

**DER EINFLUSS DES INSULINS AUF DIE
THROMBOZYTEN UND AUF DIE
WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN DEN
BLUTPLÄTTCHEN UND DEM ENDOTHEL**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Steffen Rauchfuß

Geboren am 26.07.1973 in Wertheim am Main

Würzburg, Mai 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Ingrid, Dieter, Else, Heinz, Reni und Fritz

While he was with me, the wonder and diabolism of his experiments fascinated me utterly, and I was his closest companion.

H. P. Lovecraft
"Herbert West - Reanimator"

1.	Einleitung	1
1.1	Thrombozyten.....	2
1.1.1	Entstehung der Thrombozyten.....	3
1.1.2	Morphologie.....	4
1.1.2.1	Periphere Zone.....	4
1.1.2.2	Strukturelle Zone.....	5
1.1.2.3	Zone der Organellen.....	6
1.1.2.4	Membransysteme.....	7
1.1.3	Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase	7
1.1.3.1	Plättchen Adhäsion, Aktivierung und Aggregation.....	7
1.1.4	Oberflächenrezeptoren.....	8
1.1.4.1	Integrine.....	8
1.1.4.1.1	Glykoprotein Ib-V-IX.....	9
1.1.4.1.2	Glykoprotein VI.....	10
1.1.4.1.3	Integrin $\alpha_2\beta_1$	11
1.1.4.1.4	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	12
1.1.4.2	Rezeptoren für Agonisten.....	14
1.1.4.2.1	Thrombinrezeptoren.....	14
1.1.4.2.2	ADP Rezeptoren.....	15
1.1.4.2.3	Weitere Agonisten.....	16
1.2	Insulin.....	16
1.2.1	Der Insulinrezeptor.....	18
1.2.2	Insulinwirkung auf Blutplättchen.....	21
1.3	Diabetes mellitus.....	22

1.4	Das Endothel.....	25
1.5	eNOS.....	26
2.	Ziel der Arbeit.....	28
3.	Material und Methoden.....	29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Antikörper.....	29
3.1.1.1	FACS Antikörper.....	29
3.1.1.2	Western Blot Antikörper.....	29
3.1.1.2.1	Primäre Antikörper.....	29
3.1.1.2.2	Sekundäre Antikörper.....	30
3.1.2	Proteinstandart.....	30
3.1.3	Bakterien und Zellen.....	31
3.1.4	Chemikalien.....	31
3.1.5	Enzyme.....	31
3.1.6	Kits.....	32
3.1.7	Medien und Puffer.....	32
3.1.8	Plasmide.....	34
3.1.9	Programme.....	35
3.1.10	Geräte.....	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Gewinnung gewaschener Thrombozyten.....	36
3.2.1.1	Stimulation der Thrombozyten.....	37

3.2.2	Aggregation.....	37
3.2.3	Ca ²⁺ Messung.....	37
3.2.4	Western Blot.....	38
3.2.4.1	Auftrennung der Plättchenprobe.....	38
3.2.4.2	Transfer.....	39
3.2.4.3	Antikörperfärbung.....	39
3.2.4.4	Signaldetektion.....	39
3.2.5	FACS Analyse.....	40
3.2.5.1	Plättchenfärbung PAC-1.....	40
3.2.5.2	Plättchenfärbung P-Selektin.....	40
3.2.5.3	FACS Analyse.....	40
3.2.6	Verdau.....	41
3.2.7	Gelelektrophorese.....	41
3.2.8	Transformation.....	42
3.2.9	Zellkultur.....	42
3.2.10	Transfektion.....	42
3.2.11	Flußkammer Messungen.....	43
3.2.11.1	Vorbereitung der Flusskammer.....	43
3.2.11.2	DCF Färbung der Thrombozyten.....	43
3.2.11.3	Färbung der Endothelzellen.....	43
3.2.11.4	NO Messung.....	44
3.2.11.5	Aggregationsmessung.....	44
3.2.12	Daten Auswertung.....	44

4.	Ergebnisse	45
4.1	Der Aktivierende Effekt auf die Blutplättchen wird durch das Lösungsmittel hervorgerufen.....	45
4.2	Einfluß von reinem Insulin auf die Thrombozyten bei physiologischen Glukosewerten.....	46
4.2.1	Der Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird durch Insulin nicht aktiviert.....	46
4.2.2	Die P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche wird durch Insulin nicht beeinflusst.....	49
4.2.3	Insulin zeigt keine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen.....	52
4.2.4	Die Ca^{2+} Mobilisierung der Blutplättchen wird durch Insulin nicht beeinflusst.....	54
4.2.5	Intrazelluläre Signalwege.....	56
4.2.5.1	Insulin zeigt keine akute Wirkung auf PKB in den Blutplättchen.....	57
4.2.5.2	Keine Insulin-abhängige Wirkung auf die MAP-Kinase in den Blutplättchen.....	57
4.2.5.3	Einfluss von Insulin auf AMPK.....	58
4.2.5.4	Insulin zeigt keine Wirkung auf die VASP Phosphorylierung der Blutplättchen.....	59
4.3	Einfluss von Insulin auf die Thrombozyten bei 30 mM Glukose.....	60
4.3.1	Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Wirkung auf die Aktivierung des Fibrinogen Rezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	61
4.3.2	Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Auswirkung auf die P-Selektin Expression der Blutplättchen.....	63

4.3.3	Bei pathologischen Glukosekonzentrationen zeigt Insulin keine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen.....	66
4.3.4	Die Ca ²⁺ Mobilisierung in Blutplättchen wird bei pathologischen Glukosekonzentrationen von Insulin nicht beeinflusst.....	68
4.3.5	Intrazelluläre Signalwege.....	70
4.3.5.1	Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine akute Wirkung auf PKB in den Blutplättchen.....	71
4.3.5.2	Keine Insulin-abhängige Wirkung auf die MAP-Kinase in den Blutplättchen bei pathologischen Glukosekonzentrationen.....	72
4.3.5.3	Einfluss von Insulin auf AMPK unter hyperglykämischen Bedingungen.....	73
4.3.5.4	Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Wirkung auf die VASP Phosphorylierung der Blutplättchen.....	73
4.4	Zeitabhängiger Insulineffekt auf Blutplättchen.....	74
4.5	Der Insulin Rezeptor.....	75
4.5.1	Western Blot.....	76
4.6	eNOS in Blutplättchen.....	77
4.7	Flußkammerversuche.....	79
4.7.1	Adhäsion der Blutplättchen an Kollagen IV.....	79
4.7.2	Aggregatbildung auf Endothelzellen.....	80
4.7.3	Wirkung von Insulin auf das Endothel.....	82
5.	Diskussion.....	83
5.1.	Aktivierung der Blutplättchen durch Insulin.....	83
5.2.	Wirkung des Insulins auf intrazelluläre Signalwege.....	83

5.3.	Aggregation und Adhäsion der Blutplättchen.....	85
5.4.	Ca ²⁺ Mobilisierung.....	87
5.5.	Thrombozytäre Granula.....	88
5.6.	Insulin Rezeptor.....	89
5.7.	eNOS in Blutplättchen.....	90
5.8.	Wechselwirkung zwischen dem Endothel und den Blutplättchen.....	90
6.	Zusammenfassung.....	92
7.	Abschliessende Bemerkungen.....	95
8.	Finanzierung.....	96
9.	Literatur.....	97
10.	Abkürzungen.....	115
11.	Publikationsliste.....	116
12.	Danksagungen.....	117
13.	Lebenslauf.....	118

1. EINLEITUNG

In der Physiologie der primären Hämostase spielen die Thrombozyten oder Blutplättchen eine zentrale Rolle. Ihre erste sorgfältige Beschreibung erfolgte durch den deutschen Anatom Max Schultze (1825-1874) im Jahre 1865.¹ Dieser sah in den Blutplättchen „Kügelchen“ mit einem Durchmesser von 0,001 – 0,002 mm. Schulze beschrieb erstmals den aktivierten Zustand der Blutplättchen und verglich sie hierbei mit der *Amoeba porrecta* aus dem Mittelmeer (Abb.1.1).

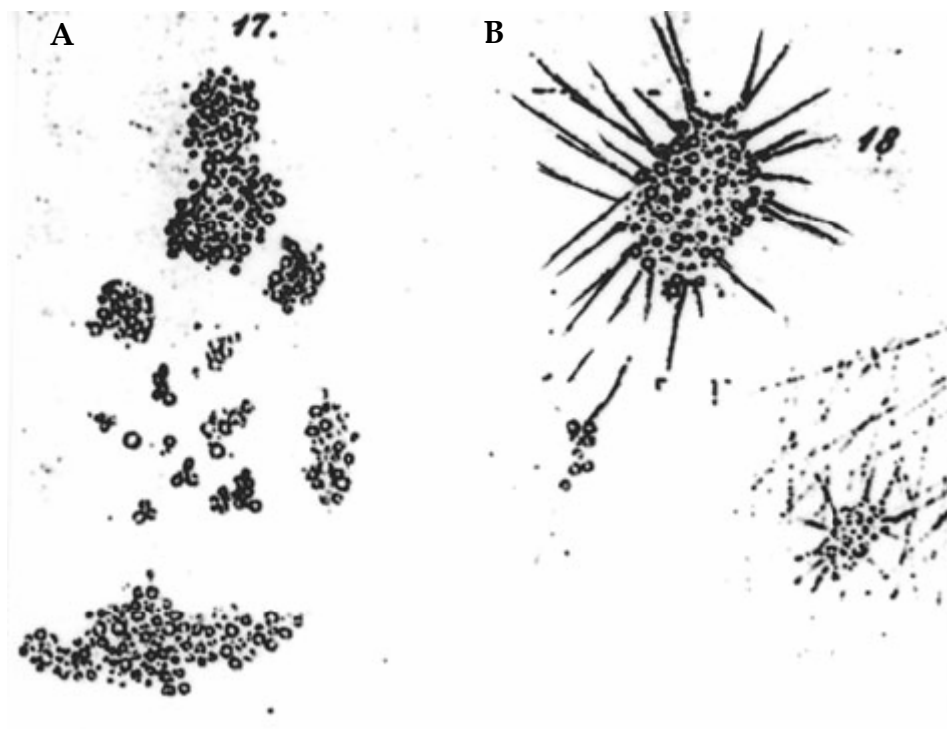


Abb. 1.1 Schultzes Darstellung 17 (A) und 18 (B) des Blutplättchens. Originalbeschriftung: Abb. 17. Die granulären Gebilde, die oft in großen Ansammlungen im normalen menschlichen Blut auftreten. Abb. 18. Dieselben nachdem das fibröse Material des Blutstropfen unter dem Deckgläschen geronnen ist.¹

Diese von Schultze beschriebenen “Kügelchen” wurden 1882 von Giulio Bizzozero als Blutplättchen identifiziert. Von ihm stammt gleichermaßen die erste Beschreibung der Plättchenadhäsion am Ort einer Verletzung.² James H. Wright (1869 – 1928) klärte im Jahre 1906 die Herkunft des Blutplättchens. Er erkannte die Thrombozyten als Abschnürung der Plasmamembran der Megakaryozyten im Knochenmark.

Der Blutfluß wird durch das vaskuläre Endothel aufrechterhalten. Es verhindert die Koagulation des Blutes, die Plättchenaggregation und fördert die Fibrinolyse. Hierzu schüttet das Endothel eine Reihe antithrombogener und vasoaktiver Substanzen aus, zu denen Prostazyklin (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO) gehören. Das Endothel stellt eine schützende Barriere dar, die das Blut und die Plasmafaktoren von den Komponenten des Subendothels trennt. Zu diesen Komponenten gehören adhäsive Proteine wie der von-Willebrand-Faktor (vWF), Kollagen, Fibronectin und Lamin. Diese Proteine fördern die Plättchenadhäsion. Kommt das Blut mit dem Subendothel in Kontakt, so wird die Bildung eines hämostatischen Pfropfs, bestehend aus Thrombozyten und löslichen Plasmakomponenten, stimuliert. Dieser dichtet die Gefäßwandverletzung ab, wodurch die Blutung gering gehalten wird. Die aktivierten Thrombozyten rekrutieren weitere Blutplättchen, wodurch der Thrombus wächst, und schütten gleichzeitig eine Reihe vasokonstriktischer Substanzen (ADP/ATP, Serotonin, Thromboxan A₂) aus. Dies führt zu einer weiteren Verringerung des Blutflusses zu der Wunde hin. Unter physiologischen Bedingungen bleibt die Bildung des hämostatisch wirksamen Thrombus auf den Ort der Verletzung beschränkt. Der Blutfluß und die von ihm abhängige Versorgung des umliegenden Gewebes werden nicht beeinträchtigt.

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten oder Blutplättchen sind mit einem Durchmesser von 4,5 µm die kleinsten Blutkörperchen.³ Sie entstehen durch Abschnürungen aus Megakaryozyten. Die Blutplättchen von Säugetieren besitzen im Gegensatz zu denen von Fischen, Reptilien und Vögeln keinen Zellkern. Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Physiologie der Blutgerinnung.

Bei gesunden Menschen zirkulieren ca. $150 - 380 \cdot 10^3$ Thrombozyten/µl Blut. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt acht bis zwölf Tagen. Die Blutplättchen werden in der Milz und zum Teil in der Leber abgebaut. Ruhende Thrombozyten haben eine diskoide Form. Nach ihrer Aktivierung durch Agonisten wie Thrombin

oder ADP durchlaufen sie eine Formveränderung und nehmen eine sphärische Form mit Pseudopodien an, welche bis zu 5 μM lang sein können. (Abb. 1.2).

Die Blutplättchen sind an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt, von denen die Hämostase und Blutgerinnung die wichtigsten sind. Sie spielen eine Rolle bei Entzündungsreaktionen (Arteriosklerose, allergisches Asthma), der Tumorbilogie (Tumorwachstum, Tumor-Metastase), der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus' (durch Serotoninaufnahme und -abgabe) und immunologischen Reaktionen (Superoxidproduktion, Abtötung von Bakterien).⁴

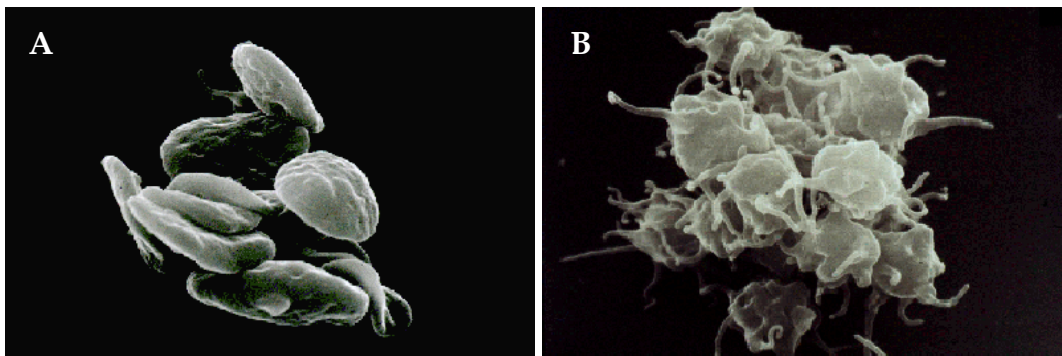


Abb. 1.2 (A) Glatte, diskoider Zustand der ruhenden Blutplättchen. (B) Formveränderte, aktivierte Form der Thrombozyten mit Pseudopodien.

Quelle: <http://www.perfusion.com/perfusion/articles/general/9905-platelet-anatomy/>

1.1.1 Entstehung der Thrombozyten

Thrombozyten gehen im Knochenmark aus den Megakaryozyten hervor. Die Reifung der Megakaryozyten geht mit Endomitose einher. Durch eine Verdopplung der Zellkerne ohne darauf folgende Zellteilung entstehen polyploide Riesenzellen. Die zytoplasmatischen Organellen werden in Domänen organisiert, welche die in der Entstehung begriffenen Thrombozyten repräsentieren. Diese sind durch ein Netzwerk invaginiert Plasmamembranen voneinander abgegrenzt sind.

Innerhalb des Knochenmarks sind die Megakaryozyten an der Wand des Knochens lokalisiert. Von hier aus geben sie größere Segmente ihres Zytoplasmas in

den Blutstrom ab. Durch die Scherkräfte des Blutstroms kommt es zu einer Fragmentierung des Megakaryozytenzytoplasmas in die einzelnen Thrombozyten.

1.1.2 Morphologie

Die Struktur der Thrombozyten kann morphologisch in vier Bereiche unterteilt werden, welche jeweils spezifische Funktionen übernehmen:

- Periphere Zone
- Strukturelle Zone
- Zone der Organellen und
- Membransystem

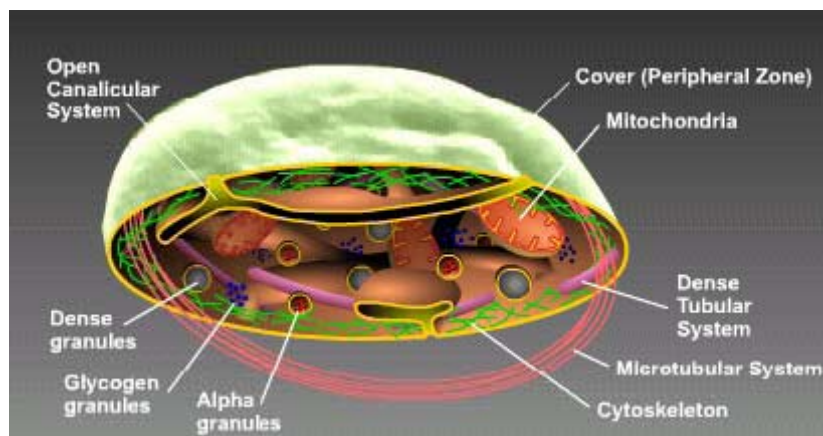


Abb. 1.2 Die Plättchenmorphologie <http://www.platelet-research.org/1/intro.htm>

1.1.2.1 Periphere Zone

Die periphere Zone der Thrombozyten wird von der Plasmamembran gebildet. Sie ist extrazellulär von der Glykokalyx umgeben, einer Kapsel oder Schleimhülle, welche aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden aufgebaut ist, die kovalent mit den Membranproteinen und Membranlipiden verbunden sind. An die Proteine und Lipide der Glykokalyx sind

N-Acetylneuraminsäurereste gebunden, wodurch die Glykokalyx auf ihrer Oberfläche negativ Ladungen trägt.⁵ Hierdurch kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung, die eine Adhäsion der ruhenden Plättchen aneinander sowie an das, an seiner Oberfläche ebenfalls negative Ladungen tragende, Endothel verhindert.

