) bezeichnet wird, lassen sich fetthaltige Einlagerungen in der Gefäßwand - ein charakteristisches Merkmal der Atherosklerose und ihrer Progression - durch deutliche Rotfärbung veranschaulichen. Mittels der *en-face* - Bildanalyse wird die Morphologie (Größe, Form, und Ausmaß) der rot angefärbten Plaques der zu evaluierenden Aortenbögen erfasst, und eine quantitative Bestimmung der atherosklerotischen Läsionen ermöglicht (Verweis auf Kapitel 3.3.3.2.4).

Dabei weisen PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}-Versuchstiere im Alter von 16 Wochen (nach 12 Wochen cholesterinreicher Diät), die Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} im Alter von 20 Wochen (nach 4+12 Wochen cholesterinreicher Diät) atherosklerotische Plaques in den Aortenbögen auf.

Im Wildtyp-Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} beträgt die relative Plaquefläche im Aortenbogen (Plaquefläche_{gesamt}/Aortenbogenfläche_{gesamt}) in einem Alter von 16 Wochen $43,3 \pm 11,4$ % (Anzahl der Versuchstiere n = 12). Bei dem transgenen Mausstamm PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} nimmt der relative Plaqueanteil in einem Alter von 16 Wochen bereits einen signifikant höheren Wert von $67,3 \pm 12,4$ % ($p < 0,001$) (Anzahl der Versuchstiere n = 10) ein.

Anders verhält sich das zunächst bei den Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} und PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-}; hier ist bereits makroskopisch eine geringere Plaquebildung zu verzeichnen. Die quantitative Analyse ergibt, dass bei den Chimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} die relative Plaqueexpansion im Aortenbogen $27,91 \pm 8,64$ % (Anzahl der Versuchstiere n = 12) beträgt, während die Chimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} eine relative Plaquefläche von $25,54 \pm 5,36$ % ($p = 0,460$) (Anzahl der Versuchstiere n = 10) aufweisen. Eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen lässt sich nicht aufzeigen.

Zur Revelation von Einfluss und Auswirkung der zur Knochenmarksdepletion benötigten Ganzkörperbestrahlung auf den durch Progranulin mutmaßlich hervorgerufenen Effekt hinsichtlich der Entwicklung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen erweist sich in einer sekundären Analyse unter Verwendung von Knochenmarkchimären PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} geringer Fallzahl der relative Plaqueanteil mit einem Wert von $54,03 \pm 5,60$ % (Anzahl der Versuchstiere n = 3) im Vergleich zu den bereits genannten Knochenmarkchimären – Gruppen PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} und PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} jedoch als erheblich gesteigert ($p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Ausbildung atherosklerotischer Plaques im transgenen Mausstamm PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} im Vergleich zum Wildtyp-Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} signifikant eleviert ist. Das Vorhandensein von Progranulin bewirkt somit einen antiatherogenen Effekt.

Die Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} und PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} dahingegen weisen generell geringe atherosklerotische Läsionen auf. Nennenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass die Knochenmarkchimären – Kontrollgruppe PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} im Gegensatz zu den Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} und PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} eine wesentlich gesteigerte Ausbildung atheromatöser Einlagerungen in der Gefäßwand erkennen lässt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass dem gewebeständigen Progranulin eine relevante Rolle bei der Plaqueausbildung zuteil, und sein Effekt durch die eingesetzte Ganzkörperbestrahlung nicht substantiell verändert wird.

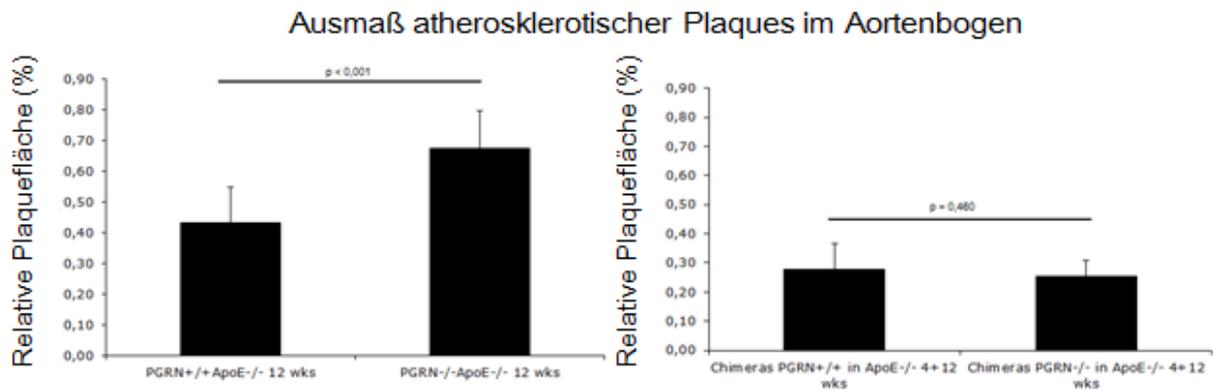


Abbildung 48: Mittels *en-face* - Technik ermittelte relative Plaquefläche im Aortenbogen: das Diagramm links zeigt den relativen Plaqueanteil von PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (n = 12) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (n = 10), p < 0,001; das Diagramm rechts die relative Plaquefläche von PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 12) vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} Knochenmarkchimären (n = 10), p = 0,460.

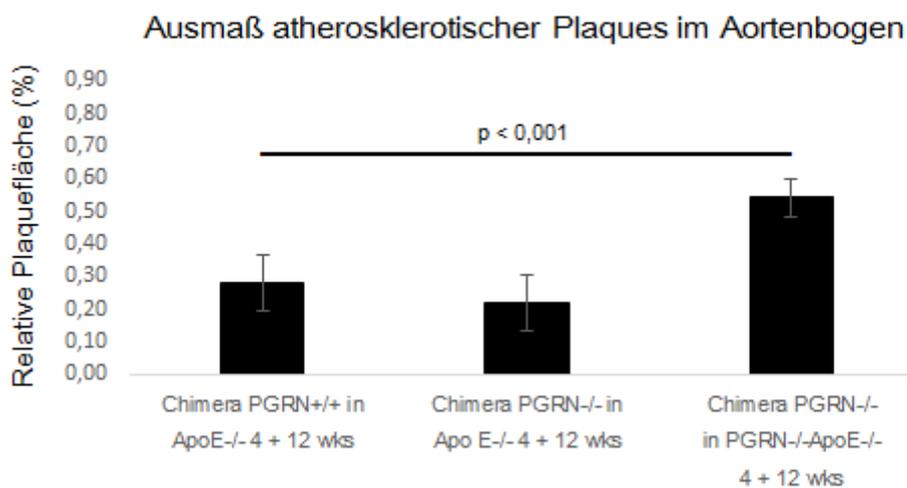


Abbildung 49: Mittels *en-face* - Technik ermittelte relative Plaquefläche im Aortenbogen: Gegenüberstellung des Ausmaßes der atherosklerotischen Plaques im Aortenbogen der Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (n = 12), PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} (n = 10) sowie PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (n = 3), p < 0,001.

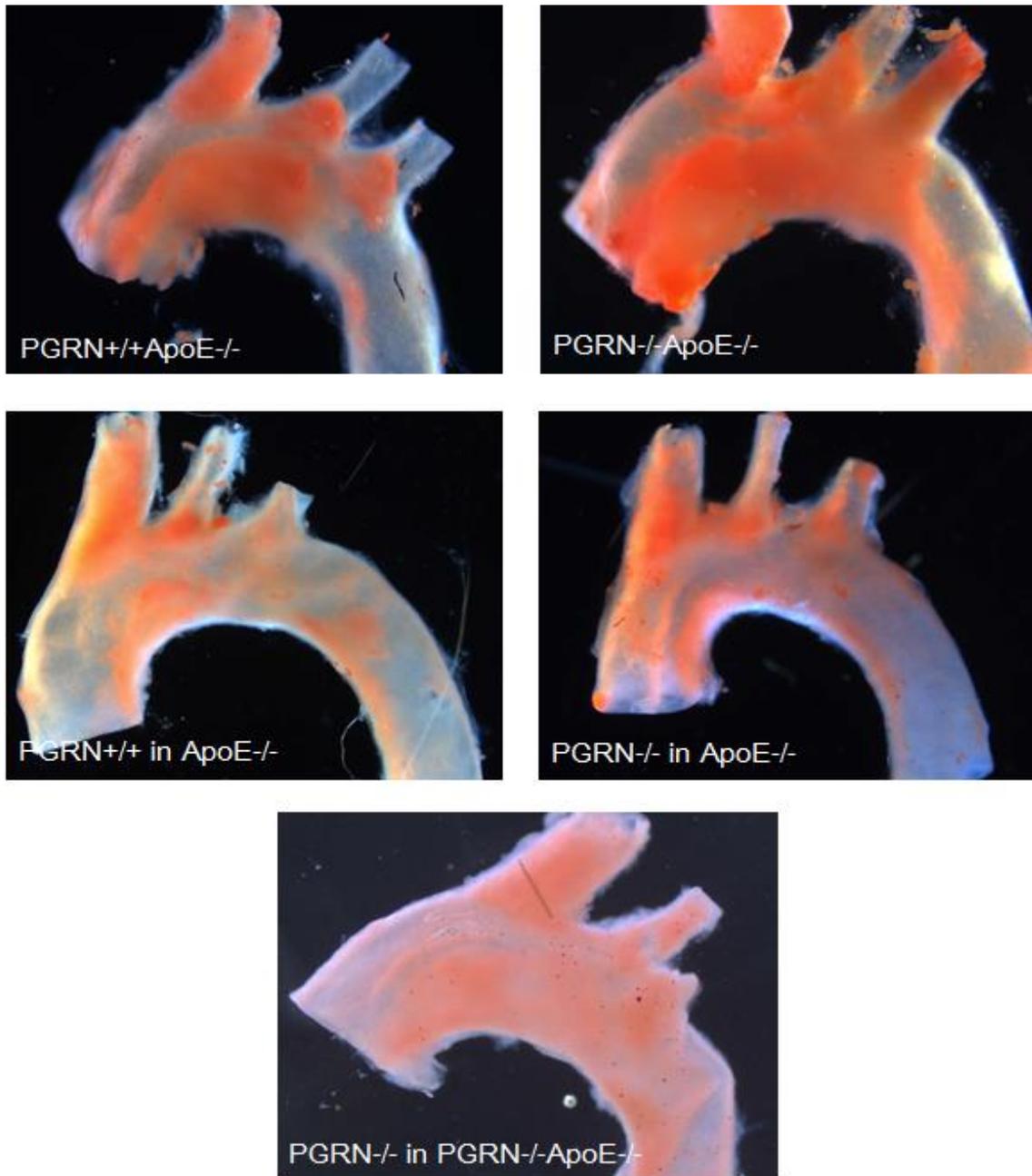


Abbildung 50: Sudan-III-Färbungen des Aortenbogens: die abfotografierten Bilder stellen der Reihe nach das Ausmaß atherosklerotischer Plaques von PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}, PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-}, PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen dar. Auffallend ist der signifikant höhere Plaqueanteil im Aortenbogen der Doppel-Knockout-Maus im Vergleich zur PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Maus. Die Knochenmarkchimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} und PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} weisen grundsätzlich geringe Plaquebildung auf, wobei die Knochenmarkchimären – Kontrollgruppe PGRN^{-/-} in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} einen vergleichsweise erhöhten Plaqueanteil erkennen lässt.

Part 5. DISKUSSION

Trotz Fortschritten in der Therapie stellt die Atherosklerose mit ihren klinischen Folgeerkrankungen, noch vor Infektions- oder Krebserkrankungen, die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen - Deutschland eingeschlossen- dar [1, 3, 4].

Ein vertieftes Verständnis der komplexen Abläufe der Atherogenese auf molekularer und zellulärer Ebene scheint daher von zentraler Bedeutung im Hinblick auf Prävention und Therapie atherosklerotisch bedingter Herz- und Gefäßerkrankungen.

Die funktionelle Rolle des Wachstumsfaktors Progranulin in der Progression der Atherosklerose und seine Wirkung auf Leukozyten und deren Wechselbeziehungen mit dem Gefäßendothel sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von Progranulin für Initiation und Progression der Atherosklerose und sein Einfluss auf die dynamische Leukozyten-Endothel-Interaktion, insbesondere auf die Regulation von Adhäsion und Migration von Leukozyten, in unterschiedlichen hämodynamischen Begebenheiten im Mausmodell analysiert, sein Einfluss auf den Ausprägungsgrad atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen untersucht und mögliche relevante leukozytäre Quellen von Progranulin identifiziert.

5.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.1.1 EINFLUSS VON PROGRANULIN AUF DIE DYNAMISCHE LEUKOZYTEN- ENDOTHEL-INTERAKTION

Einer der entscheidenden ersten Schritte für die Initiation und Progression der Atherosklerose ist die Adhäsionskaskade von Leukozyten, nämlich das Rollen, das Anheften, die Adhäsion und folglich die Transmigration dieser durch das Endothel. Die Rekrutierung und Akkumulation von Leukozyten am

dysfunktionalen Endothel wird durch eine Reihe verschiedenster Adhäsionsmoleküle und die gesteigerte Synthese und Freisetzung von Zytokinen vermittelt [14, 18, 110, 122, 123, 133]. Nicht zuletzt diese wird durch Progranulin, oder vielmehr seine Granuline, herbeigeführt. Es ist mittlerweile erwiesen, dass Progranulin in seiner vollen Länge durch Hemmung der TNF-alpha-Aktivität antiinflammatorisch wirkt [76, 83, 85, 95, 171-173]. Wird es jedoch unter Einfluss von neutrophiler Elastase oder Proteinase 3 proteolytisch gespalten, liegen die sogenannten Granuline, kleinere Peptide, vor, welche einen entgegengesetzten Effekt auszuüben scheinen, nämlich eine proinflammatorische Wirkung durch u.a. Sekretion entzündungsfördernder Interleukine entfalten [76, 82-84, 174]. Gerade in den Anfängen eines sich entwickelnden Entzündungsprozesses, so auch in denen der Atherogenese, sind es vorrangig aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die oben genannte Enzyme sezernieren, zu einer Degradierung von Progranulin in seine proentzündlichen Granuline, und infolgedessen zu einer Verstärkung der Zytokin-vermittelten Rekrutierung von Leukozyten und somit der bereits initiierten inflammatorischen Reaktion führen [82, 83, 174]. Entgegen der Annahme, dass die Präsenz von Progranulin und seine potentielle Degradierung in die kleineren entzündungsfördernden Granuline durch insgesamt gesteigerte Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten eine akzentuiertere Entzündungsreaktion bewirkt, zeigt sich in der vorliegenden Studie, dass vielmehr die Deletion von Progranulin zu einer vermehrten Inflammation führt:

5.1.1.1 MAKROZIRKULATORISCHES SETTING IM RAHMEN DER ATHEROSKLEROSE

Im makrozirkulatorischen Setting im Rahmen der Atherosklerose am Modell der Arteria carotis findet die im Doppel-Knockout-Stamm PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} im Vergleich zum Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} gesteigerte Inflammationsreaktion Ausdruck in einem signifikant höheren Anteil fest am dysfunktionalen Gefäßendothel adhärenter Leukozyten als physiologische Antwort auf den vorherrschenden entzündlichen Prozess (siehe Abbildung 27, 29). Dieses Faktum lässt sich am ehesten auf die Tatsache zurückführen, dass das Fehlen von Progranulin, einem jüngst identifizierten Liganden und sozusagen natürlichen kompetitiven Antagonisten am TNF-Rezeptor [95, 175, 176], und