Die Zytoplasmamembran besteht aus einer polarisierten Phospholipidschicht, in welche die verschiedenen Membranproteine eingebettet sind. Innerhalb der Plasmamembran sind die Phospholipide asymmetrisch verteilt. Neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin (Lecithin) und Phosphatidylethanolamin sind nach außen, negative Ladungen tragende Phospholipide wie Phosphatidylinositol und Sphingomyelin nach innen gerichtet. Dieser asymmetrische Aufbau der Plasmamembran ist ein bedeutender Faktor für die Plättchenfunktion.⁶ Die Organisation der Phospholipide verändert sich während der Plättchenaktivierung, wodurch die anionischen Phospholipide mehrere Schritte in der Plasmakoagulation beschleunigen.⁷

In die Plasmamembran der Thrombozyten ist eine Vielzahl von Proteinen eingebettet, die Rezeptoren für Agonisten und für Adhäsionsproteine darstellen. Hierzu gehören die Rezeptoren für ADP und Thrombin oder Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor.

1.1.2.2 Strukturelle Zone

Die strukturelle Zone liegt unter der Plasmamembran der Thrombozyten und bildet ein Netzwerk aus Mikrotubuli und verschiedenen anderen Strukturproteinen.⁸ Die Komponenten der strukturellen Zone halten die diskoidale Form des ruhenden Thrombozyten aufrecht und sind aktiv an der Formveränderung der Thrombozyten auf ihre Aktivierung hin beteiligt. Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht zu 15 – 20 % aus Aktin und Aktin-Bindungsproteinen. Nach der Aktivierung des Blutplättchens und dem darauf folgenden intrazellulärem Ca^{2+} Anstieg polymerisiert das lösliche monomere G-Aktin zu seiner Filament-Form (F-Aktin). Das Aktin ist im Zytoplasma mit Myosin assoziiert. Eine Aktivierung der Thrombozyten führt zu der

Bildung von Filamenten aus Aktin und Myosin. Diese besitzen eine Verbindung zu den Zellorganellen und reorganisieren diese während des Aktivierungsvorganges.

1.1.2.3 Zone der Organellen

Das Zytoplasma mit seinen Mitochondrien, Glykogenspeichern und drei verschiedenen Speichergranula (dichte Granula, α -Granula und lysosomale Granula) stellt die Zone der Organellen dar. Die Granula dienen als Speicher für Proteine und andere für die Plättchenfunktion essentielle Substanzen und sind charakteristisch für die Blutplättchen. In den dichten Granula werden verschiedene niedermolekulare Verbindungen wie ADP, ATP, Ca^{2+} und Serotonin gespeichert. Die zahlenmäßig am häufigsten vorhandenen α -Granula beinhalten eine Reihe von Proteinen, die verschiedene biologische Funktionen wie die Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Entzündung und Wundheilung beeinflussen. Hydrolytische Enzyme sind in den lysosomalen Granula gespeichert, die den Lysosomen anderer Zellen ähneln. Einige der Inhaltsstoffe der Granula werden bereits in den Megakaryozyten synthetisiert, während andere aus dem Blutplasma in die Granula aufgenommen werden.⁹ Auf die Aktivierung der Blutplättchen hin fusionieren die Granula mit der Plättchenmembran und schütten ihre Inhaltsstoffe aus.

Dichte Granula	ATP, ADP, Ca^{2+} , Serotonin, Phosphat, Guaninnukleotide
α-Granula	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enzyme α_1-Antitrypsin, α_2-Makroglobulin, α_2-Antiplasmin, C1-Esterase-Inhibitor ▪ adhäsive Proteine Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Vitronectin, Glykoprotein IIb-IIIa ▪ Wachstumsfaktoren platelet-derived growth factor, Transforming growth factor β, Epidermal growth factor, Endothelial cell growth factor ▪ Koagulationsfaktoren HMWK, Plasminogen, PAI-1, Faktor V, Faktor XI, Fibrinogen, Protein S ▪ zytokinähnliche Proteine Interleukin 1, CD-40 Ligand, Plättchenfaktor 4, β-Thromboglobulin, Elastase, Kollagenase, Kathepsin,
Lysosom	α -Arabinosidase, β -Galactosidase, β -Glucuronidase, N-Acetylglucos-aminidase, Elastase, Kollagenase, Kathepsin

Tabelle 1.1 Übersicht über Granula der Blutplättchen

1.1.2.4 Membransysteme

Das Membransystem besteht aus einem offenen kanalikulären System ("surface-connected open canalicular system", SCCS) und dem dichten tubulären System ("dense tubular system", DTS). Es stellt bis weit in das Innere der Thrombozyten reichende gewundenen Kanälen dar. Diese sind mit der Plasmamembran verbunden und vom Extrazellulärraum durch Poren zugänglich. Das DTS ist ein Abkömmling des rauen ER der Megakaryozyten und ein Hauptspeicherort für Kalziumionen (Ca^{2+}). Ca^{2+} spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der Plättchenaktivierung. Steigt der Ca^{2+} -Spiegel über eine bestimmte Schwelle, so kommt es zu einer Formveränderung der Thrombozyten mit der Bildung von Pseudopodien und Degranulierung.

1.1.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase

1.1.3.1 Plättchenadhäsion, -aktivierung und -aggregation

Unter physiologischen Bedingungen stellen die Blutplättchen die Integrität der Gefäßwände nach einer Verletzung wieder her und verhindern Blutungen nach einer Gewebsverletzung. Eine Verletzung der Gefäßwand führt zu der Freilegung extrazellulärer Matrixproteine und zu der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten.^{10, 11} Kollagen, der an Kollagen gebundene von-Willebrand-Faktor, Laminin und Fibronectin stellen die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix dar, an die sich die Blutplättchen binden. Die Adhäsion beginnt mit dem Scheren und Rollen der Plättchen über den Kollagen-vWF-Komplex in der extrazellulären Matrix und ist abhängig von der Bindung des GPIIb/IIIa an den vWF. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Adhäsion an Kollagen durch das Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt wird, mit GPVI als zentraler Rezeptor für die Aktivierung der adhärenen Blutplättchen.¹² Die Aktivierung der Plättchen führt zu der Formveränderung und Ausbreitung entlang der Kollagenfasern. Eine Sekretion von ADP und TxA_2 rekrutiert weitere Blutplättchen an den Ort der Verletzung.

Daher beginnt die Plättchenaktivierung mit der Bindung adhäsiver Liganden wie Kollagen und vWF und excitatorischer Agonisten wie dem von vaskulären Zellen und den Plättchen ausgeschüttetem ADP, dem in Thrombozyten synthetisierten TxA_2 und dem an der Membran stimulierter Plättchen generiertem α -Thrombin, welche die Plättchenrezeptoren aktivieren. Die Aktivierung wird durch intrazelluläre Signalwege weitergeleitet und führt zur Aktinpolymerisierung und einer Reorganisation des Zytoskeletts, Sekretion der Speichergranula und dem darin enthaltenen Kalzium, vWF, ADP und P-Selektin. Hierdurch kommt es zu einer Verstärkung der Aktivierung und Aggregation und zu der Präsentation von Phosphatidylserin, welches wiederum die prokoagulierende Aktivität verstärkt und den Thrombus weiter stabilisiert. Durch die Aggregation kommt es zu der Akkumulation von Plättchen an den hämostatischen Thrombus. Die Aggregation wird durch das aktivierte Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ vermittelt. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der stabilen Adhäsion und Bindung von Fibrinogen, vWF und Fibronektin und ist daher von großer Bedeutung für die Interaktionen zwischen den Blutplättchen und der stabilen Plättchenaggregation.

1.1.4 Oberflächenrezeptoren

1.1.4.1 Integrine

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren. Adhäsionsrezeptoren verbinden das Zytoskelett einer Zelle mit der extrazellulären Matrix. Sie sind mit den intrazellulären Signalwegen verbunden und an der Plättchenaktivierung beteiligt. Integrine sind aus je einer α - und β -Untereinheit bestehende Heterodimere. Ihre Klassifizierung erfolgt anhand der β -Kette. Diese paart sich mit einer spezifischen α -Kette, wodurch ein funktioneller Rezeptor gebildet wird. Zu den bisher auf der Oberfläche der Thrombozyten beschriebenen Integrinen gehört das Glykoprotein Ib-V-IX, welches mit dem von-Willebrand-Faktor interagiert und den ersten Kontakt zwischen dem zirkulierenden Blutplättchen und der Zellwandläsion herstellt, die Kollagenrezeptoren Glykoprotein IV und VI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ sowie der Fibrinogen

Rezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Weitere Adhäsionsrezeptoren, die mit der extrazellulären Matrix interagieren, sind der Fibronectin Rezeptor Integrin $\alpha_5\beta_1$ und die Rezeptoren für Vitronectin (Integrin $\alpha_v\beta_3$) und Lamin (Integrin $\alpha_6\beta_1$). β_1 - und β_2 -Integrine erkennen ihre spezifischen Glykoproteine anhand einer der Arginin-Glyzin-Aspartat (RGD)-Aminosäuresequenz. Diese RGD-Sequenz ist Bestandteil einer Vielzahl extrazellulärer Matrixproteine.

1.1.4.1.1 Glykoprotein Ib-V-IX

Das Glykoprotein Ib-V-IX ist durch seinen Leuzin-Reichtum gekennzeichnet und besteht aus vier Untereinheiten: GPIb α (150 kDa), GPIb β (27 kDa), GPV (82 kDa) und GPIX. Die GPIb α -Untereinheit spielt die zentrale Rolle in der Rezeptorfunktion des Glykoprotein Ib-V-IX. Im Bereich seiner extrazellulären Domäne besitzt GPIb α Bindungsstellen für den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombin, wodurch das Glykoprotein Ib-V-IX ebenfalls eine Rolle in der Thrombin-induzierten Signalübermittlung hat.¹³ GPIb α und GPIb β sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Ein GPIb-Molekül bindet nicht kovalent an eine GPIX-Untereinheit. Die zentrale Einheit des Rezeptorkomplexes bildet die GPV-Untereinheit. Um diese sind je zwei GPIb-GPIX-Komplexe gruppiert. Bei der autosomal-rezessiv vererbten hämorrhagischen Thrombozytendystrophie, dem Bernard-Soulier Syndrom, liegt eine Dysfunktion des Glykoprotein Ib-V-IX vor. Hierdurch kommt es zu einer verlängerten Blutungszeit und einer verminderten Zahl und vergrößerten Blutplättchen (Makro-Thrombozytopenie).¹⁴

Die Hauptaufgabe des Glykoprotein Ib-V-IX besteht in der Adhäsion der zirkulierenden Thrombozyten an den in Kollagenfibrillen immobilisierten von-Willebrand-Faktor des freiliegenden Subendothels entgegen der hohen Scherkräfte des Blutstroms. Diese Interaktion zwischen dem freiliegenden von-Willebrand-Faktor und dem Glykoprotein Ib-V-IX ist allerdings nicht ausreichend um die Blutplättchen fest an die subendotheliale Matrix zu binden. Stattdessen kommt es durch die Interaktion zwischen dem Glykoprotein Ib-V-IX und dem Subendothel zu einem langsameren Rollen der Thrombozyten über die thrombogene Oberfläche.¹⁵

Steigen die Scherkräfte an, so kommt es auch zu einer gesteigerten Adhäsion der Blutplättchen an die thrombogene Oberfläche. Dieser Anstieg der Glykoprotein Ib-V-IX-vWF Interaktion ist höchstwahrscheinlich auf eine scherkraftinduzierte Konformationsänderung des Glykoprotein Ib-V-IX und des vWF zurückzuführen.¹⁶ Durch die Interaktion zwischen Glykoprotein Ib-V-IX und vWF kommt es zu der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wodurch das Blutplättchen stabiler an die subendotheliale Matrix adhären kann. Anschließend binden die aktivierten Integrine an das Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor und tragen so zu der Thrombusbildung bei.¹⁷

Verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, daß das Glykoprotein Ib-V-IX neben dem vWF noch andere Liganden bindet. Bei einer sehr hohen P-Selektin Expression auf der Oberfläche der Blutplättchen binden Leukozyten aus dem Blutstrom heraus an die Thrombozyten. Die Leukozyten wandern anschließend durch den Thrombus in das darunter liegende Gewebe ein.¹⁸ Daneben soll der Glykoprotein Ib-V-IX Komplex eine Rolle in Entzündungsreaktionen spielen und hierbei als Rezeptor für endotheliales P-Selektin dienen.¹⁹

1.1.4.1.2 Glykoprotein VI

Das Glykoprotein VI (GPVI) ist ein Kollagenrezeptor mit einem Gewicht von 62 kDa und neben dem Integrin $\alpha_2\beta_1$ wesentlich an der Plättchenadhäsion an Kollagen beteiligt. Zwar ist die direkte oder indirekte Bindung von Kollagen an die aktivierten Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ ausreichend um die rollenden Plättchen fest adhären zu lassen, GPVI spielt hier jedoch eine wichtige Rolle. GPVI ist für die Aktivierung der Integrine verantwortlich. Die stabile Adhäsion an Kollagen unter hohen Scherkräften benötigt die von GPVI ausgehenden und von ADP, TxA₂ und dem entstehenden Thrombin verstärkten intrazellulären Signalwege. Hinweise hierauf erhielt man durch Versuche mit GPVI - FcR γ -defizienten Blutplättchen. Ihre verminderte Adhäsion an Kollagen unter Fluß wurde durch die Zugabe von Mn²⁺ wiederhergestellt, das die Integrine direkt aktiviert.¹²

Die Expression von GPVI ist auf Megakaryozyten und Blutplättchen beschränkt. Die extrazelluläre Region des Glykoprotein VI besteht aus Immunglobulin C2-ähnlichen Domänen, einer Muzin-ähnlichen Serin/Threoninreichen Region, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Teil von 51 Aminosäuren (AS) Länge mit einer Calmodulin-Bindungsstelle.²⁰ Das GPVI bildet mit dem Fc Rezeptor (FcR) einen Komplex, wobei zwischen der Transmembrandomäne des Glykoprotein VI und der γ -Kette der Transmembrandomäne des Fc Rezeptors eine Salzbrücke gebildet wird, welche für die GPVI - FcR γ -Kette Komplexbildung erforderlich ist. Die Ausbildung des GPVI - FcR γ -Kette-Komplexes ist entscheidend für die Bindungsaktivität des Glykoprotein VI gegenüber Kollagen.^{21, 22} Die Stärke der intrazellulären Signale auf eine Ligandenbindung an das Glykoprotein VI hin hängt davon ab, inwieweit der Ligand fähig ist GPVI quer zu vernetzen und die Rezeptoren zu verknüpfen.²³ Die Quervernetzung von GPVI führt zu der Tyrosinphosphorylierung der ITAM (Immunreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) Domäne in der FcR γ -Kette durch die Src Kinasen Fyn und Lyn. Hierdurch kommt es zu der Bindung und Aktivierung der Src Tyrosinkinase, wodurch stromabwärts PLC γ und PI3K aktiviert werden.

1.1.4.1.3 Integrin $\alpha_2\beta_1$

Der erste bedeutende Rezeptor auf der Plättchenoberfläche, der als Kollagenrezeptor beschrieben wurde, war Integrin $\alpha_2\beta_1$. Er ist nicht nur an der Adhäsion der Plättchen an Kollagen, sondern auch an der Kollagen-induzierten Signaltransduktion beteiligt.²⁴⁻²⁷ Die Bindung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ an Kollagen wird durch verschiedene Agonisten verstärkt²⁸, wobei ADP hier eine wichtige Rolle in den direkten Signalwegen spielt.²⁹ Es wurde zunächst davon ausgegangen, daß Integrin $\alpha_2\beta_1$ derjenige Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche ist, der die wichtigste Rolle für die Adhäsion und Aktivierung der Plättchen spielt. Integrin $\alpha_2\beta_1$ stimuliert keine Tyrosinkinase-Aktivität, welche für die Kollagen-induzierte Aktivierung der Plättchen nötig wäre. Daher wurde ein „two step two sites“ Modell vorgeschlagen,

demzufolge die Plättchen zuerst mittels $\alpha_2\beta_1$ an das Kollagen binden und erst danach über einen zweiten Rezeptor aktiviert werden.³⁰ Man hielt zunächst GPVI für diesen zweiten Rezeptor.. Neuere Studien weisen darauf hin, daß die Affinität von Integrin $\alpha_2\beta_1$ gegenüber Kollagen sich erst nach der Plättchenaktivierung ändert.²⁹ Diese Ergebnisse unterstützen ein Modell nachdem die Blutplättchen über eine Kollagen - GPVI Interaktion aktiviert werden.³¹ Weder Integrin $\alpha_2\beta_1$ noch GPVI reichen bei starken Scherkräften aus um die Blutplättchen sicher zu adhären und sowohl der GPIb Komplex als auch der von-Willebrand-Faktor im Blutplasma sind wichtig für die Plättchen-Kollagen Interaktion.

1.1.4.1.4 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein heterodimerer Typ I Transmembranrezeptor und besteht aus einer β_3 -Kette mit einem Gewicht von 90 kDa und einer α_{IIb} -Kette mit 148 kDa. Die α_{IIb} -Kette ist aus einer leichten Kette von 23 kDa und einer schweren Kette mit 125 kDa aufgebaut. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist mit einer Zahl von 60.000 - 100.000 Kopien auf der Plättchenoberfläche vertreten und macht 1 - 2% des Gesamtproteingehalts aus. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist das einzige Integrin, das nur auf Thrombozyten vorkommt. Etwa 70% der Rezeptoren werden konstitutiv auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert. Die restlichen 30% werden erst auf die Aktivierung der Thrombozyten hin aus ihrem Speicherort, dem offenen kanalikulären System und den α -Granula, an der Oberfläche exprimiert. Beim Morbus Glanzmann-Naegeli liegt ein Funktionsdefekt des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vor. Dies führt zu Aggregationsdefekten und einer erhöhten Blutungsneigung.

Die Hauptaufgabe von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ besteht in der Bindung von löslichem Fibrinogen an die Oberfläche der aktivierten Thrombozyten, dem ersten Schritt der primären Aggregation. Es werden drei Funktionszustände für den Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unterschieden. Im *niedrigaffinen Funktionszustand* liegt der Rezeptor unter physiologischen Bedingungen in nicht aktivierter Form auf der Oberfläche der Thrombozyten vor. In diesem Zustand kann Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nur an immobilisiertes aber nicht an gelöstes Fibrinogen binden. Auf die Aktivierung der

Thrombozyten hin kommt es zu einer schnellen Konformationsänderung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und zu der Freilegung hochaffiner Fibrinogenbindungsstellen. Hierbei spricht man vom *aktivierten hochaffinen Funktionszustand*. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ erkennt zwei bestimmte Aminosäuresequenzen in der α - und γ -Kette des Fibrinogens. Zum einen ist es die RGD-Sequenz in der α -Kette und zum anderen die KQAGDV-Sequenz am N-Terminus der γ -Kette des Fibrinogens.³² Die Bindung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ an Fibrinogen ist Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängig. Nach der Adhäsion des Plättchens an Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor werden morphologische Veränderungen in Gang gesetzt, welche durch die kleinen GTPasen Rho A, Rac1 und Cdc42 vermittelt werden.