die somit nicht vorhandene Besetzung des TNF-Rezeptors durch Progranulin eine uneingeschränkte Wirkung von Tumornekrosefaktor-alpha auf seine Rezeptoren bewirkt, und die durch TNF-alpha vermittelte proinflammatorische Signalkaskade unbehindert ablaufen kann. In der Folge werden verschiedenste inflammatorische Gene transkribiert und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin induziert [9, 177-180]. Die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten an das aktivierte Gefäßendothel ist die Folge [33, 41, 44, 181]. Im Umkehrschluss führt hingegen das Vorhandensein von Progranulin durch den direkten Antagonismus am TNF-Rezeptor [95, 175, 176, 182] zu einer konsekutiven Inhibition der Bindung von Tumornekrosefaktor-alpha an diesen, und unterbindet folglich die durch TNF-alpha vermittelte Signaltransduktion mit Expression proentzündlicher Moleküle. Progranulin kann zwar prinzipiell in die kleineren proinflammatorischen Granuline gespalten werden und hierdurch eine höhere inflammatorischen Wirkung entfalten, wirkt aber - mit offensichtlich weitaus größerer Tragweite - als natürlicher kompetitiver Antagonist am TNF-Rezeptor einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegen. In der Folge kommt es zu einer vergleichsweise signifikant geringeren festen Adhäsion von Leukozyten.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass Progranulin die Atherogenese nicht über seine Degradierung in entzündungsfördernde Peptide aufrechtzuerhalten und zu verstärken scheint, sondern ihm trotz der potentiellen proteolytischen Spaltung in die Granuline vielmehr eine atheroprotektive Rolle und regulatorische Bedeutung für die Leukozytenadhäsion zuteilwird. Die Deletion von Progranulin dagegen scheint über die Wirkung entzündungsfördernder Zytokine die inflammatorische Reaktion im Setting der Atherosklerose zu potenzieren, und maßgeblich an Aggravation und Akzeleration der Atherosklerose beteiligt zu sein.

5.1.1.2 MIKROZIRKULATORISCHES SETTING IM RAHMEN DER STERILEN ENTZÜNDUNG – PROGRANULIN ALS REGULATOR FÜR DIE LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich im Setting der Mikrozirkulation am Modell des Musculus cremaster nach Induktion einer sterilen Inflammation durch intraskrotale Injektion von Tumornekrosefaktor-alpha eine signifikant gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion: in Versuchstieren mit depletiertem Progranulin (PGRN^{-/-}) konnte im Vergleich zur PGRN^{+/+} - Kontrollgruppe am ehesten durch Induktion der bekannten molekularen proinflammatorischen Mechanismen durch Sensitivierung der TNF-Rezeptoren durch TNF-alpha eine signifikant gesteigerte Anheftung von Leukozyten an das aktivierte Gefäßendothel getriggert werden (siehe Abbildung 34). Ebenso konnte eine erhöhte Tendenz zum Rolling (siehe Abbildung 37) und zur Transmigration (siehe Abbildung 39) in das umgebende Interstitium im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Im Gegensatz hierzu war das Vorhandensein von Progranulin mit einer verminderten Leukozytenadhäsion an das Endothel verknüpft (siehe Abbildung 34). Bereits mehrere publizierte *in vitro* - Studien konnten im Kontext neurologischer Erkrankungen einen ähnlichen Einfluss von Progranulin auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion belegen: so zeigte erst kürzlich Egashira et al. [183] im Zusammenhang mit zerebralen Insulten, dass die Behandlung mit (rekombinantem) Progranulin die durch TNF-alpha vermittelte Rekrutierung von Leukozyten, deren Chemotaxis und die Expression des für die Anheftung von Leukozyten erforderlichen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 [184] konzentrationsabhängig abschwächt bis sogar gänzlich unterdrückt. Yin et al. [185] konnte im Kontext der frontotemporalen Demenz herausarbeiten, dass PGRN-defiziente Mäuse ein gesteigertes Level an proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor-alpha neben einem verringerten Niveau an entzündungshemmendem Interleukin-10 aufweisen, und demnach durch eine exzessiv gesteigerte Entzündungsantwort gekennzeichnet sind. Aber auch für die in der vorliegenden Promotionsarbeit bedeutungsvolle Atherosklerose konnte Kojima et al. [93] im Vorfeld aufzeigen, dass Progranulin die Chemokin-vermittelte Migration von Monozyten trotz Stimulation mit Monocyte Chemoattractant Protein - 1 (kurz: MCP-1), einem Chemokin mit Schlüsselfunktion für die Migration von Leukozyten, insbesondere

von Monozyten und Makrophagen [186], abzuschwächen oder gar zu unterdrücken scheint. Ebenso konnte Hwan et al. [187] aufdecken, dass Progranulin über den Akt/eNOS- und Nuclear Factor- κ B - Signalweg einen antiinflammatorischen und sogar antiatherogenen Effekt herbeiführt: die der Pathogenese der Atherosklerose zugrunde liegende endotheliale Dysfunktion ist durch einen Mangel an gelöstem endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) charakterisiert, welcher das Endothel von Blutgefäßen in der Regel vor Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und Proliferation glatter Muskelzellen schützt [188]. Progranulin scheint über eine gesteigerte Stickstoffmonoxid-Verfügbarkeit und die damit assoziierte Verbesserung der Endothelfunktion der Atheroprogression entgegenzuwirken. Darüber hinaus führt Progranulin über Blockade des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher eine entscheidende regulatorische Rolle bei entzündlichen Prozessen im Rahmen der Atherosklerose spielt [189], zu einer verminderten Expression der für die feste Adhäsion und Migration von Leukozyten relevanten Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und MCP-1, und hierdurch ebenfalls zu einer herabgesetzten Ausbildung der Atherosklerose.

Zusammenfassend lässt sich somit formulieren, dass Progranulin eine Schlüsselrolle für die Regulation der Leukozyten-Endothel-Interaktion einnimmt, und das nicht nur in chronisch – entzündlichen Vorgängen, wie zum Beispiel in denen der Atherosklerose, sondern wie hier auch dargestellt in akuten (u.a. TNF- α – getriggerten) entzündlichen Prozessen. Es wirkt regulierend auf die Adhäsion und Rekrutierung von Leukozyten, und scheint auf diese Weise von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose zu sein.

5.1.2 EINFLUSS VON PROGRANULIN AUF DEN AUSPRÄGUNGSGRAD ATHEROSKLEROTISCHER GEFÄßWANDVERÄNDERUNGEN / RELEVANTE LEUKOZYTÄRE QUELLE VON PROGRANULIN

In der vorliegenden Promotionsarbeit sind bei dem verwendeten Kontrollstamm PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} nach 12-wöchiger (ca. 3 Monate) Verabreichung einer cholesterinreichen Sonderdiät zur Potenzierung der Entwicklung atheromatöser Gefäßwandveränderungen ausgeprägte atherosklerotische Läsionen in Aortenbogen/Aorta und Arteriae carotides zu verzeichnen. Die in dieser Studie beobachtete

Entwicklung der Atherosklerose stimmt mit den bereits vielfach publizierten Untersuchungen zur Atheroprogression in der ApoE^{-/-} - Maus überein [51, 151]. Im Unterschied zum Kontrollstamm (PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}) lässt sich - wie erst kürzlich von Kawase et al. publiziert [94] - im Doppel-Knockout-Stamm PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} eine erhebliche Akzeleration und Aggravation der Atherogenese durch eine hierfür gesteigerte Empfindlichkeit erkennen; die Versuchstiere sind sowohl in den gängigen histologischen Färbungen (HE, EvG) von seriellen Schnittpräparaten der Arteria carotis (siehe Abbildung 43) als auch in der Sudan-III-Färbung des Aortenbogens (siehe Abbildung 48, 50) durch eine signifikant gesteigerte Plaquebildung charakterisiert.

Die vermehrte Prädisposition zur Ausbildung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen der Doppel-Knockout-Versuchstiere sind durch eine gesteigerte inflammatorische Reaktion bedingt: die Deletion von Progranulin führt neben vermutlich noch vielen weiteren unerforschten Pathomechanismen nicht zuletzt auch durch den fehlenden kompetitiven Antagonismus am TNF-Rezeptor, die demnach nicht vorhandene Bindung des Proteins an die TNF-Rezeptoren und die konsekutiv fehlende Blockade der nachgeschalteten Signaltransduktionswege (Verweis auf Kapitel 2.1.4) zu einer zu erwartenden, durch Tumornekrosefaktor-alpha bedingten inflammatorischen Reaktion [83] durch offenbar vermehrte Expression proentzündlicher Botenstoffe: die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB („nuclear factor kappa beta“) und AP-1 („Aktivator Protein-1“) löst eine gesteigerte Synthese und Sekretion entzündungsfördernder und proatherogener Adhäsionsmoleküle aus [33, 44, 47, 48], vermittelt hierdurch die für die Atherosklerose charakteristischen Zell-Endothel-Interaktionen und unterhält so den Entzündungsprozess [14, 15, 18, 24, 34, 133].

Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte bereits im Vorfeld in der wissenschaftlichen Literatur auch für andere, mehr oder weniger chronisch-entzündliche Erkrankungen belegt werden. Sowohl bei der frontotemporalen Demenz [91, 92, 98, 190], als auch bei der rheumatoiden Arthritis [95, 149, 175, 191, 192], als auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn als auch bei der Osteopenie [193] ist die Defizienz von Progranulin mit einer gesteigerten Entzündungsreaktion assoziiert. Anders verhält es sich unter anderem bei der Entstehung der

Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ II bei am sogenannten Wohlstandssyndrom leidenden, somit adipösen Individuen. Hier führt die Defizienz von Progranulin nämlich - wider Erwarten - zu einer, möglicherweise durch das Supprimieren potentieller Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 im Fettgewebe, geringeren Insulinresistenz und Empfindlichkeit für die Entwicklung von Übergewicht und Adipositas [194].

Durch die unterdessen laborchemische Bestimmung des plasmatischen Cholesterin- und HDL („High-Density-Lipoprotein“)-Spiegels lässt sich die bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Dysregulation im Lipidstoffwechsel verifizieren: die Versuchstiere der beiden Versuchsgruppen weisen ein deutlich erhöhtes, um den Faktor 4-5 gegenüber der Norm [195] gesteigertes, allerdings vergleichbares Plasma-Cholesterin-Niveau auf [61, 64], wie es bei Tieren mit fehlendem Apolipoprotein E zu erwarten ist. Dies lässt darauf schließen, dass das Fehlen von Progranulin keinen wesentlichen Einfluss auf die Lipidstoffwechsellparameter im Blut zu haben scheint, und der Dysfunktionalität oder dem Fehlen von Apolipoprotein E die entscheidende Bedeutung in diesem Zusammenhang gebührt. Progranulin spielt somit keine wesentliche Rolle in der Ausprägung der Dyslipidämie in ApoE – defizienten Tieren.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten immunhistologischen Färbungen der atherosklerotisch veränderten Gefäße der Mäuse weisen eine deutliche Expression von Progranulin in Leukozyten auf (siehe Abbildung 47). Eine vermehrte PGRN-Expression zeigt sich insbesondere im Bereich der Schulterregionen der atherosklerotischen Plaques (siehe Abbildung 45, 46). Die Erkenntnisse aus den hier dargestellten immunhistologischen Analysen entsprechen bereits veröffentlichten Ergebnissen der Progranulin-Expression in humanen atherosklerotischen Veränderungen [94].

Von besonderem Interesse erschien es daher zu analysieren, inwiefern Progranulin, welches von rekrutierten Leukozyten in der atherosklerotischen Plaque exprimiert wird, in relevantem Maße die Regulation der Atheroprogession beeinflusst. Um diese Fragestellung zu adressieren, generierten wir ApoE^{-/-} - Knochenmarkchimären, deren Knochenmark entweder Progranulin exprimierende oder jedoch Progranulin depletierte Leukozyten bildete. Interessanterweise konnte im Vergleich zu den

zuvor untersuchten PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} sowie PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Doppelknockout-Mäusen keine Zunahme der Plaquebildung in den Knochenmarkchimären nachgewiesen werden (siehe Abbildung 48, 50). Demgegenüber zeigten PGRN^{-/-}- Knochenmarkchimären in PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Empfängertieren wieder eine deutliche Zunahme der atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen (siehe Abbildung 49, 50). Damit liegt der Schluss nahe, dass die Progranulin-Expression rekrutierter Leukozyten in der Atheroprogression keine maßgebliche Rolle zu spielen scheint. Dies untermauert die Vermutung, dass die entzündungsfördernden Eigenschaften von Progranulin, das in der Umgebung von Leukozyten durch deren katalytischen Enzyme, die neutrophile Elastase oder Proteinase 3, in proinflammatorische Granuline gespalten werden kann [82, 83, 87, 174], im Vergleich zu den entzündungshemmenden Wirkungen des ungespaltenen Progranulins die Atheroprogression nur unwesentlich beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass in erster Linie die antiinflammatorische Wirkung von Progranulin in der Pathogenese entzündlicher Prozesse, nämlich sowohl im Kontext der akuten vaskulären Inflammation (siehe Modell des Musculus cremaster, Verweis auf Kapitel 4.2) als auch im Kontext der chronischen vaskulären Inflammation im Rahmen der Atherosklerose, von entscheidender Bedeutung ist. Progranulin, welches von Leukozyten in der atherosklerotischen Plaque exprimiert wird, beeinflusst die Atheroprogression in dem hier gewählten Tiermodell nicht maßgeblich. Dies, sowie die Tatsache, dass PGRN-defiziente und nicht – wie erwartungsgemäß – PGRN-kompetente Versuchstiere eine gesteigerte Atherosklerosedisposition aufweisen, zeigen, dass die vermutete, proinflammatorische Wirkung der Granuline nur eine untergeordnete Rolle in der Atheroprogression spielt.

5.2 AUSBLICK

Grundlage für neue Ansatzpunkte und Strategien zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen ist in der Regel ein umfassendes Verständnis der häufig komplexen Abläufe der zugrundeliegenden Krankheitsprozesse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren Progranulin als Schlüsselprotein im atherosklerotischen Prozess und suggerieren eine antiinflammatorische sowie atheroprotektive Rolle.

Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich zukünftig möglicherweise weitere vielversprechende pharmakologische Therapieoptionen zur Vorbeugung und Behandlung atherosklerotischer Folgeerkrankungen.

Part 6. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas, die stets kompetente und engagierte wissenschaftliche Betreuung und fachliche Unterstützung, sowie die vielen Hilfestellungen und anregenden Diskussionen.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Katrin Echtler, die es mir ermöglicht hat, meine Promotionsarbeit unter ihrer wissenschaftlich wertvollen und hervorragenden Supervision zu erstellen, mir von der ersten Stunde an verständnisvoll und geduldig bei allen inhaltlichen und methodischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, und es verstand, mich immer in den richtigen Momenten zu motivieren und mir Mut zuzusprechen.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Anca Laura Tirnicieriu für ihre Unterstützung, ihre konsequente Motivation und Ihr biologisches Know-how, mit dem sie wesentlich zum Gelingen des Projektes beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. med. Sascha Khandoga, der mich mit großem Engagement und außerordentlicher Hilfsbereitschaft mit dem Cremaster-Modell und den Prinzipien der RLOT-Mikroskopie vertraut gemacht hat.

Weiteren Dank gilt allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere

Michael Lorenz, Anne-Maria Suhr, Ildiko Konrad, Nicole Urtz, Susanne Sauer, Marie-Louise von Brühl, Julia Riegger, Raffaele Coletti, Tristan Konrad, Annekathrin Eckart, Zerkah Ahmed, Sue Chandraratne, Alexander Steinhart, Irene Schubert, Sarah Longhi, Veronika Liegsalz, Julia Schneider, Maria Koehne, Markus Völkl, Florian Plenagl, Tobias Schmidergall, Florian Gärtner, Faridun Rahimi, Said Farschtschi, Selgai Haidari, Tobias Petzold, Daniel Braun, Antonia Knipper, Rainer Okrojek, Mathias Orban, Martin Orban, Lin Zhang, Kyle Legate, Konstantin Stark, Angelika Weber, Zuzana Hajdu, und Birgit Niehues

für ihre große Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und technischen Fragen, und für die harmonische und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle auch Frau Nicole Blount, Frau Maren Bathge, Frau Tanja Irl und Herrn Sebastian Helmer für die verantwortungsvolle und zuverlässige Pflege der Tiere.