Der *ligandenbesetzte Funktionszustand* ist erreicht, sobald sich das lösliche Fibrinogen an den Rezeptor gebunden hat. Nach der Ligandenbindung geben die Integrine über den Prozeß des „outside-in signaling“ extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiter.³³ Das „outside-in signaling“ beginnt nach der Bindung des Fibrinogens und der Clusterbildung der Integrine mit der Src-Kinase Aktivierung. Die Aktivierung der konstitutiv an die β_3 -Kette gebunden Src-Kinase³⁴ wird durch die Proteinkinase Csk vermittelt, die c-Src am Tyr⁵²⁹ phosphoryliert. Durch die Cluster-Bildung der Integrine wird c-Src zusätzlich am Tyr⁴¹⁸ autophosphoryliert. Dies führt zu der Dissoziation von Csk von c-Src und der Rekrutierung von PTP-1B, das c-Src an Tyr⁵²⁹ dephosphoryliert.³⁵ Nach der c-Src Aktivierung wird Syk zu dem β_3 -Schwanz rekrutiert und durch c-Src aktiviert. Nachfolgend phosphorylieren Src/Syk die Adaptermoleküle SLP-76 und ADAP sowie Vav, FAK, PLC γ und α -Aktinin, welche einen Einfluß auf die Aktindynamik und Reorganisation haben.³⁶

Dem „outside-in signaling“ steht der Prozeß des „Inside-out signaling“ gegenüber. Hierbei erhalten die Integrine Signale von innerhalb der Zelle, welche zu einer erhöhten Affinität der Integrine gegenüber von Liganden führen. Das „Inside-out signaling“ kann durch lösliche Agonisten wie ADP, Thrombin und TxA₂ und durch Adhäsionsrezeptoren wie den GPIb Komplex und GPVI ausgelöst werden. Die Signale werden durch PKC, PI3K und Rap1b vermittelt und über sekundäre Botenstoffe wie Ca^{2+} und Tyrosinkinasen weitergeleitet.^{33, 37}

1.1.4.2 Rezeptoren für Agonisten

Im Fall einer Verletzung der Blutgefäßwand kommt es im Bereich der Wunde zu der Sekretion einer Reihe löslicher Agonisten. Zu diesen gehören Thrombin, ADP, Epinephrin und TxA₂. Bei Thrombin handelt es sich um den stärksten Agonisten für Blutplättchen.

1.1.4.2.1 Thrombinrezeptoren

In der plasmatischen Blutgerinnung stellt Thrombin als stärkster Plättchenaktivator *in vitro* und *in vivo*³⁸ das wichtigste Enzym dar. Thrombin ist eine Serinprotease und entsteht aus Prothrombin. Neben den Blutplättchen wirkt Thrombin auf eine Vielzahl anderer Zelltypen wie Neuronen, Endothelzellen oder Leukozyten ein. Es induziert die Formveränderung der Blutplättchen, aktiviert die Integrine, fördert die Sekretion und die Ausschüttung von TxA₂ und stimuliert die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche.

Die Wirkung von Thrombin wird über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) auf der Oberfläche der Thrombozyten vermittelt. Bisher wurden vier PARs entdeckt (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4), wobei nur PAR2 nicht durch Thrombin, sondern durch Trypsin aktiviert wird. PARs gehören zu einer Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sie werden durch einen einzigartigen Mechanismus aktiviert, bei dem es zu einer proteolytischen Spaltung in der ersten extrazellulären Schleife kommt. Durch diese Spaltung wird ein neuer N-Terminus freigesetzt. Dieser dient intramolekular als neuer Ligand für den Rezeptor und beeinflusst die transmembranäre Signalweitergabe.³⁹ Daher tragen PARs ihren eigenen Liganden, der erst aktiv wird, nachdem der Rezeptor gespalten wurde.

Die PAR Rezeptoren sind an G-Proteine der G_{α12/13} und G_{αi} Familien gekoppelt. G_{αi} inhibiert die Adenylatzyklase (AC). Dies hat einen Abfall des cAMP Spiegels zur Folge und steigert die Empfindlichkeit der Plättchen. Die G_{qα} Untereinheit aktiviert PLC β , wodurch es zu einem Anstieg von 1,4,5-Inositol Triphosphat (IP₃) und zytosolischem Kalzium kommt. Gleichzeitig kommt es zu

einem Anstieg des PKC aktivierenden Diacyglyzerols (DAG). Das Kalzium reguliert Kinasen, Tyrosinkinasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und die Integrinaktivierung.⁴⁰ Die $G_{\alpha_{12/13}}$ Untereinheiten sind an den Guaninnukleotid Austauschfaktor (guanine-nucleotide exchange factor [GEF]) gekoppelt, der die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 aktiviert. Mit der Hilfe des aktivierten PI3-K kommt es dadurch zu der Reorganisation des Zytoskeletts und somit zu der Formveränderung, Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen.⁴¹

1.1.4.2.2 ADP-Rezeptoren

Das Adenosindiphosphat (ADP) ist ein wichtiger autokriner Agonist. Er wird aus den dichten Granula sezerniert. Die ADP-Rezeptoren gehören zu der P2 Rezeptorfamilie. Diese wird in zwei Klassen von Rezeptoren unterteilt, den P2Y G-Protein gekoppelten Rezeptoren und den P2X Kationenkanälen. Die Blutplättchen besitzen P2Y₁ und P2Y₁₂ Rezeptoren, welche durch ADP aktiviert werden und die durch Adenosintriphosphat (ATP) aktivierten P2X₁ Rezeptoren. ADP Bindung an den G_qα gekoppelten P2Y₁ Rezeptor führt zu der Mobilisierung des Kalziums innerhalb der Zelle und der Formveränderung und Aggregation des Blutplättchens.⁴² Der P2Y₁₂ Rezeptor ist G_iα gekoppelt und für die vollständige Aggregation verantwortlich. Er spielt eine zentrale Rolle in der Verstärkung der Aggregation und der durch alle bekannten Plättchenagonisten induzierten Sekretion. P2Y₁₂ inhibiert die cAMP Produktion und aktiviert PI3K und Rap1b. Für die normale ADP induzierte Aggregation ist die Co-Aktivierung von P2Y₁ und P2Y₁₂ notwendig. P2Y₁ spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle, wenn die Plättchen durch einen anderen Agonisten als Kollagen aktiviert werden.⁴³ Die Stimulation von P2X₁ mit ATP induziert einen schnellen Kalziumeinstrom, der mit einer transienten Formveränderung des Blutplättchens einhergeht und an der durch Kollagen und Scherstreß induzierten Aggregation Teil hat.⁴⁴

1.1.4.2.3 Weitere Agonisten

Neben den Agonisten Thrombin, ADP, Epinephrin und TxA_2 gibt es noch eine Reihe neuer, funktionell weniger untersuchte Thrombozyten Agonisten wie das über CLEC-2 wirkende Podoplanin und Adiponektin.⁴⁵⁻⁴⁷

1.2 Insulin

Insulin ($\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$) ist ein relativ kleines Polypeptidhormon mit einem Gewicht von 5.805,841 Dalton und nimmt eine Schlüsselstellung bei der Integration des Glukosemetabolismus ein. Allgemein regt Insulin anabole Prozesse in Muskulatur, Leber und Fettgewebe an, während es katabole Prozesse hemmt. Viele der durch Insulin hervorgerufenen Effekte sind denen von Adrenalin und Glukagon entgegengesetzt. Während Adrenalin und Glukagon einen Glukosemangel anzeigen, signalisiert Insulin einen Glukoseüberschuß. Insulin wird von den β -Zellen des Pankreas sezerniert und ist der wichtigste Regulator des Energiestoffwechsels. Der normale physiologische Blutwert des Insulins liegt nach 12stündigem Fasten bei ca. 36 - 150 pM und steigt nach Nahrungsaufnahme bis zu einem Maximalwert von 1.200 pM an.⁴⁸

Frederick Sanger beschrieb 1955 als erster die Struktur des Insulins.⁴⁹ Dieses besteht aus zwei Ketten, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Insulin entsteht über mehrere Zwischenschritte aus dem Prä-Proinsulin. Eine Sequenz von 16 aminoterminalen Aminosäureresten stellt eine Signalpeptid dar, welche das neu synthetisierte Prä-Proinsulin zu dem rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) dirigiert. Nach dem Übergang des Prä-Proinsulins in das Lumen des rauen ER wird das Signalpeptid abgespalten. Im Lumen des rauen ER faltet sich das Proinsulin zu dem inaktiven Proinsulin. Eine Sequenz von 30 Aminosäureresten innerhalb des Proinsulins, das so genannte C-Peptid, verknüpft das Carboxylende der B-Kette mit dem Aminoende der A-Kette des künftigen Insulin-Moleküls. Nach der Faltung wird das Proinsulin in den Golgi-Apparat transportiert und weiter prozessiert. Das C-

Peptid wird hierbei abgespalten. In den Vesikeln des Golgi-Apparats werden die Insulin Moleküle durch Zink-Ionen zu Hexameren gebunden und gespeichert. Die gespeicherten Insulinmoleküle werden durch Exozytose aus den β -Zellen in den Extrazellulärraum und weiter in den Blutkreislauf freigesetzt.

Insulin signalisiert den Sättigungszustand. Es regt die Speicherung von Energieträgern und die Proteinsynthese über mehrere Mechanismen an. Während Insulin die Glykogensynthese in Muskulatur und Leber beschleunigt, hemmt es die Glukoneogenese in der Leber, indem es den Spiegel von Enzymen wie der Pyruvat-Carboxylase und Fructose-1,6-Biphosphatase senkt. Insulin beschleunigt die Glykolyse in der Leber, wodurch die Fettsäuresynthese gesteigert wird und fördert den Eintritt von Glukose in Fett- und Muskelzellen. Dies führt zu der Senkung des Blutglukosespiegels durch das Insulin.

Der Aminosäure- und Proteinstoffwechsel wird ebenfalls durch das Insulin beeinflusst. Die Aufnahme von verzweigtkettigen Aminosäuren wie Valin, Leuzin und Isoleuzin wird durch Insulin gefördert, wodurch es zu einer gesteigerten Synthese von Muskelproteinen kommt. Generell wirkt Insulin anregend auf die Proteinsynthese und hemmend auf den intrazellulären Proteinabbau.

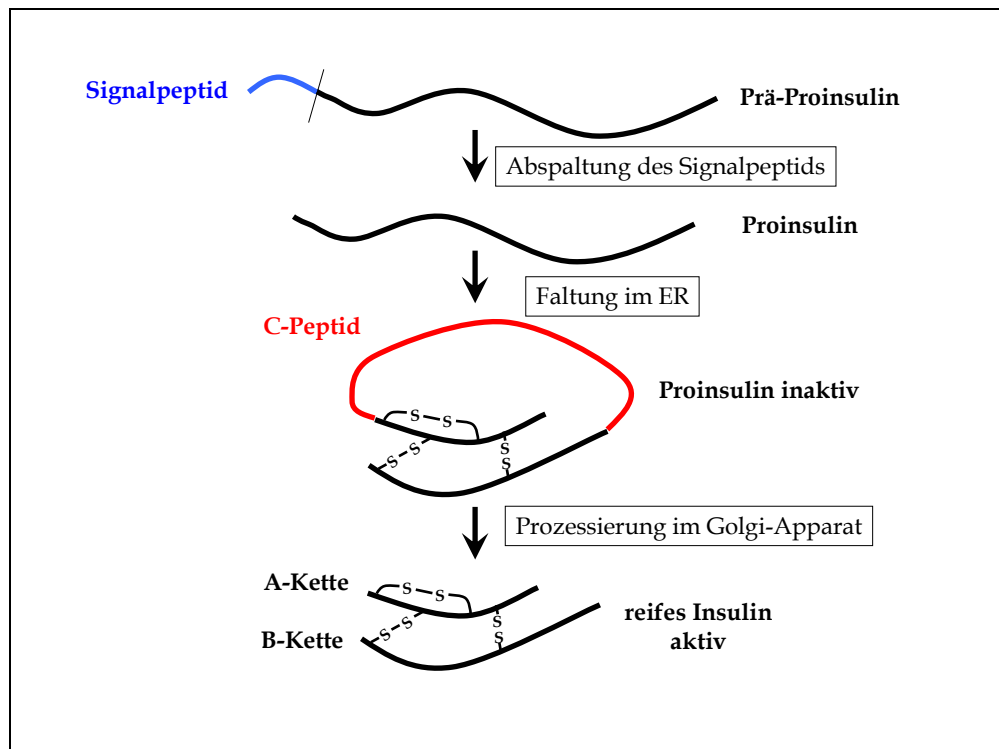


Abb. 1.3 Die Insulinbiosynthese. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird das Proinsulin im ER gefaltet und nach der Prozessierung im Golgi-Apparat unter Abspaltung des C-Peptids in reifes, aktives Insulin umgewandelt.

1.2.1 Der Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor (IR) ist ein heterodimeres Transmembrannglykoprotein bestehend aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 135 kDa und zwei transmembranären β -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 95 kDa. Die α - und β -Untereinheiten entstehen beide aus einem gemeinsamen 190 kDa Vorläufermolekül. Die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheit wird durch die α -Untereinheiten allosterisch gehemmt. Bindet Insulin an die α -Untereinheiten, so wird die Hemmung der Kinaseaktivität der β -Untereinheit aufgehoben, wodurch es zu der Autophosphorylierung und einer Konformationsänderung der β -Untereinheit kommt, welche die Kinaseaktivität weiter verstärkt. Über mehrere Zwischenschritte wird das Tyrosin 972 phosphoryliert, welches eine der Hauptbindungsstellen für Proteine der IR-Signalkaskade darstellt.⁵⁰ Zu den Proteinen, die mit dem Insulinrezeptor (IR)

interagieren gehören die Insulinrezeptor Substrate (IRS) 1 - 4, GAB, IRS5/DOK4 und IRS6/DOK5,⁵¹ die ihrerseits an Tyrosinen phosphoryliert werden, und somit Bindungsstellen für Proteine mit einer SH2-Domäne bieten.^{52, 53} Die wichtigsten Signalwege, die von den aktivierten IRS fortführen sind der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt/Proteinkinase B Signalweg, der für den Großteil der metabolischen Wirkungen des Insulins verantwortlich ist, und der Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg.⁵³ Dieser reguliert die Expression einiger Gene und reguliert zusammen mit dem PI3K Signalweg das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung.

PI3K ist ein wichtiger Knotenpunkt in der Insulininduzierten Signaltransduktion. Der PI3K Signalweg führt über die Phosphorylierung von PDK-1 und Aktivierung von Akt/PKB und PKC ζ ^{54, 55} u. A. zu der GLUT4 Translokation an der Plasmamembran.⁵⁶ Akt/PKB reguliert ebenfalls die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3).⁵⁷ Die Phosphorylierung von GSK3 senkt seine Aktivität gegenüber der Glykogen Synthase, wodurch es zu einem Anstieg der Glykogensynthese kommt.⁵⁸ Ein weiteres Ziel von Akt/PKB ist Tuberin (TSC2), das zusammen mit Hamartin (TSC1) einen Komplex bildet.⁵⁹ Der TSC1/2 Komplex inhibiert mTOR (mamalian target of rapamycin). Die negative Regulierung von TSC1/2 durch Akt/PKB aktiviert den mTOR Signalweg.

Über das mit dem Insulinrezeptor assoziierte SHC (SH2-containing) Protein und das sowohl mit dem IR als auch mit den IRS Molekülen assoziierte Grb2 Protein wird der MAPK Signalweg aktiviert. Erk 1/2 MAPK sind an den Insulin induzierten metabolischen Reaktionen nur wenig beteiligt. Eine erhöhte basale MAPK Aktivität jedoch scheint zu der Entwicklung von Insulinresistenz beizutragen. Die P38 MAPK scheint hingegen ein positiver Regulator der Insulin induzierten Prozesse zu sein, da es die Aufnahme von Glukose durch den GLUT4 Transporter steigert.⁶⁰

Weitere Signalüberträger für den Insulinrezeptor stellen G-Proteine dar. G-Proteine sind Guaninnukleotid bindende regulatorische Proteine. Als molekulare Schalter wechseln sie zwischen dem GTP-gebundenen "An-Zustand" und dem GDP-gebundenen „Aus-Zustand“. G-Proteine verstärken, übermitteln und integrieren Signale innerhalb der Zelle. Die bei der Plättchenaggregation und -sekretion beteiligten G-Proteine sind G α , welches den Anstieg des zytosolischen Ca²⁺

vermittelt und $G_i\alpha$, das die Adenylatzyklase inhibiert und dadurch das Plättchen inhibierende cAMP verringert.⁶¹ Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die postulierten insulinvermittelten Signalwege.

Der Insulinrezeptor ist für Muskel-, Leber-, Fett- und Endothelzellen sowie für Lympho- und Erythrozyten beschrieben. Seine Existenz in der Zellmembran von Blutplättchen ist bestenfalls zweifelhaft. Erste Hinweise für seine Existenz auf Thrombozyten kamen von 1979 durchgeführten Untersuchungen, bei denen die Bindung von radioaktiv markiertem ^{125}I -Insulin an Plättchen gemessen wurde. Aufgrund der so gewonnenen Daten wurde die Zahl der Insulin Bindungsstellen auf ~ 570 geschätzt.⁶² Falcon *et al.* wiesen den IR auf Blutplättchen 1988 mittels Western Blot nach.⁶³ Bei diesem Experiment fehlte jedoch die Positivkontrolle.