Ganz besonders möchte ich allen Korrekturlesern für ihre konstruktive Kritik, die hilfreichen Tipps und Anregungen danken.

Meiner lieben und geschätzten Mutter Christa, aber auch meinen Geschwistern Alica und Tobias, danke ich von ganzem Herzen für ihren Rückhalt, ihr mir stets entgegengebrachtes Vertrauen, ihre Ehrlichkeit, und ihre unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne sie wären mein Medizinstudium, und die Realisierung meiner Pläne nicht möglich gewesen. Vielen lieben Dank!

Schließlich und keineswegs zuletzt möchte ich meinem Freund Christian herzlich danken. Er hat mir in den vergangenen fünf Jahren unerschöpfliche Liebe, vorbehaltloses Vertrauen, unermüdliche Geduld und Ruhe entgegengebracht, war stets für mich da und hat immer an mich geglaubt.

Part 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.:	Arteria
Aa.:	Arteriae
Abb.:	Abbildung
Akt:	Proteinkinase B
APC:	Antigen-presenting cell
AP-1:	Activator Protein -1
Apo A-I:	Apolipoprotein A-I
ApoE:	Apolipoprotein E
bp:	base pair
bzw.:	beziehungsweise
PR:	Primer
C:	Cystein
°C:	Grad Celsius
cAVK:	cerebrale arterielle Verschlusskrankheit
CCD:	charge-coupled-device
CD:	cluster of differentiation
C ₁₇ H ₂₀ CIN ₃ :	Acridinorange
CSF :	colony-stimulating factor, Koloniestimulierender Faktor
CVI:	cerebrovaskuläre Insuffizienz
D:	Asparaginsäure
DAPI:	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC:	dendritic cell
DD:	Differentialdiagnose
DD:	death domain
d.h.:	das heißt
dl:	Deziliter
DNA:	deoxyribonucleid acid, Deoxyribonukleinsäure,
dNTP:	deoxyribonucleotide
dPBS:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA:	ethylene diamine tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure

eNOS:	endotheliale NO-Synthase
EPI:	Epithelin
et al.:	et alii / et. aliae, und andere
EvG:	Elastika – van – Gieson
F1:	1. Filialgeneration
FADD:	Fas-assoziierte-Todesdomäne
FBS:	Fetal Bovine Serum
F _c -region:	Fragment crystallizable region
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
g:	Gramm
G:	Glycin
xxG:	Gauche
GEP:	Granulin-Epithelin-Precursor
Gll.:	Glandulae
GRN:	Granulin
Gy:	Gray
H:	Histidin
HCD:	High cholesterol diet
H.E.:	Hämatoxylin – Eosin
HDL:	High Density Lipoprotein
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule - 1
ICH:	Immunhistochemie
IFN:	Interferon
IgE:	Immunglobulin E
IgG:	Immunglobulin G
IL:	Interleukin
IVC:	individually ventilated cage
IVM:	Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie
kDA:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
KG:	Körpergewicht
KHK:	Koronare Herzkrankheit
ko:	Knock-out
LDL:	Low Density Lipoprotein

LDLR:	Low Density Lipoprotein - Rezeptor
M.:	Musculus
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
mg:	Milligramm
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
MHC:	Major-Histocompatibility-Complex
min.:	Minuten
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mM:	Millimolar
MPS:	Mononukleäres phagozytisches System
ms:	Millisekunden
MW	Mittelwert
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
n:	Anzahl
NF-κB:	nuclear factor kappa beta
ng:	Nanogramm
NH ₄ Cl:	Ammoniumchlorid
NK:	Natürliche Killerzellen
nm:	Nanometer
NO:	Stickstoffmonoxid
OD:	optische Dichte
P:	Prolin
pAVK:	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS:	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCDGF	PC-cell-derived growth factor
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PEPI	Proepithelin
PGRN:	Progranulin
PSGL-1:	P-Selektin-Glykoproteinligand -1
RES:	retikuloendotheliales System,

	retikulohistiozytäres System
RIP:	Rezeptor-Interagierendes-Protein
RLOT:	Reflected – Light Oblique Transillumination
ROI:	region of interest
RPMI Medium:	Roswell Park Memorial Medium
SEM	Standard Error of Mean
SLPI:	Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor
SPF:	specific pathogen free
Stabw	Standardabweichung
T:	Threonin
TBE:	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tc:	zytotoxische T-Zelle
TCR:	T-Zell-Rezeptor
T _{H1/2} :	T-Helferzelle 1/2
TNF- α :	Tumornekrosefaktor – alpha
TNFR:	Tumornekrosefaktor - Rezeptor
TRADD:	TNFR1-associated death domain
TRAF:	TNF receptor associated factor
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U:	Unit
UV:	ultraviolett
V:	Volt
V.:	Vena
VCAM-1:	vascular adhesion molecule -1
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
W:	Watt
WBC:	White Blood Cell Count
WHO:	World Health Organisation
wt:	Wildtyp
♂:	männlich
♀:	weiblich

Part 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: 4 Stadien der Atherosklerose
- Abbildung 2: Die Signalkaskaden nach Bindung von TNF- α an TNFR-1 und TNFR-2
- Abbildung 3: Struktur von Progranulin
- Abbildung 4: Konversion von Progranulin in Granuline - Die Rolle von SLPI und der Serinproteasen
- Abbildung 5: Funktionen von Progranulin bzw. Granulinen in Abhängigkeit von SLPI und neutrophiler Elastase
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Leukozytenadhäsionskaskade
- Abbildung 7: Unterschiedliche Bewegungsmuster von Leukozyten bei der interstitiellen Migration
- Abbildung 8: Schwanzveneninjektion: Schematische Gefäßdarstellung der Schwanzvene bei der Maus und methodische Durchführung
- Abbildung 9: Bandmuster bei der Genotypisierung von Progranulin – Tierstamm (oben) vs. ApoE – Tierstamm (unten)
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der eröffneten ventralen Halsregion bei der Maus
- Abbildung 11: Präparation der Arteriae carotides communes
- Abbildung 12: Übersicht Versuchsprotokoll A. carotis - Mausmodell
- Abbildung 13: Strukturformel und Absorptions-/Emissionsspektrum von Acridinorange
- Abbildung 14: Aufbau des Versuchsplatzes (links), Exposition des murinen Skrotums vor der Präparation (mittig) und Präparation und Aufspannen des Musculus cremaster auf dem Plexiglas – Plateau (rechts)
- Abbildung 15: Übersicht Versuchsprotokoll Modell Musculus cremaster
- Abbildung 16: Darstellung der Vena facialis
- Abbildung 17: Direkte (a) und indirekte (b) Immunmarkierung
- Abbildung 18: Sudan III – Färbung: Ermittlung der relativen Plaquefläche mittels *en face* – Technik:
a) Ermittlung der Gesamtfläche des Aortenbogens durch Umfahrung, b) Ermittlung der

absoluten Plauefläche innerhalb der zuvor bestimmten Gesamtfläche

Abbildung 19: Ermitteltes mittleres Körpergewicht: PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 20: Ermitteltes mittleres Körpergewicht: PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 21: Gesamtleukozytenzahl PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 22: Plasma – Cholesterin - Spiegel PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 23: HDL – Spiegel PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 24: Gesamtleukozytenzahl PGRN^{+/+}in ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}in ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 25: Plasma – Cholesterin - Spiegel PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-}in ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 26: HDL – Spiegel PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (links) vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} (rechts)

Abbildung 27: Leukozytenadhäsion an der Prädilektionsstelle („bifurkationsnah“) für Atherosklerose (oben) und „bifurkationsfern“ (unten) von PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen (links) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Mäusen (rechts)

Abbildung 28: Leukozytenadhäsion an der Prädilektionsstelle („bifurkationsnah“) für Atherosklerose (oben) und „bifurkationsfern“ (unten) von PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} - Mäusen (links) vs. PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} - Mäusen (rechts)

Abbildung 29: Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel von PGRN^{+/+}ApoE^{-/-} - Mäusen (oben) vs. PGRN^{-/-}ApoE^{-/-} - Mäusen (unten)