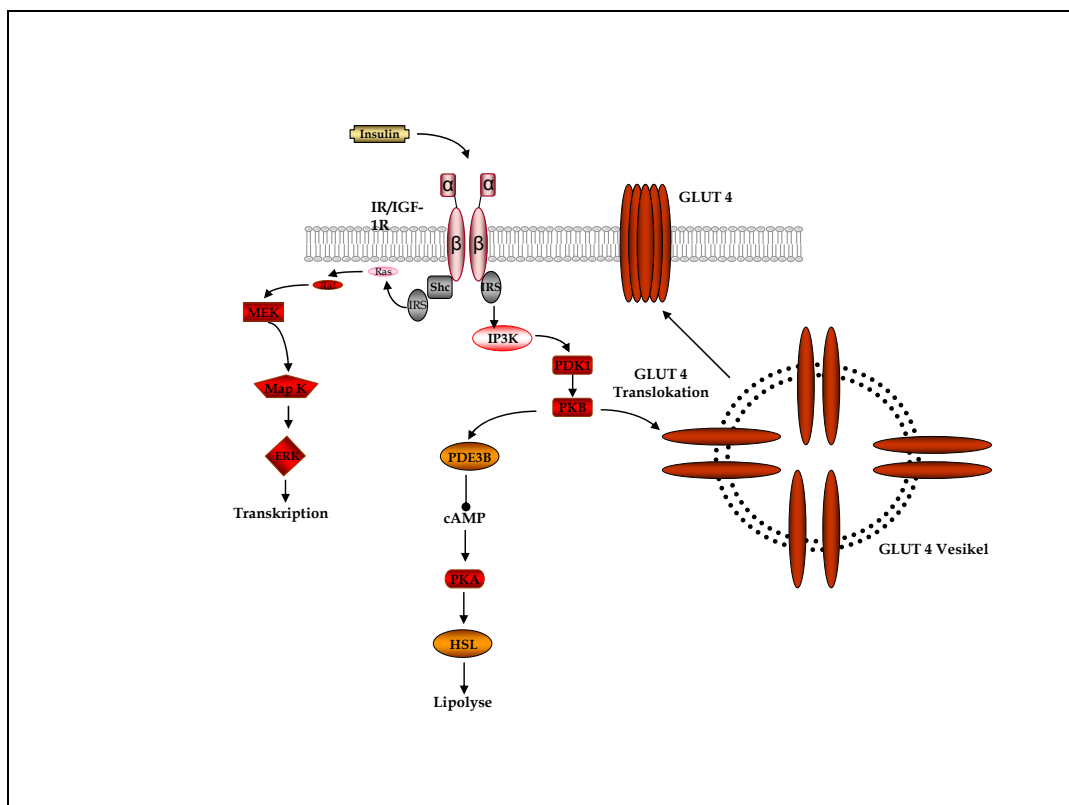


Abb. 1.4 Übersicht über einige der für das Insulin postulierten intrazellulären Signalwege.

1.2.2 Insulinwirkung auf Blutplättchen

Die Wirkung von Insulin auf Thrombozyten ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Während einige Publikationen eine aktivierende Wirkung des Insulins auf Thrombozyten demonstrieren, sprechen andere Autoren von einem inhibierenden Einfluß des Insulins.

Eine gesteigerte Aggregation der Blutplättchen nach Stimulation mit ADP und Insulin im Vergleich zu der Stimulation mit ADP allein wird von mehreren Autoren beschrieben.^{64, 65} Des Weiteren wird sowohl eine gesteigerte Aggregation wie auch ein Anstieg der Bindung der Blutplättchen an Fibrinogen nach Co-Stimulation mit ADP und Insulin demonstriert.⁶⁶ Weiterhin soll Insulin die Phosphorylierung und Aktivierung der cGMP-inhibierten cAMP Phosphodiesterase (cGI-PDE) in humanen Blutplättchen induzieren, wodurch es zu einem Rückgang von cAMP im Blutplättchen und zu einer Sensibilisierung der Thrombozyten gegenüber die Aggregation induzierenden Agonisten kommt.⁶⁷

Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen mit gegensätzlichen Ergebnissen. Bei Mäusen wurde eine durch Insulin bedingte verzögerte Aggregation und Akkumulation der Blutplättchen gezeigt.⁶⁸ Ähnliches berichten verschiedene Autoren in ihren Studien mit humanen Thrombozyten. Hier kam es zu einer verminderten Sensitivität der Blutplättchen gegenüber Agonisten wie ADP, dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) oder Kollagen.^{69, 70} Dieser antiaggregatorische Effekt des Insulins beruht laut Travoti *et. al.* auf einem Insulin induzierten Anstieg von cGMP.⁷¹ Ebenso wurde eine insulinbedingte Hemmung der durch Thrombin induzierten Aggregation beschrieben.⁷² Weiterhin wird beschrieben, daß Insulin eNOS in Blutplättchen aktiviert.⁷³ Hierdurch wird die NO Synthese in Blutplättchen angeregt, wodurch es zu einem Anstieg von cGMP und cAMP^{74, 75} und einer Hemmung der Plättchenaggregation kommt.^{74, 76}

Zusätzlich zu diesen Beobachtungen wird von anderen Autoren eine indirekte Wirkung des Insulins auf die Plättchenaggregation beschrieben. Mehrere Publikationen führen an, daß Insulin die Blutplättchen gegenüber Prostaglandin sensibilisiert, sodaß der der Aggregation entgegenwirkenden Effekt des Prostaglandins stärker zur Geltung kommt.⁷⁶⁻⁷⁹

Es gibt jedoch auch Hinweise auf ein Fehlen jeglicher Wirkung von Insulin auf Blutplättchen. Für Patienten mit Hyperinsulinämie konnte keine Veränderung der Blutplättchen im Verhalten gegenüber ADP und Thrombin beobachtet werden.⁸⁰ Hajek *et al.* und Motani *et al.* zeigten in ihren Studien, daß Insulin die Plättchenaggregation *in vitro* nicht beeinflusst.^{81, 82}

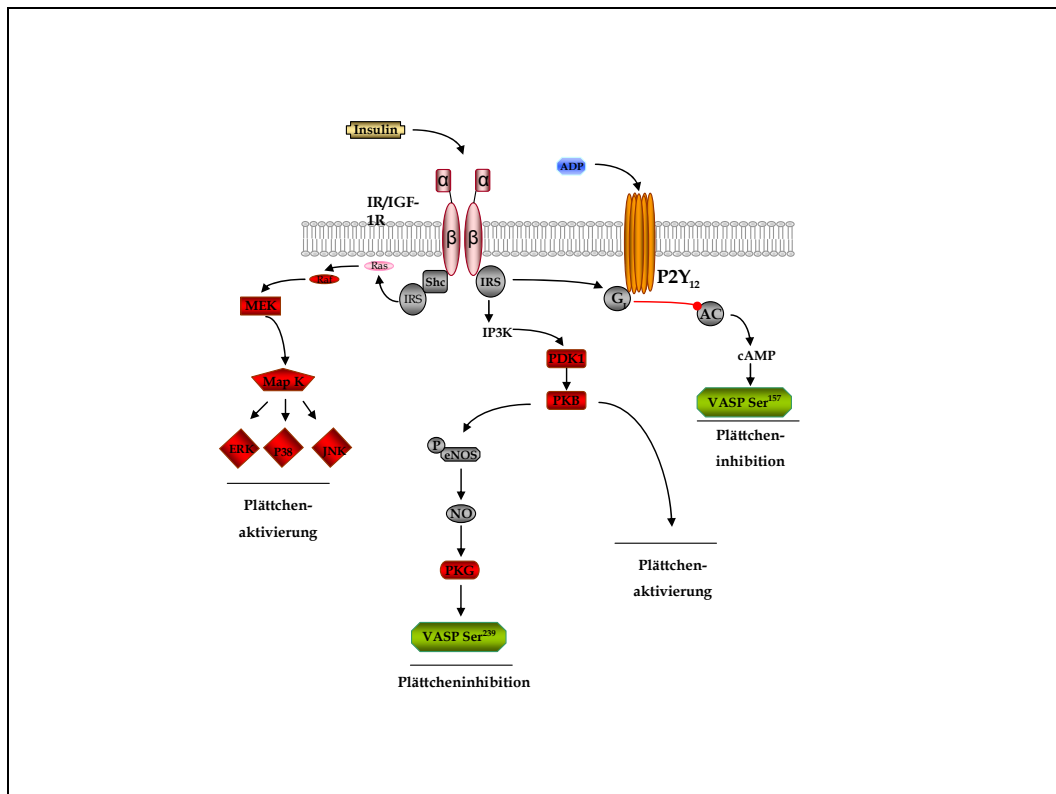


Abb. 1.5 Die für das Insulin postulierten intrazellulären Signalwege innerhalb des Blutplättchens

1.3 Diabetes mellitus

Bei der Diabetes mellitus handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung an der weltweit mehr als 170 Millionen Menschen leiden. Die WHO geht davon aus, daß die Anzahl der Erkrankungen bis zu dem Jahr 2010 um 50% zunehmen wird, mit dem größten Anstieg in den Schwellenländern Afrikas, Asiens und Süd-Amerikas.⁸³ In den Industrienationen liegt die Häufigkeit von Diabetes mellitus bereits bei 6% der Gesamtbevölkerung.⁸⁴ Unter den übergewichtigen weißen Erwachsenen leiden

etwa 4% an Diabetes und bei 25% wurde eine abnorme Glukosetoleranz festgestellt.⁸⁵ Der starke Anstieg der Diabetes-Erkrankungen, insbesondere der Typ 2 Diabetes, der Typ 1 ist weit weniger betroffen, in den Industrienationen nach dem Ende des Zweiten Weltkriegs ist vor allem auf Überernährung und Bewegungsmangel zurückzuführen. Diabetes mellitus wird nach den von der WHO 1999 aufgestellten Richtlinien diagnostiziert, wenn die Glukosekonzentration im venösen Plasma nach siebenstündigem Fasten oder zwei Stunden nach oraler Aufnahme von Glukose (75 g) 11,1 mM übersteigt.⁸⁶ Je nach den Ursachen der Erkrankung spricht man von Typ 1, Typ 2 oder den weit weniger häufigen Formen Typ 3 und Typ 4 Diabetes mellitus (Tabelle 1.2).

Neben einem erhöhten Blutzuckerspiegel gehören ein verstärkter Harndrang (Polyurie), juckende Haut (Pruritus), ein starkes Durstgefühl (Polydipsie), Abgeschlagenheit, chronische Infektionen und Sehstörungen zu den Anzeichen einer Diabetes.

-
- **Typ 1 Diabetes mellitus** absoluter Insulinmangel aufgrund meist autoimmuno-nologisch bedingter Zerstörung der Inselzellen des Pankreas
 - *Typ 1a*: immunologisch vermittelte Form
 - *Typ 1b*: idiopathische Form

 - **Typ 2 Diabetes mellitus** Insulinresistenz (Hyperinsulinismus), dadurch relativer Insulinmangel. In der Folge nachlassende (versagende) Insulinproduktion. Oft im Zusammenhang mit Übergewicht und Metabolischem Syndrom

 - **Typ 3 Diabetes mellitus** Andere spezifische Typen oder Typ-3-Diabetes mellitus

 - **Typ 4 Diabetes mellitus** Gestations- oder Schwangerschaftsdiabetes
-

Tabelle 1.2 Formen der Diabetes mellitus

Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erheblich größeres Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln als Patienten ohne Diabetes.⁸⁷ 90 % aller an Diabetes erkrankten Personen leiden am Typ 2 (nicht-Insulin-abhängige Diabetes). Dieser ist durch metabolische Veränderungen charakterisiert, die bereits mehrere Jahre vor dem Auftreten der Hyperglykämie präsent sind und meist mit erheblichen körperlichen Behinderungen des Erkrankten enden. Hierzu gehören eine herabgesetzte Insulinsekretion und eine erhöhte hepatischen Glukoseproduktion.⁸⁸ Typ 2 Diabetes entwickelt sich aus der Insulinresistenz. Viele der Symptome der Insulinresistenz, die vor dem Beginn der Hyperglykämie vorhanden sind, bleiben auch während der Erkrankung weiter bestehen und tragen zur Arteriosklerose und den mit ihr assoziierten Folgeerkrankungen bei.^{89, 90} Die Mortalität und Morbidität von Typ 2 Diabetes mellitus ist unter anderem mit koronaren Herzerkrankungen, kongestive Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod assoziiert.

Zu den Begleiterscheinungen der Typ 2 Diabetes gehören u. A. Bluthochdruck, Makro- und Mikroangiopathien, periphere und autonome Neuropathien, Dyslipidemie sowie eine Dysfunktion des Endothels. Anders als gesunde Menschen leiden Patienten mit Diabetes mit doppelter Wahrscheinlichkeit an Bluthochdruck.^{91, 92} Zusätzlich zeigen 30% bis 50% der Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus Abweichungen bei den im Blut zirkulierenden Lipiden.⁹³ Hierzu gehören niedrige HDL Cholesterinwerte, gesteigerte Triglyzeridwerte und ein Anstieg bei den Lipoproteinen geringer Dichte (low-density lipoproteins, LDL), die eine hohe atherogene Wirkung besitzen.⁹⁴ Eine verminderte Funktion des Endothels ist sowohl für Typ 1^{95, 96} als auch für Typ 2^{96, 97} Diabetiker und für übergewichtige, Insulin resistente Patienten beschrieben. Bei ihnen korreliert die Empfindlichkeit gegenüber Insulin mit dem Grad der endothelabhängigen Vasodilatation.⁹⁸ Diabetes mellitus führt zu einer veränderten Produktion von vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Substanzen, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasodilatation und Vasokonstriktion kommt. Diese Veränderungen manifestieren sich in einer verminderten biologischen Verfügbarkeit von NO,⁹⁹ einer herabgesetzten Produktion von Prostazyklin¹⁰⁰ und einer gestiegenen Produktion von Thromboxan,^{100, 101} Endothelin 1,¹⁰² und verschiedenen Zyklooxygenase-abhängigen Vasokonstriktoren.¹⁰⁰ Die verminderte biologische

Verfügbarkeit vaskulären NOs bei der Diabetes mellitus führt zu einer gesteigerten Plättchenaktivierung *in vivo*.¹⁰³⁻¹⁰⁶

1.4 Das Endothel

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, dessen schuppenartig angeordnete Zellen die Innenseite aller Blutgefäße auskleidet. Zusammen mit der Basalmembran bildet es die innere Schicht eines Blutgefäßes. Endothelzellen entstehen über verschiedene Differenzierungsschritte aus dem Mesoderm. Die Zellen des Endothels sind durch Zell-Zell Kontakte, den so genannten „tight junctions“, miteinander verbunden. Diese verhindern eine Diffusion von Substanzen zwischen den Zellen. In unterschiedlichen vaskulären Bereichen sind diese Verbindungen zwischen den Zellen unterschiedlich häufig sowie unterschiedlich dicht. In den Arterien sind die Zell-Zell Kontakte gewöhnlich impermeabel, während sie in den Kapillaren und Venolen vieler Organe permeabel sein können. Das Endothelgewebe ist eine spezialisierte Form des Epithels und an vielen vaskulären Funktionen beteiligt. Zu diesen gehören die Vasokonstriktion, Vasodilatation und somit die Kontrolle des Blutdrucks. Des Weiteren spielt das Endothel eine Rolle bei der Thrombenbildung und Fibrinolyse, Atherosklerose, der Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und Entzündungsreaktionen. Das Endothel kontrolliert die Passage von Molekülen und weißen Blutzellen in das zirkulierende Blut hinein und aus ihm heraus. In einigen Organen kommt dem Endothel eine gesonderte Filterfunktion zu. Hierzu gehören die Blut-Hirn Schranke, die den Übertritt der meisten Substanzen ins Gehirn blockiert und dadurch stärkere Schwankungen im Gehirnmillieu verhindert, und der Glomerulus im Nephron der Wirbeltiere. In ihm erfolgt die Ultrafiltration des Primärharns aus dem Blut.

In der Regulation der vaskulären Hämostase kommt dem Endothel eine Schlüsselrolle zu. Es dient nicht nur als Barriere, sondern auch als Signalüberträger für Kreislaufeinflüsse, die den Phänotyp der Gefäßwand verändern.¹⁰⁷ Das Endothel hält die Balance zwischen dem Fluß des Blutes und einer schnellen Thrombusbildung auf eine Verletzung hin aufrecht. Hierzu reguliert es den

Blutdruck und wirkt auf die Thrombozyten ein, indem es sowohl Plättchen-Aktivatoren, als auch Plättchen-Inhibitoren synthetisiert. Die vom Endothel ausgeschütteten Plättchen-Antagonisten Prostazyklin (PGI₂) und Stickstoff (NO) inhibieren die Plättchenfunktion indem sie den intrazellulären cAMP und cGMP Spiegel innerhalb der Thrombozyten anheben. Bereits ein geringer Anstieg des basalen cAMP führt zu einer Hemmung der Plättchenaktivierung.

1.5 eNOS

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) ist ein Multidomänenenzym. Es setzt sich aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne (AS 1 - 491) und einer C-terminalen Reduktase-Domäne (AS 492 - 1205) zusammen. Die Oxygenase-Domäne enthält Bindungsstellen für Häm, L-Arginin (Glu361)¹⁰⁸ und Tetrahydrobiopterin (BH₄), während die Reduktase Domäne Bindungsstellen für Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), NADPH und Calmodulin (CaM) beinhaltet.¹⁰⁹ Die funktionale eNOS ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, die beide sowohl myristyliert als auch palmityliert sind. Unter den basalen intrazellulären Ca²⁺ Konzentrationen der Endothelzellen (ca. 100 nM) ist eNOS bereits aktiv, wenn auch nicht vollständig. Durch einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, sei es durch den Einstrom extrazellulären Ca²⁺ oder durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wird das Enzym vollständig aktiviert.

eNOS stellt die wichtigste Quelle für endotheliales NO dar,^{110, 111} welches eNOS aus L-Arginin synthetisiert. Bei dieser komplexen Reaktion werden Elektronen vom NADPH über die Flavine FAD und FMN in die carboxy-terminale Reduktase Domäne und von dort in das Häm in der amino-terminalen Oxygenase Domäne transferiert. Das NO ist ein entscheidender Faktor für die normale Funktion des kardiovaskulären Systems. Zu seinen vielfältigen Aufgaben gehört die Regulation des vasomotorischen Tonus¹¹² und der Zelladhäsion an das Endothel,¹¹³ sowie die Hemmung der Plättchenaggregation.¹¹⁴ Bei Mäusen mit einem knock-out des

Insulinrezeptors der vaskulären Endothelzellen (vascular endothelial cell insulin receptor knockout [VENIRKO]) sank die eNOS Expression in der Aorta um 62%.¹¹⁵

Die eNOS Aktivierung wird durch Hormone wie Katecholamine und Vasopressin und von Thrombozyten ausgeschüttete Botenstoffe wie Serotonin und ADP über eine Rezeptor-vermittelte G-Protein Aktivierung stimuliert.¹¹⁶ Durch Insulin kommt es zu einer Aktivierung von eNOS^{117, 118} über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) Signalweg.¹¹⁹ Die Synthese von NO im Endothel wird außerdem durch Insulin über einen schnellen Translationsmechanismus¹²⁰ und die Induzierung der eNOS Genexpression¹²¹ gesteuert.

2. ZIEL DER ARBEIT

Die bisher veröffentlichten Daten zu der Wirkung des Insulins auf die Blutplättchen sind äußerst widersprüchlich. Sowohl aktivierende und inhibierende Effekte des Insulins auf die Thrombozyten als auch das Fehlen einer Reaktion der Blutplättchen auf Insulin wurden beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Beobachtungen überprüft und die akute Wirkung von Insulin auf die Blutplättchen detailliert untersucht werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war:

- Erforschung der Insulinwirkung auf die Blutplättchen unter physiologischen Glukosekonzentrationen.
- Erforschung der Insulinwirkung auf die Blutplättchen unter pathologischen Glukosekonzentrationen.
- Nachweis des Insulinrezeptors auf der Oberfläche der Thrombozyten.
- Erforschung eines Einflusses von Insulin auf die Wechselwirkungen zwischen dem Endothel und den Blutplättchen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 FACS Antikörper

Folgende Antikörper erhielten wir von Becton Dickinson Immunocytometry Systems (Heidelberg, Deutschland):

- PAC-1 FITC Antikörper
- CD62P FITC

3.1.1.2 Western Blot Antikörper

3.1.1.2.1 Primäre Antikörper

Folgende Antikörper erhielten wir von upstate (Hamburg, Deutschland), Cell Signalling (Heidelberg, Deutschland) und Nanotools (Freiburg, Deutschland).

- Anti-Insulin Receptor β subunit Rabbit upstate
- phospho AMPK α (Thr¹⁷²) Rabbit Cell Signalling

- phospho p44/42 MAP Kinase (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) Rabbit Cell Signalling
- phospho-IGF-1 Receptor (Tyr¹¹³¹)/
Insulin Receptor (Tyr¹¹⁴⁶) Rabbit Cell Signalling
- phospho ERK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) Rabbit Cell Signalling
- phospho eNOS (Ser¹¹⁷⁷) Rabbit Cell Signalling
- phospho PKB (Ser⁴⁷³) Rabbit Cell Signalling
- phospho P 38 (Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸²) Mouse Nanotools
- phospho VASP (Ser¹⁵⁷) Mouse Nanotools
- phospho VASP (Ser²³⁹) Mouse Nanotools
- phospho VASP (Thr²⁷⁸) Rabbit eigene Herstellung

3.1.1.2.2 Sekundäre Antikörper

- anti mouse HRP Goat BioRad
- anti rabbit HRP Goat BioRad

3.1.2 Proteinstandardart

- Protein Standard (MBI Fermentas)

3.1.3 Bakterien und Zellen

Für die Klonierungsschritte wurden E. coli XL-1 Blue Bakterienstämme verwendet. Die Bakterien wurden bei -70°C tief gefroren gelagert.

ECV 304 Zellen wurden als Positivkontrolle und zur Transfektion der hIR cDNA verwendet.

3.1.4 Chemikalien

- | | |
|------------------------------|------------|
| ▪ ADP | Sigma |
| ▪ Apyrase | Sigma |
| ▪ DAF-FM Diacetat | Invitrogen |
| ▪ Forskolin | Sigma |
| ▪ Insulin | Sigma |
| ▪ Metformin | Sigma |
| ▪ Newport Green DCF Diacetat | Invitrogen |
| ▪ SNP | Sigma |
| ▪ Thrombin | Roche |

3.1.5 Enzyme

Für die Restriktionsverdauung wurden Enzyme folgender Firmen verwendet:

New England Biolabs NEB

Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert.

3.1.6 Kits

Folgende Kits wurden verwendet:

- Qiagen® Plasmid Midi Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®)
- QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen®)
- OneStep RT-PCR Kit (Qiagen®)

3.1.7 Medien und Puffer

- Agarplatten
15g Agar
1l LB Medium
1 ml Ampicillin Lösung
- Ampicillin
50mg/ml in H₂O
(Roth)
gelagert bei -20°C
- D-MEM
Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO)
- Elektrophoresepuffer
25 mM Tris, pH 8.9
192 mM Glycin
0.1% (w/v) SDS
- Ethidiumbromid
10mg/ml Stammlösung
- FCS
Fötale Kälberserum (GIBCO)
- LB-Medium
1 % Bacto Trypton
0,5 % Bacto Yeast Extract

- 1 % NaCl
pH 7
- PBS
 - 137 mM NaCl
 - 10,14 mM Na₂HPO₄
 - 1,76 mM KH₂PO₄
 - 2,68 mM KCl
 - pH 7,2
- PBT
 - 1 % Tween 20 in PBS
- Penicillin / Streptomycin
 - 100x Stocklösung
 - 10000U /10mg/ml (Sigma)
- 10x Stoppuffer
 - 50% Glycerin
 - 0,4% Bromphenolblau
 - 0,4% Xylen-cyanol
 - in 10 x TBE
- 10 x TBS
 - 100 mM Tris
 - 1.5 M NaCl
 - pH 7.5
- TBS-T
 - 0.1% Tween 20 in TBS
- Transferpuffer
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 20% Methanol
 - pH 10,0
- Tyrode Puffer
 - 10 mM HEPES
 - 137 mM NaCl

2,7 mM KCl

5 mM Glukose

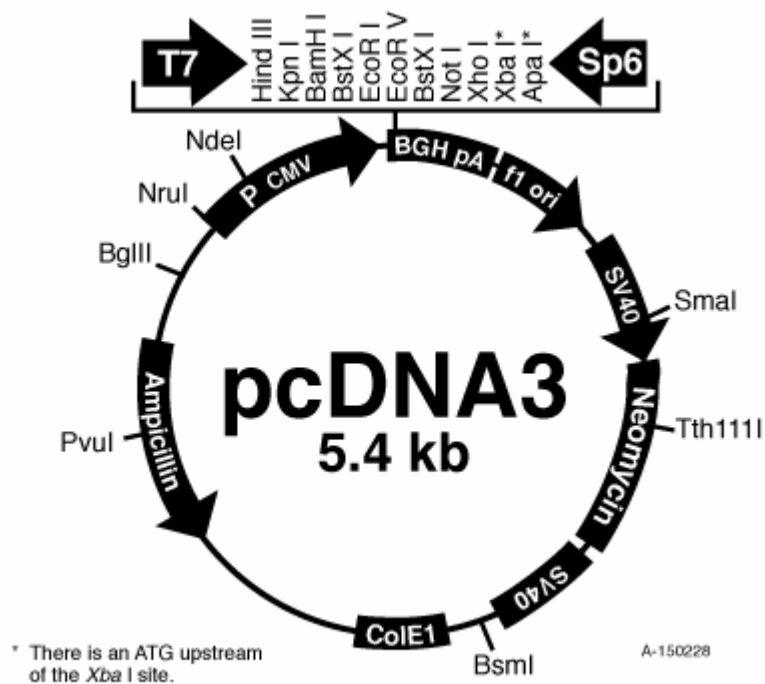
1 mM EDTA

pH 7,4

3.1.8 Plasmide

Zur Subklonierung wurde der pcDNA3 Vektor verwendet.

Die hIR cDNA wurde uns freundlicher Weise von Prof. Müller-Wieland vom Diabetes Institut Düsseldorf zur Verfügung gestellt.



3.1.9 Programme

Zur Zusammenstellung dieser Arbeit wurden folgende Programme benutzt:

Bildbearbeitung:

- Adobe Photoshop 7.0
- MetaMorph Version 4.0

Cell Counter:

- Casy® Stat Version 2.1; © Schärfe System GmbH
- Coulter Micro Diff 18, Krefeld

Graphiken und Statistik:

- GraphPad Prism Version 2.01
- Microsoft® Excel

Internet:

- Software und Datenbank des NCBI
- Software und Datenbank des NEBcutter V2.0
- Software und Datenbank des Webcutter 2.0
- Vector NTI7

Textverarbeitung:

- Microsoft® Word 2002

3.1.10 Geräte

- Eppendorf 5415C Zentrifuge
- Hettich ROTIXA/K Zentrifuge
- Heidolph Rocking Platform DUOMAX 1030
- Amersham Pharmacia Biotech Spectrophotometer Ultrospec 2000

- BioData Corporation Platelet Aggregation Profiler Model PAP-4
- Calibur BD Flow Cytometer
- BioRad Model 200/2.0 Power Supply
- BioRad PowerPac 200
- Radiometer PHM 92 LAB pH Meter
- Scientific Industries Vortex Genie 2
- Kodak X-OMAT M35 Entwickler
- FUJI Photo Film Röntgen Filme
- BioRad Western Blot Transfer Apparatur
- Whatman Schleicher Schuell Protran Nitrozellulosemembran
- Zeiss Axiovert 50 Mikroskop
- Ibidi 1 μ -Slide y-shaped coated (Collagen IV) Flow chamber

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung gewaschener Thrombozyten

Venöses Blut wurde von gesunden, nüchternen Patienten abgenommen und in 10 ml Trinatriumzitat Polypropylen Monovetten gesammelt. Die Vollblutprobe wurde 10 Minuten bei 1440 rpm und 20°C zentrifugiert. Die obere Phase, das plättchenreiche Plasma (PRP), wurde vorsichtig abgenommen, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Die untere rote Phase wurde verworfen. Anschließend wurde das PRP 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 1550 rpm und 20°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das Plättchenpellet mit 3- 4 ml 37°C warmem CGS Puffer vorsichtig resuspendiert und bei 37°C für weitere 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 1550 rpm und 20°C wurde der Überstand abermals abgenommen und das Thrombozytenpellet in 37°C HEPES vorsichtig

resuspendiert. Die Anzahl der Thrombozyten wurde gemessen und auf $300 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ angepaßt.¹²²

3.2.1.1 Stimulation der Thrombozyten

Jeweils 100 μl der Thrombozytenprobe wurde in einem vorgewärmten (37°C) 1,5 ml Eppendorf Gefäß 5 Minuten bei 37°C mit 1 μl Insulin/Probe inkubiert. Die Konzentration des Insulins (10 nM, 100 nM, 10 μM) wurde so gewählt, daß eine Endkonzentration von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin erreicht wurde.

Tabelle der verwendeten Insulinkonzentrationen:

<u>Insulin-konzentration</u>	<u>Kommentar</u>
0.1 nM	nüchterner physiologischer Insulinwert
1 nM	physiologischer Insulinwert nach Nahrungsaufnahme
100 nM	~ 100-faches des physiologischen Maximalwerts

3.2.2 Aggregation

Die Aggregationsmessungen wurden mit einem Biodata PAP-4 Aggregometer durchgeführt. 0.3 ml PRP wurden 5, 10, 15 und 30 Minuten mit Insulin in den Konzentrationen 0.1 nM, 1 nM und 100 nM präinkubiert. Anschließend wurde die Aggregation mit Thrombin (0,0025 U/ml), ADP (1 μM) und Kollagen (1 μg) induziert und unter ständigem Rühren mit 1.000 rpm bei 37°C gemessen.

3.2.3 Ca²⁺ Messung

Freies Kalzium wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 gemessen. Hierzu wurden die Blutplättchen mit Fura2 / AM in PRP 45 min. bei 37°C inkubiert.¹²² Überschüssiger Farbstoff und das Plasma wurden anschließend durch

Zentrifugation von den Blutplättchen getrennt und verworfen. Die Blutplättchen wurden anschließend in HEPES Puffer resuspendiert und auf eine Dichte von ca. 2×10^8 Blutplättchen/ml eingestellt. Das freie Kalzium wurde anschließend mit einem Perkin-Elmer LS50 Luminometer gemessen. Die Fura-2 Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. 1 mM Ca^{2+} wurde unmittelbar vor dem Experiment zu der Plättchensuspension hinzu gegeben.

3.2.4 Western Blot

3.2.4.1 Auftrennung der Plättchenprobe

Zu jeweils 100 μl Plättchenprobe wurden in der 50 μl 3x SDS PAGE Probenpuffer gegeben und die Probe bei 95°C denaturiert. 20 μl hiervon wurden auf ein Gel geladen, und bei 130V 1.5 h aufgetrennt

Gele

	Sammelgel	Trenngel		
	4%	8%	9%	13%
Akrylamid/Bisakrylamid 30%/0.8% (w/v) 29:1	2 ml	10.7 ml	12 ml	17.3 ml
Tris-HCl (pH 8.9) 3 M	-	5 ml	5 ml	5 ml
Tris-HCl (pH 6.7) 0.5 M	2.5 ml	-	-	-
SDS 10 % (w/v)	0.2 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
H ₂ O	15 ml	23.5 ml	22.43 ml	17.5 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)	10 μl	20 μl	20 μl	20 μl
TEMED 99 %	0.8 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Gesamtvolumen	20 ml	40 ml	40 ml	40 ml

3.2.4.2 Transfer

Gel und Nitrocellulosemembran wurden anschließend 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und auf zwei Lagen Filterpapier platziert, welches ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert worden war. Zwei weitere, ebenfalls mit Transferpuffer äquilibrierte, Lagen Filterpapier wurden nun über die Nitrocellulosemembran und das Sodium Dodecyl Sulphat Polyakrylamid Elektrophorese (SDS-PAGE) Gel gelegt. Die Proteine wurden nun 45 Minuten bei 45 V aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

3.2.4.3 Antikörperfärbung

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran zwei Mal kurz mit ddH₂O und danach 10 Minuten in 3% Milchpulver bzw. 3 % BSA in TBS Tween gewaschen um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4°C auf dem Wippschüttler mit dem in 3 % Milchpulver bzw. 3 % BSA in TBS Tween im Verhältnis 1:200 - 1:1.000 gelösten primären Antikörper inkubiert. Darauf folgend wurde die Membran 4 x 15 Minuten in TBS Tween gewaschen und mit dem ebenfalls in 3% Milchpulver TBS Tween im Verhältnis 1:10.000 gelösten sekundären Antikörper bei Raumtemperatur 30 Minuten und kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Darauf folgten vier weitere 15 minütige Waschschrte mit TBS Tween.

3.2.4.4 Signaldetektion

Zu der Detektion des Antikörper-Signals verwendeten wir das Western Blot Detection Kit von upstate (biomol, Hamburg, Deutschland). Die Nitrocellulosemembran wurde zwei Minuten mit der Detektionslösung inkubiert. Die Detektionslösung wurde abgeschüttet und die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet, bevor die Fluoreszenz mittels Röntgenfilm detektiert wurde.

3.2.5 FACS Analyse

3.2.5.1 Plättchenfärbung PAC-1

20µl der stimulierten Plättchenprobe wurden zusammen mit 10 µl des FITC-konjugierten Antikörpers gegen PAC-1 in ein 5 ml Polystyrol Rundboden-Röhrchen gegeben. Die Proben wurden im Anschluß 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit 0.5 ml HEPES Puffer abgestoppt.

3.2.5.2 Plättchenfärbung P-Selektin

50 µl der stimulierten Thrombozyten wurden zusammen mit 5 µl 10 % Formaldehyd 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluß 5 Minuten bei 2.600 g zentrifugiert. Die Plättchen wurden danach in 50 µl PBS mit 3 % BSA resuspendiert und mit 5 µl CD62 Antikörper in einem 5 ml Polystyrol Rundboden Röhrchen 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt.

3.2.5.3 FACS Analyse

Für die Bestimmung der durch Insulin induzierten Aktivierung der Blutplättchen wurde eine durchflußzytometrische (FACS) Analyse durchgeführt.

Von allen Proben wurden die Daten von 10.000 Plättchen mit einem Becton Dickinson FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gesammelt und mittels CELLquest Software ausgewertet.

Zu der Analyse der Plättchenaktivierung nach Insulinstimulation wurde die Plättchenpopulation anhand ihrer charakteristischen Vor- und Seitwärtsstreuung identifiziert. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) der gesamten Plättchenpopulation wurde mit dem PAC-1 FITC und CD 62 Antikörper gemessen. Zu der Analyse der aktivierten Plättchen wurden 10.000 PAC-1 FITC bzw. CD 62 positive Zellen identifiziert und in einem FITC (F11) Histogramm ausgewertet, dessen

Parameter so gewählt waren, daß Hintergrundsignale von Leukozyten und roten Blutkörperchen herausgefiltert wurden. Die Bindung der Antikörper wurde als prozentualer Anteil für die für den jeweiligen Antikörper positiven Plättchen angezeigt.¹²²

3.2.6 VERDAU

Protokoll:

xµl DNA (X ≈ 1µg DNA)
2µl Puffer (enzymspezifisch)
2µl 10x BSA (wenn notwendig)
1µl Enzym
yµl H₂O (Auffüllen auf 20µl)

Gewöhnlich wird ein Ansatz von 20µl für den Verdau gewählt. Dieser wird für 2,5 Stunden bei 37°C, oder der für das Enzym empfohlene Temperatur, inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 5µl Stoppuffer inaktiviert. Die Fragmente werden weiter mittels Gelelektrophorese untersucht.

3.2.7 Gelelektrophorese

300ml 1x TBE wurden 2,4 g Agarose (entspricht 0,8%) gelöst und für 3 Min in der Mikrowelle erhitzt. Die Lösung wurde daraufhin auf ca. 60°C abgekühlt und 20 µl EtBr zugegeben. Im Anschluß wurde die noch warme Lösung in einen Plastikschlitten gegossen und das Gel nach dem Aushärten in die Gelelektrophoresekammer gelegt. Dort wurde es mit Marker und DNA beladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 150V für 4 Stunden bzw. bei 50V über Nacht.

3.2.8 Transformation

Bei der Transformation werden zuvor klonierte Plasmide mittels Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterien eingebracht. Das Plasmid wird im Bakterium repliziert und exprimiert einen antibiotikaresistenten Marker. Dieser ermöglicht es der transformierten Bakterienzelle, in Anwesenheit von Antibiotika zu überleben. Zu der Detektion von Plasmid tragenden Kolonien wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

3.2.9 Zellkultur

Die ECV 304 Zellen wurden in D-MEM kultiviert, welchem 5 % FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/0.1 mg/ ml) und Vitamine zugegeben waren. Die Zellen wurden bei 37°C unter einer 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden gemäß den Empfehlungen der ATCC geteilt. Zur Aufteilung oder Vorbereitung eines Experiments wurden die Zellen 5 Minuten bei 280 x g zentrifugiert. Das Nährmedium wurde abgenommen und die Zellen in einer adäquaten Menge PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen im Nährmedium resuspendiert, mit einem CASY®1 cell counter gezählt, auf eine Dichte von 0,5 x 10⁶/ml eingestellt und ausgesät.¹²³

3.2.10 Transfektion

Zu der Transfektion verwendeten wir ECV 304 Endothelzellen. Diese wurden mittels Gene Porter 2 (Peqlab, Erlangen) transfiziert. Die verwendete cDNA, welche für den Insulin Rezeptor codierte, war ein freundliches Geschenk von Dr. Müller-Wieland, Düsseldorf.