Abbildung 30: Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel von Chimären PGRN^{+/+} in ApoE^{-/-} (oben) vs. Chimären PGRN^{-/-} in ApoE^{-/-} (unten)

Abbildung 31: *Pseudo-dreidimensionale* Darstellung einer postkapillären Venole mittels RLOT – Intravitalmikroskopie

Abbildung 32: Leukozytenbestimmung im venösen Blut von Kontrollgruppe PGRN^{+/+} (links) und Versuchsgruppe PGRN^{-/-} (rechts)

Abbildung 33: Mittlerer Gefäßdurchmesser der postkapillären Venolen des murinen Musculus cremaster

- Abbildung 34: Anzahl der an postkapillären Venolen fest adhärenen Leukozyten
- Abbildung 35: Videosequenz fest adhärenter Leukozyten am Gefäßendothel einer postkapillären Venole einer PGRN^{+/+} - Maus
- Abbildung 36: Videosequenz fest adhärenter Leukozyten am Gefäßendothel einer postkapillären Venole einer PGRN^{-/-} - Maus
- Abbildung 37: Anzahl der an postkapillären Venolen rollenden Leukozyten
- Abbildung 38: Auswertungsfenster („ROI“ – „region of interest“) der Größe 100 x 50 µm zur Quantifizierung der transendothelial migrierten Leukozyten
- Abbildung 39: Anzahl der durch postkapilläre Venolen transendothelial transmigrierten Leukozyten
- Abbildung 40: Videosequenz durch postkapilläre Venolen transendothelial transmigrierter Leukozyten einer PGRN^{+/+} - Maus
- Abbildung 41: Videosequenz durch postkapilläre Venolen transendothelial transmigrierter Leukozyten einer PGRN^{-/-} - Maus
- Abbildung 42: Lichtmikroskopische Aufsicht (10x - Objektivvergrößerung) eines Querschnitts der Arteria carotis interna von Kontrollgruppe PGRN^{+/+}ApoE^{-/-}
- Abbildung 43: Lichtmikroskopische Aufsicht (10x - Objektivvergrößerung) eines Querschnitts der Arteria carotis interna von Versuchsgruppe PGRN^{-/-}ApoE^{-/-}
- Abbildung 44: Atheromatöse Plaque
- Abbildung 45: Immunhistologische Doppelfärbungen (Rabbit PolyAb Anti-GRN (grün) vs. DAPI (blau) vs. Overlay (Rabbit PolyAb Anti-GRN + DAPI) in 20x-Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten Mäusen
- Abbildung 46: Immunhistologische Doppelfärbungen (Overlay Rabbit PolyAb Anti-GRN (grün) + DAPI (blau)) in 20x-Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten Mäusen mit Detailaufnahme einer sogenannten „Schulterregion“
- Abbildung 47: Immunhistologische Dreifachfärbungen (Sheep PolyAb Anti-PGRN (grün) vs. DAPI (blau) vs. CD45 (rot) vs. Overlay (Sheep PolyAb Anti-PGRN + DAPI + CD45) in 20x-

Objektivvergrößerung an Gefrierschnitten der Arteria carotis von ApoE-defizienten

Mäusen

Abbildung 48: Mittels *en-face*-Technik ermittelte relative Plaquefläche im Aortenbogen

Abbildung 49: Mittels *en-face*-Technik ermittelte relative Plaquefläche im Aortenbogen - eine

Gegenüberstellung der Knochenmarkchimären

Abbildung 50: Sudan-III-Färbungen des Aortenbogens – eine Gegenüberstellung

Part 9. TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Zusammensetzung des weißen Differenzialblutbildes Mensch vs. Maus
- Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung des ApoE –Gens
- Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung des PGRN –Gens
- Tabelle 4: Übersicht über die Primer der PCR – Ansätze (ApoE – Locus)
- Tabelle 5: Übersicht über die Primer der PCR – Ansätze (PGRN – Locus)
- Tabelle 6: Übersicht über die PCR – Bedingungen für 35 Zyklen
- Tabelle 7: Inhaltsstoffe der cholesterinreichen Sonderdiät
- Tabelle 8: Übersicht über die Kombinationsanästhesie bei der Maus
- Tabelle 9: Peripheres Blutbild vor Versuchsbeginn

Part 10. LITERATURVERZEICHNIS

1. *DESTATIS 2011 Pressemitteilung Nr. 425 vom 06.12.2012.* 2012; Available from: DESTATIS 2011 Pressemitteilung Nr. 425 vom 06.12.2012, https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/12/PD12_425_23_2.html.
2. *DESTATIS 2010 Pressemitteilung Nr. 354 vom 23.09.2011.* 2011; Available from: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11_354_23_2.html.
3. Singh, R.B., et al., *Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process.* Exp Clin Cardiol, 2002. **7**(1): p. 40-53.
4. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study.* Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
5. WHO. *CLASSIFICATION OF. ATHEROSCLEROTIC LESIONS. Report of a Study Group.* 1958; Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_143.pdf.
6. Cullen, P., J. Rauterberg, and S. Lorkowski, *The pathogenesis of atherosclerosis.* Handb Exp Pharmacol, 2005(170): p. 3-70.
7. Jörg Kreuzer, C.T., *Atherosklerose.* 2003: Thieme, Stuttgart.
8. Greskötter, K.R., *Pathologie/ Klinische Medizin systematisch.* Lorch: Uni-Med Decis Making, 1996. **1**: **609 - 614.**
9. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
10. Kannel, W.B., *Overview of atherosclerosis.* Clin Ther, 1998. **20 Suppl B**: p. B2-17.
11. Giannotti, G. and U. Landmesser, *Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis.* Herz, 2007. **32**(7): p. 568-72.
12. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study.* Lancet, 1997. **349**(9063): p. 1436-42.
13. Munro, J.M. and R.S. Cotran, *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation.* Lab Invest, 1988. **58**(3): p. 249-61.
14. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
15. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.

16. Palinski, W., et al., *Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1372-6.
17. Hoff, H.F. and J.A. O'Neil, *Oxidation of LDL: role in atherogenesis*. Klin Wochenschr, 1991. **69**(21-23): p. 1032-8.
18. Hansson, G.K., et al., *Immune mechanisms in atherosclerosis*. Arteriosclerosis, 1989. **9**(5): p. 567-78.
19. Topper, J.N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype*. Mol Med Today, 1999. **5**(1): p. 40-6.
20. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
21. Topper, J.N., et al., *Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10417-22.
22. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
23. Harrison, D.G., et al., *Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation*. J Intern Med, 2006. **259**(4): p. 351-63.
24. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
25. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 840-56.
26. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
27. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
28. Spagnoli, L.G., et al., *Role of inflammation in atherosclerosis*. J Nucl Med, 2007. **48**(11): p. 1800-15.
29. Arroyo, L.H. and R.T. Lee, *Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 369-75.

30. Shah, P.K., et al., *Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.* *Circulation*, 1995. **92**(6): p. 1565-9.
31. Pasterkamp, G., et al., *Inflammation of the atherosclerotic cap and shoulder of the plaque is a common and locally observed feature in unruptured plaques of femoral and coronary arteries.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(1): p. 54-8.
32. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.* *Science*, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
33. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways.* *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
34. Ait-Oufella, H., et al., *Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(5): p. 969-79.
35. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.* *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(9): p. 372-7.
36. Fon Tacer, K., et al., *TNF-alpha interferes with lipid homeostasis and activates acute and proatherogenic processes.* *Physiol Genomics*, 2007. **31**(2): p. 216-27.
37. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.* *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
38. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
39. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors.* *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 411-52.
40. Popa, C., et al., *The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk.* *J Lipid Res*, 2007. **48**(4): p. 751-62.
41. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors.* *Immunol Today*, 1992. **13**(5): p. 151-3.
42. Paul, W.E., *Fundamental Immunology.* TNF-a; a signaling through two receptors., ed. L.W. Wilki. 2012: Lippincott Williams&Wilki.
43. Wajant, H., *Death receptors.* *Essays Biochem*, 2003. **39**: p. 53-71.
44. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling.* *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 45-65.
45. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.* *Cell*, 1996. **84**(2): p. 299-308.

46. Lin, Y., et al., *Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10822-8.
47. VandenBerg, E., et al., *The role of the cytoskeleton in cellular adhesion molecule expression in tumor necrosis factor-stimulated endothelial cells*. J Cell Biochem, 2004. **91**(5): p. 926-37.
48. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
49. Breslow, J.L., *Mouse models of atherosclerosis*. Science, 1996. **272**(5262): p. 685-8.
50. Becker, K.D., K.R. Gottshall, and K.R. Chien, *Strategies for studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 495-501.
51. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.
52. Reardon, C.A. and G.S. Getz, *Mouse models of atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 167-73.
53. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis*. J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(3): p. 503-17.
54. Knouff, C., et al., *Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(11): p. 1579-86.
55. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, *Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1006-14.
56. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
57. Stein, O. and Y. Stein, *Atheroprotective mechanisms of HDL*. Atherosclerosis, 1999. **144**(2): p. 285-301.
58. Ishigami, M., et al., *Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1020-6.
59. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 507-37.
60. Mahley, R.W., et al., *Inhibition of receptor-mediated clearance of lysine and arginine-modified lipoproteins from the plasma of rats and monkeys*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 225-9.

61. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
62. Ishibashi, S., et al., *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4431-5.
63. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 141-7.
64. Plump, A.S. and J.L. Breslow, *Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse*. Annu Rev Nutr, 1995. **15**: p. 495-518.
65. Knowles, J.W. and N. Maeda, *Genetic modifiers of atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(11): p. 2336-45.
66. Paigen, B., et al., *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*. Atherosclerosis, 1985. **57**(1): p. 65-73.
67. Zanocco-Marani, T., et al., *Biological activities and signaling pathways of the granulins/epithelins precursor*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5331-40.
68. Shoyab, M., et al., *Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7912-6.
69. Plowman, G.D., et al., *The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 13073-8.
70. Anakwe, O.O. and G.L. Gerton, *Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis*. Biol Reprod, 1990. **42**(2): p. 317-28.
71. Zhou, J., et al., *Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10863-9.
72. Daniel, R., et al., *Cellular localization of gene expression for progranulin*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 999-1009.
73. Ong, C.H., et al., *Regulation of progranulin expression in myeloid cells*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **291**(6): p. R1602-12.
74. Bhandari, V., A. Giaid, and A. Bateman, *The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulins precursor*. Endocrinology, 1993. **133**(6): p. 2682-9.

75. Bhandari, V., R.G. Palfree, and A. Bateman, *Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1715-9.
76. He, Z. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(10): p. 600-12.
77. Bhandari, V. and A. Bateman, *Structure and chromosomal location of the human granulin gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **188**(1): p. 57-63.
78. Bucan, M., et al., *Mapping of Grn, the gene encoding the granulin/epithelin precursor (acrogranin), to mouse chromosome 11*. Mamm Genome, 1996. **7**(9): p. 704-5.
79. Daniel, R., et al., *Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development*. Dev Dyn, 2003. **227**(4): p. 593-9.
80. Wang, J., et al., *Pathogenic cysteine mutations affect progranulin function and production of mature granulins*. J Neurochem, 2010. **112**(5): p. 1305-15.
81. Xu, D., et al., *Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(11): p. 2215-28.
82. Kessenbrock, K., T. Dau, and D.E. Jenne, *Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(1): p. 23-8.
83. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair*. Cell, 2002. **111**(6): p. 867-78.
84. Ahmed, Z., et al., *Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2007. **4**: p. 7.
85. Jin, F.Y., et al., *Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide*. Cell, 1997. **88**(3): p. 417-26.
86. Song, X., et al., *Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 535-42.
87. Zhang Y, B.A., *The Glycoprotein Growth Factor Progranulin Promotes Carcinogenesis and has Potential Value in Anti-cancer Therapy*. J Carcinogene Mutagene, 2011.
88. Bateman, A. and H.P. Bennett, *Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors*. J Endocrinol, 1998. **158**(2): p. 145-51.

89. Pickford, F., et al., *Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity*. Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 284-95.
90. Van Damme, P., et al., *Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival*. J Cell Biol, 2008. **181**(1): p. 37-41.
91. Baker, M., et al., *Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 916-9.
92. Cruts, M., et al., *Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 920-4.
93. Kojima, Y., et al., *Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque*. Atherosclerosis, 2009. **206**(1): p. 102-8.
94. Kawase, R., et al., *Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(1): p. 125-33.
95. Tang, W., et al., *The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice*. Science, 2011. **332**(6028): p. 478-84.
96. Okura, H., et al., *HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(6): p. 568-77.
97. Matsubara, T., et al., *PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue*. Cell Metab, 2012. **15**(1): p. 38-50.
98. Yin, F., et al., *Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4639-47.
99. Suzuki, M., et al., *Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis*. J Reprod Dev, 2009. **55**(4): p. 351-5.
100. Chiba S, M.T., Yamanouchi K, Nishihara M, *Alteration in anxiety with relation to the volume of the locus ceruleus in progranulin-deficient mice*. J Reprod Dev. , 2009. **55**(5): p. 518-522.
101. Kayasuga, Y., et al., *Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene*. Behav Brain Res, 2007. **185**(2): p. 110-8.
102. Ulrich Welsch, T.D., *Lehrbuch Histologie*. 2010: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
103. Herbert Lippert, *Lehrbuch Anatomie*. 2011: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
104. Helga Fritsch, W.K., *Taschenatlas der Anatomie 02. Innere Organe*. 2013: Thieme.

105. Korf, T.H.S.u.H.-W., *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 2007: Steinkopff.
106. Hedrich, H.J., *The Laboratory Mouse*. 2012: Academic Press.
107. Sarah Wolfensohn, M.L., *Handbook of Laboratory Animal - Management and Welfare*. Blackwell Publishing, 2003. **Third Edition**.
108. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
109. McEver, R.P. and C. Zhu, *Rolling cell adhesion*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 363-96.
110. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
111. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
112. Langer, H.F. and T. Chavakis, *Leukocyte-endothelial interactions in inflammation*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(7): p. 1211-20.
113. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
114. Rao, R.M., et al., *Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall*. Circ Res, 2007. **101**(3): p. 234-47.
115. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 178-96.
116. Schenkel, A.R., Z. Mamdouh, and W.A. Muller, *Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 393-400.
117. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
118. Friedl, P. and B. Weigelin, *Interstitial leukocyte migration and immune function*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 960-9.
119. Lam, P.Y. and A. Huttenlocher, *Interstitial leukocyte migration in vivo*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(5): p. 650-8.
120. Colditz, I.G., et al., *Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 688-93.

121. Schumann, K., et al., *Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells*. *Immunity*, 2010. **32**(5): p. 703-13.
122. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Role of monocytes in atherogenesis*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1069-112.
123. Song, L., C. Leung, and C. Schindler, *Lymphocytes are important in early atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(2): p. 251-9.
124. Witztum JL, B.J., *Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol.*, 1998. **9**(5): p. 441-8.
125. Tardy Y, R.N., Nagel T, Gimbrone MA Jr, Dewey CF Jr., *Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 1997. **17**(11): p. 3102-6.
126. Welch GN, L.J., *Homocysteine and atherothrombosis*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(15): p. 1042-1050.
127. GM, R., *The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **22**(Suppl 4): p. S1-14.
128. Cybulsky MI, G.M.J., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. *Science*, 1991. **251**(4995): p. 788-791.
129. Cybulsky MI, L.A., Hajra L, Iiyama K, *Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis*. *Clin Chim Acta*, 1999. **286**(1-2): p. 207-218.
130. Li H, C.M., Gimbrone MA Jr, Libby P, *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. *Arterioscler Thromb.*, 1993. **13**(2): p. 197-204.
131. Ylä-Herttuala S, L.B., Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 1991. **88**(12): p. 5252-6.
132. Sakaguchi H, T.M., Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJ, Kraal G, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K., *Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice*. *Lab Invest.*, 1998. **78**(4): p. 423-34.
133. Packard, R.R., A.H. Lichtman, and P. Libby, *Innate and adaptive immunity in atherosclerosis*. *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(1): p. 5-22.
134. Glagov S, W.E., Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ, *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med.*, 1987. **316**(22): p. 1371-5.