3.2.11 Flußkammer Messungen

3.2.11.1 Vorbereitung der Flußkammer

Am Tag vor den Flußkammer Experimenten wurden die Flußkammern mit in D-MEM im Verhältnis 1:5 gelösten ECV 304 Endothelzellen beladen. Die Flußkammern wurden anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit adhärten die Endothelzellen an den Boden der Flußkammern.

3.2.11.2 DCF Färbung der Thrombozyten

Einer gewaschenen Thrombozytenprobe wurden 1 µl/ml 10 mM Newport Green DCF Farbstoff zugegeben. Die Plättchenprobe wurde drei Minuten im Dunkeln bei 37°C inkubiert und anschließend erneut für 10 Minuten bei 1550 rpm in einer Hettich Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Thrombozyten in warmem (37°C) Tyrode Puffer (pH 7,4) resuspendiert.

3.2.11.3 Färbung der Endothelzellen

Die ECV 304 Endothelzellen wurden 60 Minuten mit einer 300 µM N-Argininlösung im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem D-MEM Nährmedium gewaschen und danach mit der 10 µM DAF-FM Lösung 30 Minuten im Brutschrank beladen.

3.2.11.4 NO Messung

NO-Messungen wurden in Kollagen IV beschichteten, γ -förmigen „ μ -slide“ Flußkammern unter einem konstanten Fluß bei einer Scherspannung von $0,8 \tau$ [dyn cm^{-2}] durchgeführt. Die Flußkammer war auf einem Fluoreszenz-Invertmikroskop befestigt (Axiovert 200, Zeiss). Die Fluoreszenzbilder wurden in Echtzeit mit einer JAI CV-M300 Video kamera aufgenommen. Die Bilddaten wurden offline mit der Metamorph Software (Version 5.0, Visitron) ausgewertet.

3.2.11.5 Aggregationsmessung

Die Aggregationsmessung wurde in der Kollagen IV beschichteten, γ -förmigen „ μ -slide“ Flußkammer unter einem konstanten Fluß bei einer Scherspannung von $0,8 \tau$ [dyn cm^{-2}] durchgeführt.

3.2.12 Datenauswertung

Alle Experimente wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die gezeigten Daten zeigen die durchschnittlichen Werte \pm SD. Die Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni Test oder T-Test ausgewertet. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn der Signifikanzgrad $p < 0.05$ war.

4. ERGEBNISSE**4.1 Der aktivierende Effekt auf die Blutplättchen wird durch das Lösungsmittel hervorgerufen**

Verschiedene Studien weisen einen aktivierenden Insulineffekt auf Blutplättchen nach.⁶⁴⁻⁶⁶ Für die Reproduzierung dieser Ergebnisse und als vorausgehende Versuche verglichen wir zunächst unterschiedliches kommerziell verfügbares Insulin (Insuman® rapid® von Aventis und reines Insulin von Sigma) miteinander, welches in vorausgegangenen Studien Verwendung fand. Hierbei zeigte Insuman® rapid® einen dosisabhängigen Effekt auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $8,62 \pm 3,16$ in der Kontrolle, $11,84 \pm 5,02$ bei 0,1 nM Insulin, $15,10 \pm 10,36$ bei 1 nM Insulin und $16,04 \pm 7,46$ bei 10 nM Insulin, $20,32 \pm 10,93$ bei 50 nM Insulin und $25,02 \pm 6,53$ bei 100 nM Insulin; n = 6, Abb. 4.1 A). Eine Wirkung auf die P-Selektin Expression (durchschnittliche Fluoreszenz zwischen $28,33 \pm 17,87$ in der Kontrolle, $31,67 \pm 20,33$ bei 0,1 nM Insulin, $29,83 \pm 18,06$ bei 1 nM Insulin und $29,00 \pm 18,36$ bei 10 nM Insulin, $29,50 \pm 18,64$ bei 50 nM Insulin und $31,33 \pm 21,22$ bei 100 nM Insulin; n = 6) und intrazelluläre Signalwege blieb jedoch aus (Abb. 4.1 B). Daher wurden die Experimente wiederholt, diesmal jedoch nur das Lösungsmittel von Insuman® rapid® (bestehend aus m-Cresol, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Glycerin, NaOH, HCl und H_2O) verwendet. Fast das selbe Ergebnis konnte auf diese Weise erzielt werden (die durchschnittliche Fluoreszenz lag zwischen $13,02 \pm 5,01$ in der Kontrolle, $18,12 \pm 6,27$ bei 0,1 nM Insulin, $24,35 \pm 8,16$ bei 1 nM Insulin und $22,65 \pm 8,85$ bei 10 nM Insulin, $26,37 \pm 13,64$ bei 50 nM Insulin und $30,62 \pm 8,48$ bei 100 nM Insulin; n = 6, Abb. 4.1 C). Es muß davon ausgegangen werden, daß die gemessene Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht auf das Insulin, sondern auf das verwendete Lösungsmittel zurückzuführen ist. Daher wurde in allen folgenden Experimenten reines Insulin verwendet.

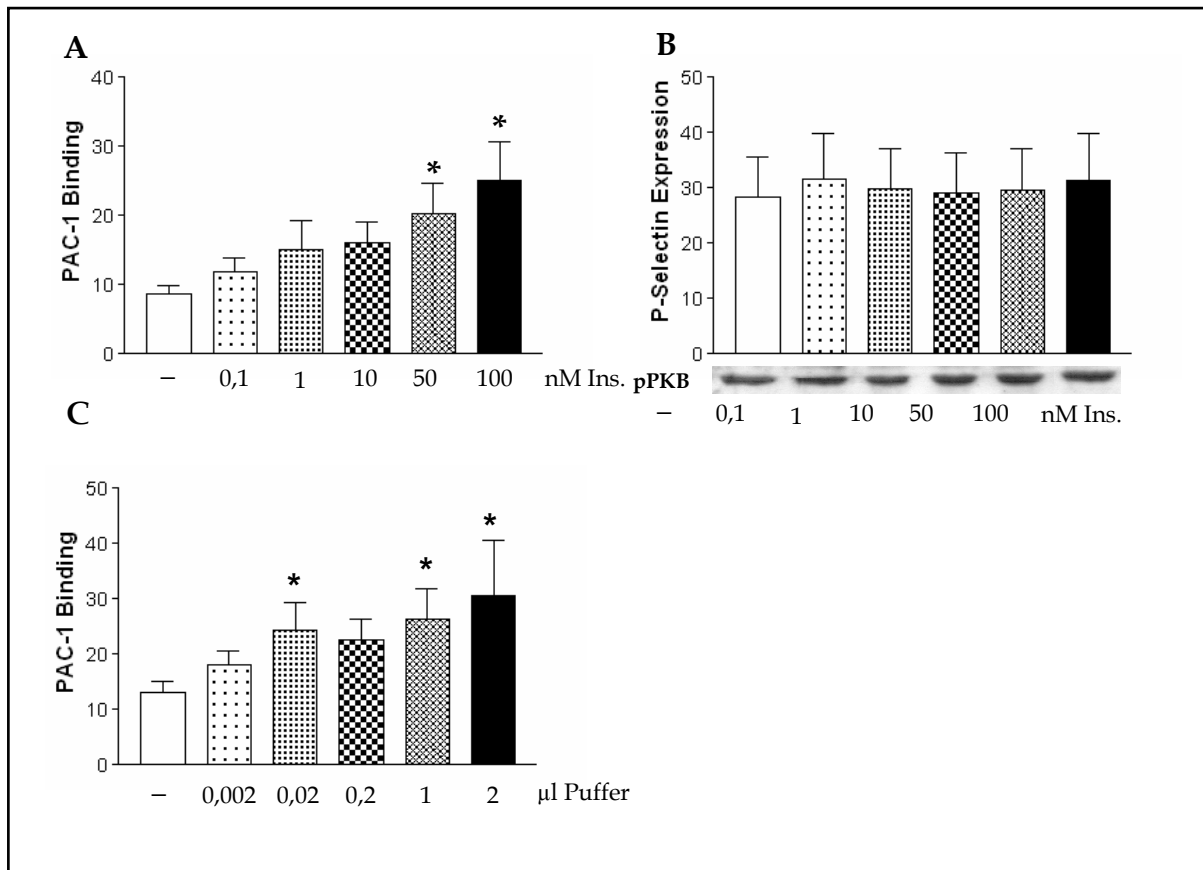


Abb. 4.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung auf den Blutplättchen wird durch den Puffer, nicht durch das Insulin hervorgerufen. (A) Dosisabhängiger Anstieg der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung durch Insuman® rapid®. (B) P-Selektin Expression und PKB Phosphorylierung werden durch Insuman® rapid® nicht verändert. (C) Dosisabhängiger Anstieg der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung durch den reinen Lösungspuffer von Insuman® rapid®. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$

4.2 Einfluß von reinem Insulin auf die Thrombozyten bei physiologischen Glukosewerten

4.2.1 Der Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird durch Insulin nicht aktiviert

Der allgemeine Pfad der Thrombozytenaktivierung führt zu der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, der auf der Zelloberfläche ruhender Blutplättchen lokalisiert ist. Der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Komplex gehört zu einer Familie heterodimerer Adhäsionsrezeptoren, welche auf vielen Zelltypen gefunden werden können. Auf die Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten hin

kommt es zu einer Kalzium-abhängigen Konformationsänderung im Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wodurch das durch den verwendeten PAC-1 Antikörper erkannte Epitop freigelegt wird. Eine mögliche Insulininduzierte Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kann daher mit PAC-1 untersucht werden. Eine Aktivierung der Blutplättchen und ihre damit einhergehende Formveränderung wird ebenfalls durch die Veränderung der für die Blutplättchen charakteristischen Vor- und Seitwärtsstreuung des Laserlichts im Durchflußzytometer sichtbar (vergleiche Abb. 4.2 und 4.3).

Die FACS-Analyse der Plättchenaktivierung mittels PAC-1 zeigte deutlich, daß von Insulin keine Wirkung auf die Blutplättchen bei einem physiologischen Blutglukosewert ausgeht. Keine der verwendeten Insulinkonzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM führte zu einer Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, die signifikant von der unstimulierten Kontrollprobe abwich. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $6,15 \pm 0,25$ in der Kontrolle, $5,87 \pm 0,84$ bei 0,1 nM Insulin, $5,67 \pm 0,19$ bei 1 nM Insulin und $5,65 \pm 0,27$ bei 100 nM Insulin, $n = 6$ (Abb. 4.2 + 4.4A). Hingegen führten die eingesetzten 0,01 U Thrombin zu einer deutlichen Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $6,15 \pm 0,25$ in der Kontrolle und $197,57 \pm 6,86$ für 0,01 U/ml Thrombin $p < 0.05$, $n = 6$; Abb. 4.3 + 4.4A).

Ein Einfluß durch Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) auf die durch Thrombin (0,01 U) induzierte Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blieb ebenfalls aus (Abb. 4.3 + 4.4A). In keiner der sowohl mit Insulin als auch mit Thrombin stimulierten Proben wich die durch Thrombin induzierte Aktivierung der Blutplättchen signifikant von der nur mit Thrombin stimulierten Probe ab (durchschnittliche Fluoreszenz $6,15 \pm 0,24$ in der Kontrolle, $197,6 \pm 6,86$ bei 0,1 nM Insulin + Thrombin, $198,8 \pm 24,11$ für 1 nM Insulin + Thrombin, $203,0 \pm 7,23$ bei 100 nM Insulin + Thrombin und $209,5 \pm 15,71$ für Thrombin, $n = 6$, Abb. 4.3B).

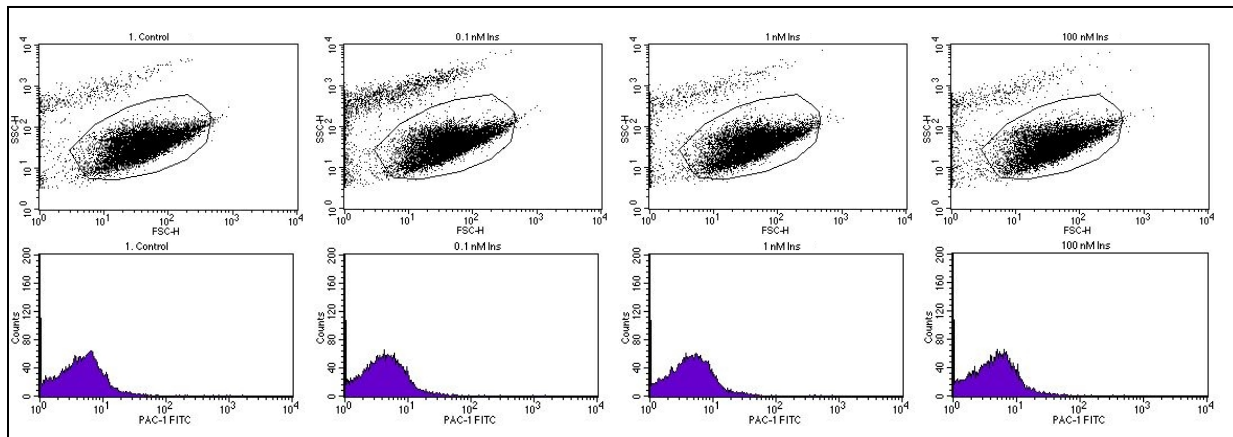


Abb. 4.2 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird durch Insulin nicht aktiviert. Oberer Reihe: Eine Formveränderung der Thrombozyten wird durch Insulin nicht induziert. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der unstimulierten Kontrolle abweichenden Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

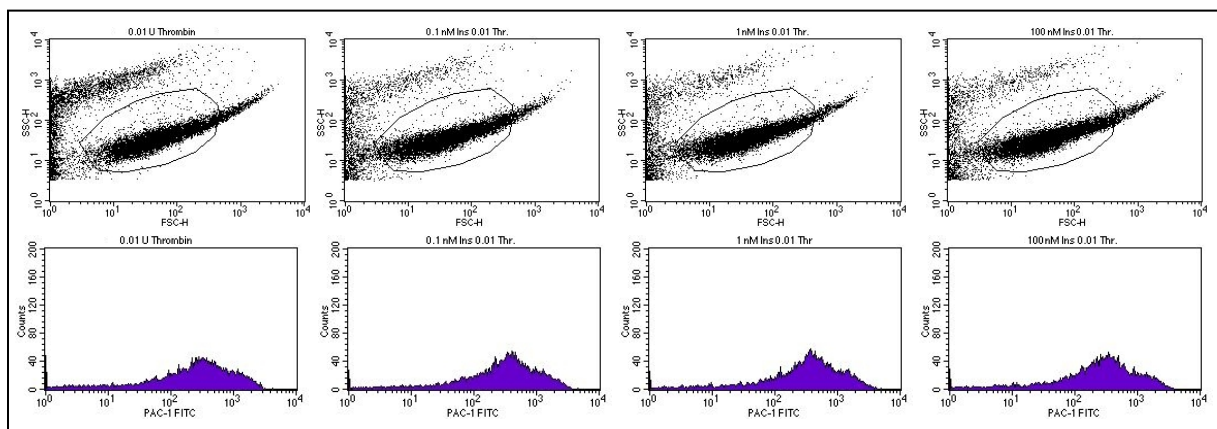


Abb. 4.3 Insulin hat keinen Einfluß auf die Thrombin induzierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung. Oberer Reihe: Die Gabe von 0,01 U Thrombin führte zu eine deutlichen Formveränderung der Thrombozyten. Diese wurde von Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der mit 0,01 U Thrombin stimulierten Kontrolle abweichenden Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

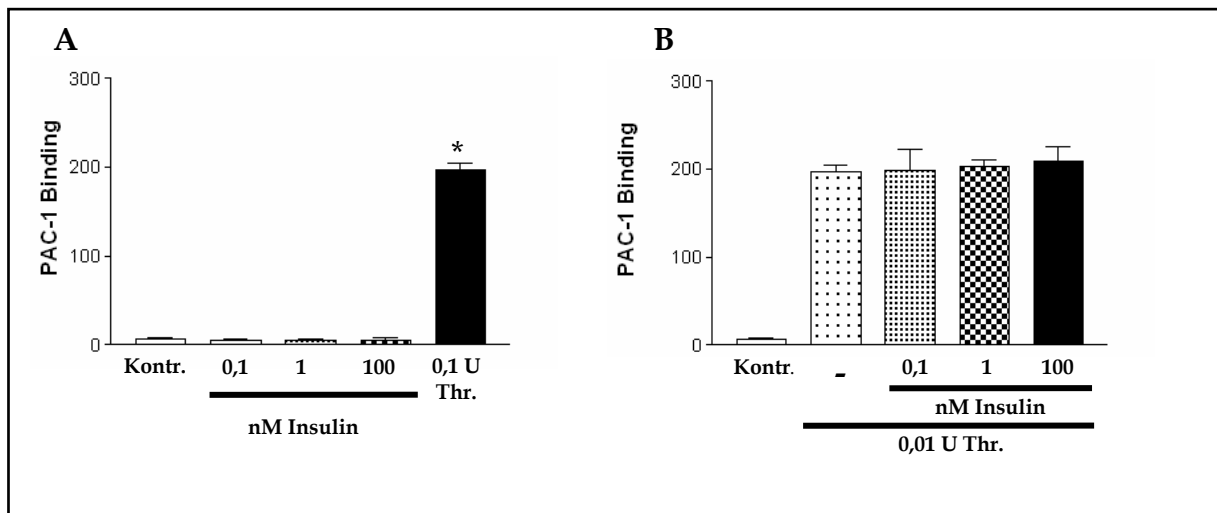


Abb. 4.4 Insulin hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und die intrazellulären Signalwege in Blutplättchen. (A) Insulin hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM einen Einfluß auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und die intrazellulären Signalwege. (B) Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) hatte keinen Einfluß auf die durch Thrombin (0,01 U/ml) induzierte Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und die durch Thrombin hervorgerufene Aktivierung der intrazellulären Signalwege. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$

4.2.2 Die P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche wird durch Insulin nicht beeinflusst

P-Selektin ist ein Membranglykoprotein von 140 kDa Gewicht. Es ist in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert. Auf die Aktivierung der Blutplättchen hin wird P-Selektin rasch zu der Plasmamembran transportiert und auf der Oberfläche exprimiert. Dort vermittelt es adhäsive Interaktionen zwischen Blutplättchen und Granulozyten sowie Monozyten. Mittels eines CD62P-FITC-konjugiertes monoklonalen Antikörpers sollte detektiert werden, inwieweit Insulin zu einer Veränderung der P-Selektin Expression auf der Plasmamembran der Thrombozyten führt.