135. Hansson GK, H.J., Jonasson L, *Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque*. Am J Pathol. , 1989. **135**(1): p. 169-75.
136. Moreno PR, B.V., López-Cuéllar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT, *Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes*. Circulation, 1996. **94**(12): p. 3090-7.
137. van der Wal AC, B.A., van der Loos CM, Das PK, *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 36-44.
138. Roediger, B., et al., *Visualizing dendritic cell migration within the skin*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(6): p. 1131-46.
139. Ng, L.G., et al., *Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 2058-68.
140. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 384-94.
141. Khandoga, A.G., et al., *In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4693.
142. Liau LM, L.R., Seitz RS, Buznikov A, Gregg JP, Kornblum HI, Nelson SF, Bronstein JM., *Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1353-1360.
143. Ong CH, B.A., *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis*. Histol Histopathol. , 2003. **18**(4): p. 1275-1288.
144. Jian J, K.J., Liu C, *Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 199-208.
145. Li M, L.Y., Xia F, Wu Z, Deng L, Jiang R, Guo FJ, *Progranulin is required for proper ER stress response and inhibits ER stress-mediated apoptosis through TNFR2*. Cell Signal. , 2014. **26**(7): p. 1539-48.
146. He Z, I.A., Kriazhev L, Sadvakassova G, Bateman A., *Progranulin (PC-Cell-derived Growth Factor/Acrogranin) Regulates Invasion and Cell Survival*. Cancer Res., 2002. **62**(19): p. 5590-5596.
147. He Z, O.C., Halper J, Bateman A., *Progranulin is a mediator of the wound response*. Nat. Med., 2003. **9**(2): p. 225-9.

148. Bateman A, B.D., Bennett H, Lazure C, Solomon S, *Granulins, a novel class of peptide from leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun. , 1990. **173**(3): p. 1161-1168.
149. Liu, C.J., *Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis*. FEBS Lett, 2011. **585**(23): p. 3675-80.
150. Hwang HJ, J.T., Hong HC, Choi HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, Baik SH, Yoo HJ, *Progranulin protects vascular endothelium against atherosclerotic inflammatory reaction via Akt/eNOS and nuclear factor- κ B pathways*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76679.
151. Tangirala, R.K., E.M. Rubin, and W. Palinski, *Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice*. J Lipid Res, 1995. **36**(11): p. 2320-8.
152. *The Jackson Laboratory, Advantages of the mouse as a model organism*. Available from: <http://research.jax.org/mousegenetics/advantages/advantages-of-mouse.html>
153. Hatakeyama, S., H. Yamamoto, and C. Ohyama, *Tumor formation assays*. Methods Enzymol, 2010. **479**: p. 397-411.
154. *BASIC BIOMETHODOLOGY FOR LABORATORY MICE*. Available from: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html.
155. Ren, S., et al., *A simplified method to prepare PCR template DNA for screening of transgenic and knockout mice*. Contemp Top Lab Anim Sci, 2001. **40**(2): p. 27-30.
156. Cook, M.J., *The Anatomy of the Laboratory Mouse*. 1963: Academic Press Inc.
157. Schürzinger, D.K., *Die Rolle der Thrombozyten in den frühen Phasen der Atherogenese: eine In-vivo-Studie an der GPIIb/ApoE-Knock-Out-Maus*. Doctoral thesis, 2004.
158. Mulisch M, W.U., *Romeis- Mikroskopische Technik*. 2009: Spektrum, Akademischer Verlag.
159. Darzynkiewicz Z, R.J., Crissman HA, *Flow cytometry*. 1994: 2ndAcademic Press.
160. Invitrogen. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A1301>.
161. Moser, C.M., *Etablierung der „Reflected Light Oblique Transillumination“-Mikroskopie zur Analyse der Leukozytenmigration in vivo*. 2007, LMU Munich.
162. Versuchstierkunde, G.f., *Empfehlungen zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. 2009.
163. Golde, W.T., P. Gollobin, and L.L. Rodriguez, *A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet*. Lab Anim (NY), 2005. **34**(9): p. 39-43.

164. Diagnostics, R. *Cobas INTEGRA Cholesterol Gen.2 (CHOL2)*.
165. Trinder, P., *Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor*. J Clin Pathol, 1969. **22**(2): p. 246.
166. Allain, C.C., et al., *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. Clin Chem, 1974. **20**(4): p. 470-5.
167. Sugiuchi, H., et al., *Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin*. Clin Chem, 1995. **41**(5): p. 717-23.
168. Moghadasian MH, N.L., Shefer S, McManus BM, Frohlich JJ, *Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of apo E-deficient mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols*. Lab Invest. , 1999. **79**(3): p. 355-364.
169. Moghadasian MH, M.B., Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ, *Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans*. FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2623-2630.
170. Lim HY, R.J., Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V, *Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration*. Am J Pathol, 2009. **175**(3): p. 1328-1337.
171. Thurner L, S.E., Fadle N, Klemm P, Regitz E, Kemele M, Bette B, Held G, Dauer M, Lammert F, Preuss KD, Zimmer V, Pfreundschuh M., *Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel diseases*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(8): p. 1733-1742.
172. Cenik B, S.C., Kutluk Cenik B, Herz J, Yu G, *Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 32298-32306.
173. S, P., *Inflammation: new approach to TNF inhibition*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(5): p. 253.
174. Kessenbrock, K., et al., *Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2438-47.
175. Wu, H. and R.M. Siegel, *Medicine. Progranulin resolves inflammation*. Science, 2011. **332**(6028): p. 427-8.
176. Liu, C.J. and X. Bosch, *Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(1): p. 124-32.
177. TA, S., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-434.

178. Shimizu Y, N.W., Gopal TV, Horgan KJ, Graber N, Beall LD, van Seventer GA, Shaw S, *Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions.* J Cell Biol, 1991. **113**(5): p. 1203-1212.
179. Hauser IA, J.D., Thévenod F, Goppelt-Strübe M, *Effect of mycophenolic acid on TNF alpha-induced expression of cell adhesion molecules in human venous endothelial cells in vitro.* Br J Pharmacol, 1997. **122**(7): p. 1315-1322.
180. Chiu JJ, L.P., Chen CN, Lee CI, Chang SF, Chen LJ, Lien SC, Ko YC, Usami S, Chien S., *Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004. **24**(1): p. 73-9.
181. Xanthoulea, S., et al., *Nuclear factor kappa B signaling in macrophage function and atherogenesis.* Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(5): p. 536-42.
182. de Jager, S.C. and G. Pasterkamp, *Crosstalk of lipids and inflammation in atherosclerosis: the PRO of PGRN?* Cardiovasc Res, 2013. **100**(1): p. 4-6.
183. Egashira, Y., et al., *The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment.* J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 105.
184. Smith, C.W., et al., *Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration.* J Clin Invest, 1988. **82**(5): p. 1746-56.
185. Yin, F., et al., *Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice.* J Exp Med, 2010. **207**(1): p. 117-28.
186. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.* J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
187. Hwang, H.J., et al., *Progranulin protects vascular endothelium against atherosclerotic inflammatory reaction via Akt/eNOS and nuclear factor-kappaB pathways.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76679.
188. Huang, P.L., *Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction.* Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(6): p. 473-80.
189. Brand, K., et al., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.* J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1715-22.
190. Martens, L.H., et al., *Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury.* J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 3955-9.

191. Williams, R.O., M. Feldmann, and R.N. Maini, *Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9784-8.
192. Thorbecke, G.J., et al., *Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7375-9.
193. Hossein-Nezhad, A., et al., *Mutual role of PGRN/TNF-alpha on osteopenia developing in obesity's inflammation state*. Minerva Med, 2012. **103**(3): p. 165-75.
194. Hossein-Nezhad, A., et al., *Obesity, inflammation and resting energy expenditure: possible mechanism of progranulin in this pathway*. Minerva Endocrinol, 2012. **37**(3): p. 255-66.
195. Frith, C.H., R.L. Suber, and R. Umholtz, *Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice*. Lab Anim Sci, 1980. **30**(5): p. 835-40.