Wie auch bei der Analyse der Aktivierung des Fibrinogen Rezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, so kam es durch Insulin zu keiner Veränderung der Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. Bei keiner der verwendeten Insulinkonzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) wich die P-Selektin Expression

auf der Oberfläche der Blutplättchen signifikant von der unstimulierten Kontrollprobe ab (durchschnittliche Fluoreszenz $4,27 \pm 1,89$ in der Kontrolle, $6,24 \pm 0,36$ bei 0,1 nM Insulin, $6,28 \pm 0,2$ bei 1 nM Insulin und $5,55 \pm 0,15$ für 100 nM Insulin, $n = 6$, Abb. 4.5 + 4.7A). Hingegen führte das eingesetzte Thrombin (0.01 U/ml) zu einem deutlich meßbaren Anstieg der P-Selektin Expression auf der Plasmamembran. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $4,27 \pm 1,89$ in der Kontrolle und bei $153,78 \pm 5,06$ im Fall der mit Thrombin stimulierten Probe, $p < 0.05$, $n = 6$ (Abb. 4.6). Auf diese durch Thrombin induzierte P-Selektin Expression hatte Insulin ebenfalls keinen Einfluß. Bei einer Co-Stimulation der Blutplättchen mit 0,01 U Thrombin und 0,1 nM, 1 nM oder 100 nM Insulin kam es zu keiner signifikanten Abweichung in der P-Selektin Expression im Vergleich zu der nur mit Thrombin stimulierten Probe. Hier lag die durchschnittliche Fluoreszenz im Bereich von $4,27 \pm 1,89$ bei der Kontrolle, $153,8 \pm 5,06$ bei 0,1 nM Insulin + Thrombin, $144,2 \pm 13,56$ bei 1 nM Insulin + Thrombin, $148,0 \pm 2,82$ für 100 nM Insulin + Thrombin und $137,6 \pm 7,37$ bei Thrombin allein, $p < 0.05$, $n = 6$ (Abb. 4.6 + 4.7 B).

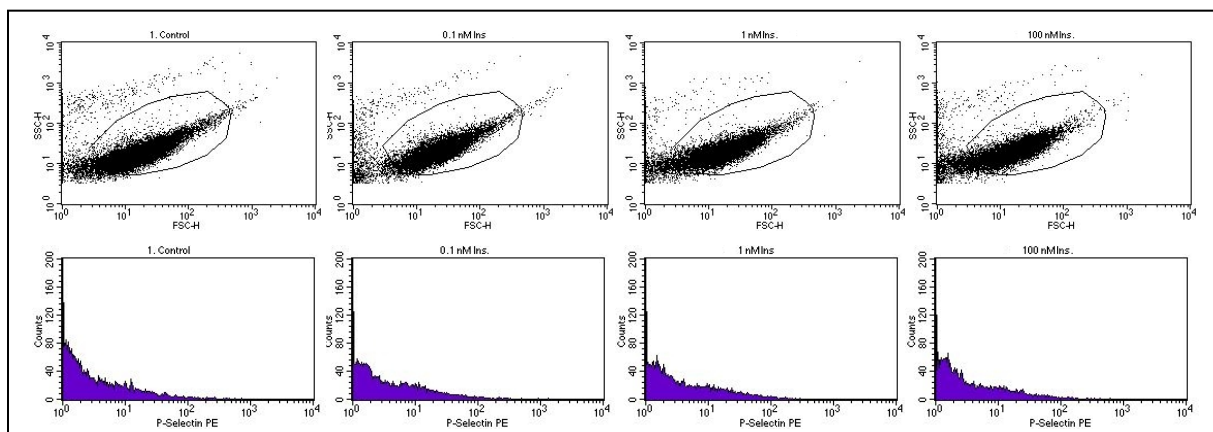


Abb. 4.5 Insulin führt zu keiner gesteigerten P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Oberer Reihe: Eine Formveränderung der Thrombozyten wird durch Insulin nicht induziert. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der unstimulierten Kontrolle abweichenden Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche

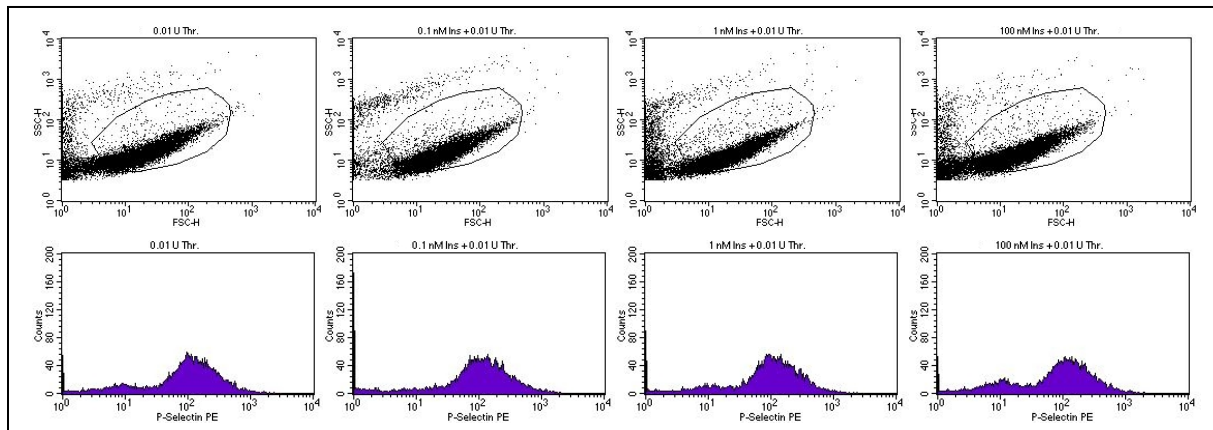


Abb. 4.6 Insulin bewirkt keine Veränderung in der Thrombin induzierte P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Obere Reihe: Die Gabe von 0,01 U Thrombin führte zu eine deutlichen Formveränderung der Thrombozyten. Diese wurde von Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer Abweichung der durch 0,01 U Thrombin induzierten P-Selektin Expression.

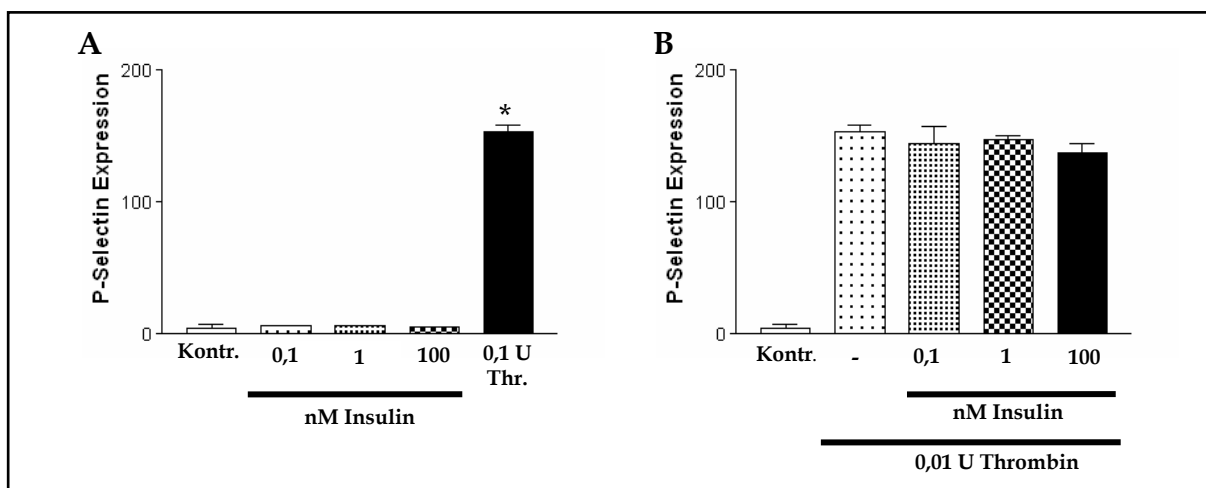


Abb. 4.7 Durch Insulin wird kein Effekt auf die P-Selektin Expression auf der Oberfläche der Blutplättchen hervorgerufen. (A) Insulin führte in keiner der eingesetzten Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM zu einer gesteigerten P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche. (B) Der durch Thrombin (0.01 U) hervorgerufene Anstieg der P-Selektin Expression wird durch Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$

4.2.3 Insulin zeigt keine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen

2003 berichteten Fleming *et al.* von einer Insulin-abhängigen Hemmung der ADP induzierten Plättchenaggregation.⁷³ Daher wurde die Wirkung von Insulin auf die Plättchenaggregation einer genaueren Untersuchung unterzogen. Hierzu wurden die Blutplättchen mit Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) alleine, sowie mit Insulin zusammen mit den Agonisten Thrombin, ADP und Kollagen co-stimuliert. Die Konzentration der Agonisten Thrombin, ADP und Kollagen wurde so gewählt, daß es zu keiner 100 %igen Aggregation kam, da dies einen eventuell auftretenden Effekt maskiert hätte.

Die unter konstantem Rühren (Plättchenaggregometer, 1000 rpm) mit Insulin (0.1 nM, 1 nM, 100 nM) stimulierten Thrombozyten zeigten in ihrem Aggregationsverhalten keine Abweichung von der unstimulierten Kontrollprobe (Abb. 4.8 A). Die Maximalaggregation erreichte in der unstimulierten Kontrolle $3,4 \% \pm 2,88 \%$. Bei der mit 0.1 nM Insulin stimulierten Probe lag sie bei $2,8 \% \pm 2,04 \%$, während eine Aggregation von $3,0 \% \pm 1,87 \%$ für 1 nM Insulin und $3,6 \% \pm 2,0 \%$ für 100 nM Insulin gemessen wurde, $n = 6$ (Abb. 4.9 A). Thrombin (0,0025 U/ml), ADP (1 μ M) und Kollagen (3 μ g/ml) induzierten unter denselben Bedingungen die Aggregation der Blutplättchen. (Abb. 4.8 B-D). Auch hatte eine Präinkubation (5 Minuten) der Thrombozyten mit Insulin (0,1 nM, 1 nM and 100 nM) vor der Stimulation mit Thrombin, ADP und Kollagen keinen Einfluß auf die Aggregation (Abb. 4.8 B - D). Insulin zeigte unter den gleichen Bedingungen ebenfalls keine Wirkung auf die Maximalaggregation. Die Maximalaggregation lag nach Stimulation mit 0,0025 U/ml Thrombin im Bereich von $77,0 \% \pm 2,45 \%$, während sie für Thrombin + 0,1 nM Insulin $76,25 \% \pm 10,59 \%$ erreichte. Für Thrombin + 1 nM Insulin wurde eine Maximalaggregation von $77,5 \% \pm 5,26 \%$ und für Thrombin + 100 nM Insulin eine von $77,0 \% \pm 8,9 \%$ gemessen, $n = 6$ (Abb. 4.9 B).

Nach der Stimulation mit 1 μ M ADP erreichte die Maximalaggregation $48,0 \% \pm 3,5 \%$ für ADP allein, $48,0 \% \pm 6,22 \%$ für ADP + 0,1 nM Insulin, $48,25 \% \pm 4,99 \%$ für ADP + 1 nM Insulin und $44,5 \% \pm 5,51 \%$ für ADP + 100 nM Insulin, $n = 6$ (Abb. 4.9 C). Die Maximalaggregation nach der Gabe von 3 μ g/ml Kollagen erreichte $82,60 \% \pm 4,83 \%$ für Kollagen allein, $84,60 \% \pm 5,94 \%$ für Kollagen + 0,1 nM Insulin, $89,8 \%$

$\pm 11,17\%$ für Kollagen + 1 nM Insulin and $79,80\% \pm 8,38\%$ für Kollagen + 100 nM Insulin (Abb. 4.9 D).

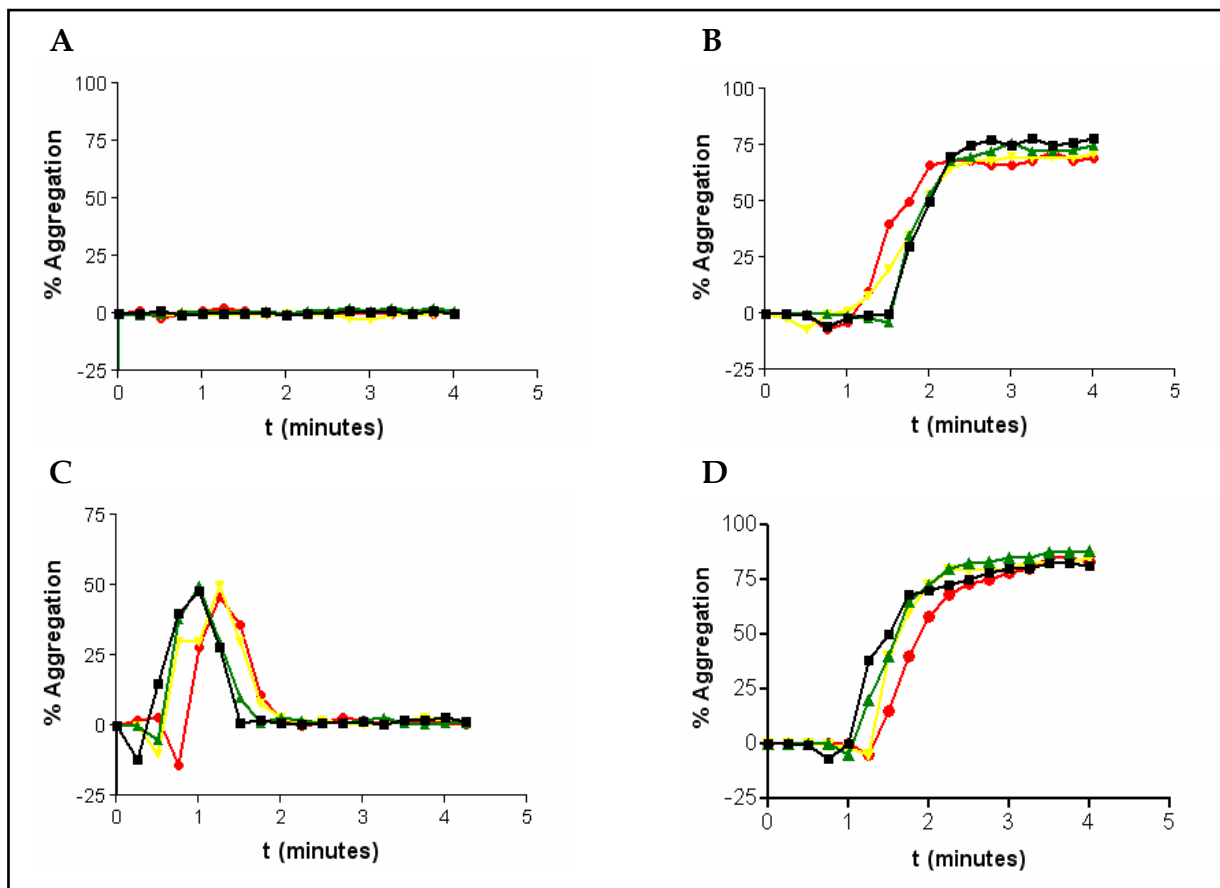


Abb. 4.8 Insulin zeigt keine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen. Die Blutplättchen wurden unter konstantem Rühren (Plättchenaggregometer, 1000 rpm) mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) präinkubiert (5 Minuten, 37°C). (A) Plättchenaggregation nach Insulinstimulation. (B) Plättchenaggregation nach Stimulation mit Insulin und 0,0025 U/ml. (C) Aggregation nach Stimulation mit Insulin und 1 μ M ADP. (D) Aggregation der Blutplättchen nach Stimulation mit 3 μ g/ml Collagen und Insulin. In allen Experimenten wich die Aggregation der Kontrolle ohne Insulin (■) nicht signifikant von der Aggregation der mit 0.1 nM Insulin (▼), 1 nM Insulin (▲) oder 100 nM Insulin (◆) stimulierten Proben ab.

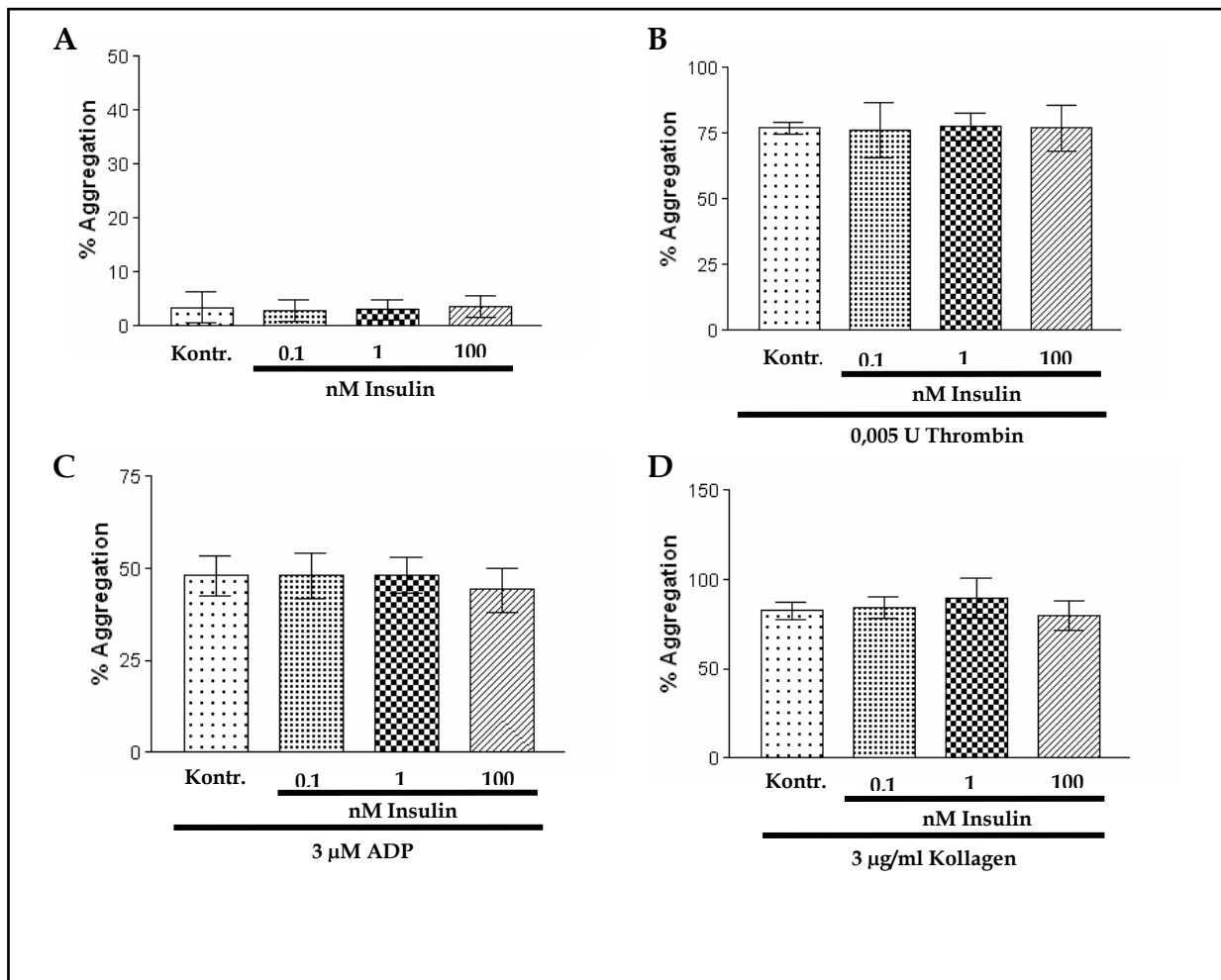


Abb. 4.9 Die Stimulation mit Insulin führt zu keiner Veränderung der Maximalaggregation der Blutplättchen. (A) Insulin alleine hat keinen Einfluß auf die Maximalaggregation der Blutplättchen. Die Maximalaggregation der Blutplättchen nach Stimulation 0,0025 U Thrombin (B), 1 μM ADP (C) und 3 μg/ml Kollagen (D) wird durch Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Maximalaggregation ± SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt.

4.2.4 Die Ca²⁺ Mobilisierung der Blutplättchen wird durch Insulin nicht beeinflusst

Vorangegangene Studien von Ferreira *et al.* zeigten eine signifikante durch Insulin hervorgerufene Hemmung der ADP-induzierten Ca²⁺ Mobilisierung.¹²⁴ Daher wurde die Ca²⁺ Mobilisierung nach Insulinstimulation (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) und nach der Stimulation mit Thrombin (0,01 U/ml) und ADP (5 μM) in An- und Abwesenheit von Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) gemessen. Wir konnten

keine signifikanten Abweichungen in dem der Ca^{2+} Mobilisierung der Blutplättchen proportionalem Fluoreszenzsignal nach 5 Minuten Inkubation mit Insulin im Vergleich zu den nicht mit Insulin behandelten Blutplättchen feststellen (Abb. 4.10A). Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $523,4 \pm 5,38$ für die unstimulierte Kontrolle, bei $523,5 \pm 4,6$ nach Stimulation mit $0,1 \text{ nM}$ Insulin, bei $530,6 \pm 4,21$ für 1 nM Insulin und bei $534,0 \pm 10,5$ nach der Stimulation mit 100 nM Insulin. Die Stimulation mit Thrombin ($0,01 \text{ U/ml}$) (Abb. 4.10B) und ADP ($5 \mu\text{M}$) (Abb. 4.10C) führte zu einem Anstieg der zu der Ca^{2+} Mobilisierung proportionalen Fluoreszenz. Die Präinkubation (5 Minuten) mit Insulin ($0,1 \text{ nM}$, 1 nM und 100 nM) hatte jedoch keinen Einfluß auf die Thrombin und ADP induzierte Ca^{2+} Mobilisierung. Die Fluoreszenz lag für Thrombin zwischen $711,2 \pm 157,6$ für die nur mit Thrombin stimulierte Kontrolle, bei $729,0 \pm 148,1$ für $0,1 \text{ nM}$ Insulin + Thrombin, bei $729,8 \pm 147,2$ für 1 nM Insulin + Thrombin and bei $725,8 \pm 147,7$ für 100 nM Insulin + Thrombin. Eine Stimulation der Thrombozyten mit $5 \mu\text{M}$ ADP führte zu einer durchschnittlichen Fluoreszenz von $679,9 \pm 123,4$ im Fall der nur mit ADP stimulierten Probe, $667,7 \pm 115,6$ für die mit $0,1 \text{ nM}$ Insulin + ADP stimulierten Plättchen, $673,0 \pm 110,7$ nach der Stimulation mit 1 nM Insulin + ADP und $667,3 \pm 115,0$ nach Stimulation mit 100 nM Insulin + ADP.

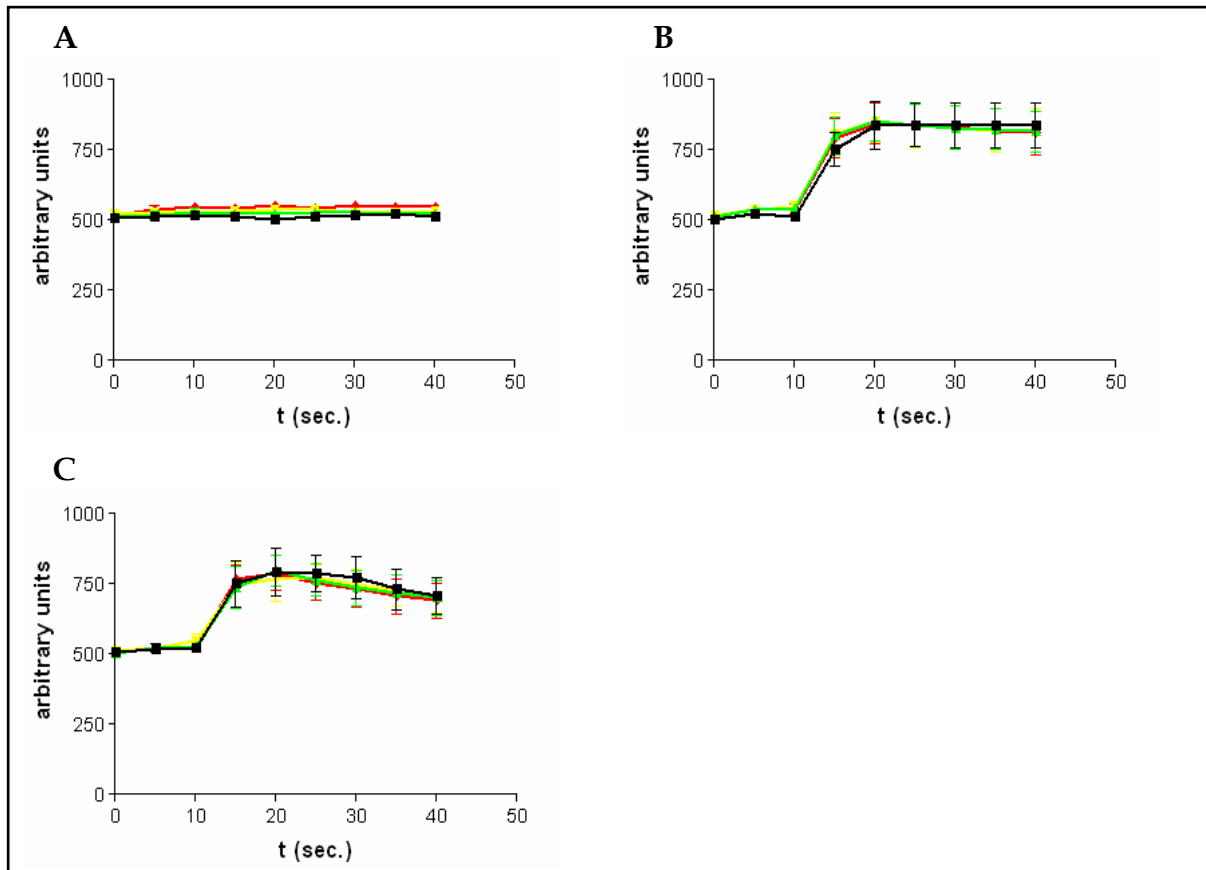


Abb. 4.10 Der Ca^{2+} Spiegel in Blutplättchen wird durch Insulin nicht beeinflusst. Insulin zeigte keinen Effekt auf die zu der Ca^{2+} Mobilisierung proportionalen Fluoreszenz in den nur mit Insulin behandelten Blutplättchen (A) sowie in den mit Insulin und 0,01 U/ml Thrombin (B) oder 5 μM ADP (C) co-stimulierten Plättchen. In allen Experimenten zeigte die Kontrolle ohne Insulin (■) keine Abweichung in der zu der Ca^{2+} Mobilisierung proportionalen Fluoreszenz im Vergleich zu den mit 0.1 nM Insulin (▼), 1 nM Insulin (▲) oder 100 nM Insulin (◆) stimulierten Proben. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt.

4.2.5 Intrazelluläre Signalwege

Durch die bisher gewonnenen Daten konnte ein Effekt des Insulins auf die Aktivierung, die Aggregation und den Ca^{2+} Spiegel der Thrombozyten nicht nachgewiesen werden. Daher erfolgte nun eine genauere Analyse der Auswirkung des Insulins auf die intrazellulären Signalwege. Hierbei sollte überprüft werden, inwieweit Insulin bei den Blutplättchen einen Einfluß auf die in der Literatur beschriebenen Signalkaskaden hat, die durch Insulin stimuliert werden.

4.2.5.1 Insulin zeigt keine akute Wirkung auf PKB in den Blutplättchen

PKB ist ein wichtiger Knotenpunkt in den durch Insulin vermittelten Signalwegen¹²⁵ und wird durch PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) am Thr³⁰⁸ phosphoryliert.¹²⁶ Die Western Blot Analyse der PKB Phosphorylierung innerhalb der Blutplättchen zeigte eindeutig, daß von Insulin keinerlei Stimulation auf PKB ausgeht. Lediglich die Gabe von Thrombin führte zu einem deutlichen Anstieg der PKB Phosphorylierung, welche im Fall der Stimulation mit 0.1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin ausblieb (Abb. 4.11). Der durch Thrombin herbeigeführte Anstieg der PKB Phosphorylierung wurde durch die Gabe von Insulin ebenfalls nicht beeinflusst. (Abb. 4.11).

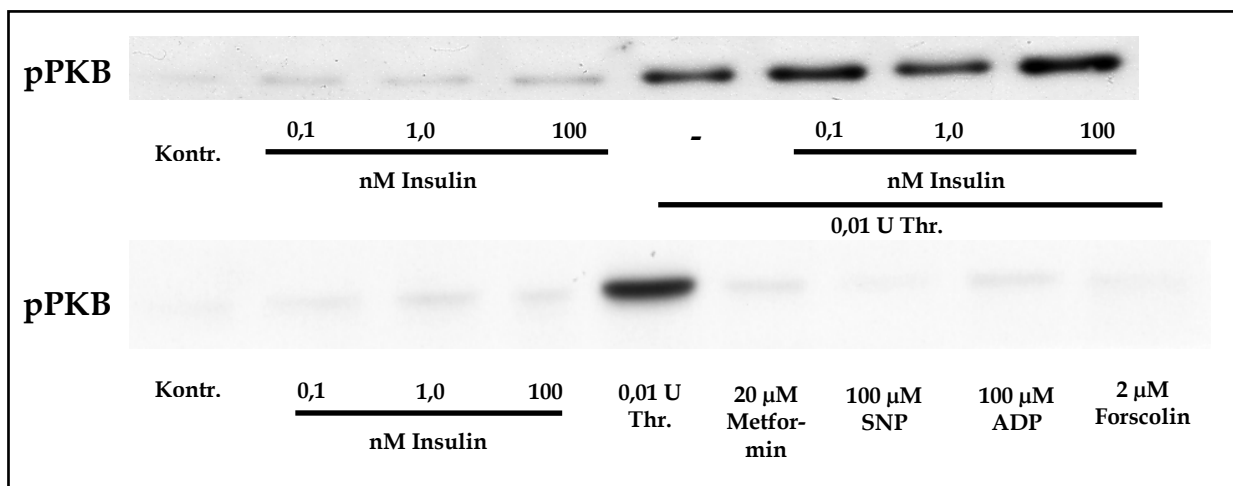


Abb. 4.11 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die PKB Phosphorylierung in Blutplättchen. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von PKB konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nachgewiesen werden. Die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung von PKB wurde von Insulin ebenfalls nicht beeinflusst.

4.2.5.2 Keine insulinabhängige Wirkung auf die MAP-Kinase in den Blutplättchen

Insulin wirkt intrazellulär auf die P38 MAPK und ERK1/2 Proteine des Ras-MAPK Signalwegs ein. ERK 1/2 phosphoryliert das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1) an Serinresten, wodurch es als negativer Rückkopplungsmechanismus für die Insulinwirkung dient.¹²⁷ P38 MAPK Aktivierung durch Insulin ist für die GLUT4

Translokation notwendig.⁶⁰ Wie schon bei der Protein Kinase B, so hatte Insulin auch auf den MAP-Kinase Signalweg keinerlei Einfluß. P38 und ERK MAPK zeigten nach der Stimulation der Blutplättchen mit 0,01 U Thrombin und 100 µM ADP einen Anstieg ihrer Phosphorylierung. Dieser blieb nach einer mit Stimulation mit 0.1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin aus und erreichte lediglich das Niveau der unstimulierten Kontrolle. Ein Effekt auf den durch 0,01 U Thrombin herbeigeführten Anstieg der P38 und ERK MAPK Phosphorylierung nach 5 minütiger Präinkubation der Thrombozyten mit 0,1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 4.12).

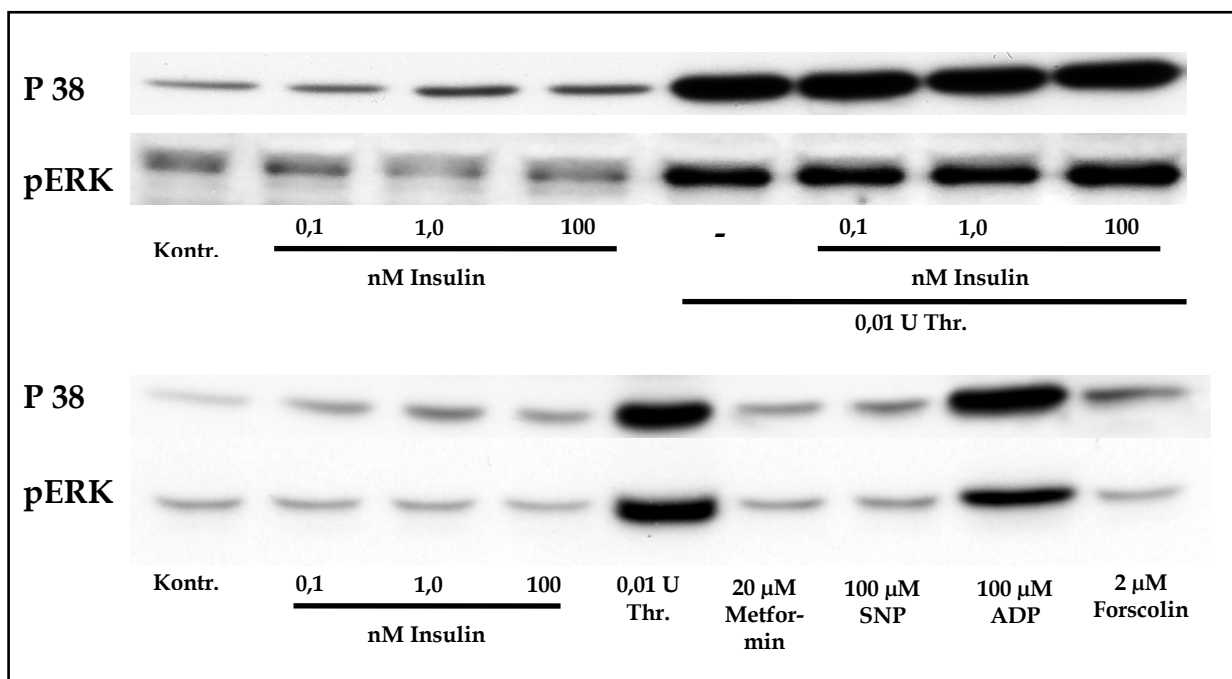


Abb. 4.12 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die MAP-Kinase Signalwege in Blutplättchen. . Insulin hatte in einer Konzentration von 0,1 nM, 1 nM und 100 nM keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von P38 und ERK und die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung dieser Signalproteine.

4.2.5.3 Einfluß von Insulin auf AMPK

Wie im Fall der Phosphorylierung von PKB und der MAP-Kinase Signalkaskade, zeigte das Insulin keinen Einfluß auf die Phosphorylierung vom AMPK. Hier wick die Phosphorylierung der mit Insulin behandelten Proben nicht

von der unbehandelten Kontrollprobe ab. Nur die Stimulation mit 20 μM des AMPK Aktivators Metformin führte zu einem Anstieg der AMPK Phosphorylierung (Abb. 4.13).

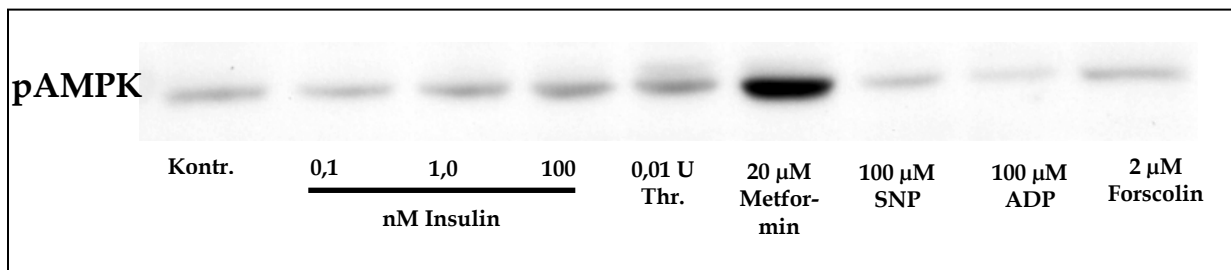


Abb. 4.13 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die AMPK Phosphorylierung in Blutplättchen. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von AMPK konnte bei allen eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) aus. Ein Anstieg der Phosphorylierung von AMPK konnte nur nach der Stimulation mit 20 μM des AMPK Aktivators Metformin beobachtet werden.

4.2.5.4 Insulin zeigt keine Wirkung auf die VASP Phosphorylierung der Blutplättchen

Die Phosphorylierung von VASP korrespondiert mit der Plättchenhemmung und der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Aktivierung.^{128, 129} VASP wird durch den cGMP und cAMP Signalweg am Ser¹⁵⁷ und Ser²³⁹ phosphoryliert, wodurch es zu der Hemmung der Blutplättchen kommt.^{128, 130, 131} Das schon für PKB, MAP-Kinase und AMPK beobachtete Ergebnis zeigte sich auch im Fall der verschiedenen Phosphorylierungsstellen von VASP. Die Stimulation mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) führte zu keiner Veränderung der Phosphorylierung bei VASP Ser¹⁵⁷, VASP Ser²³⁹ und VASP Thr²⁷⁸ (Abb. 4.14). Ein Einfluß von Insulin auf die durch Thrombin induzierte Zu- (VASP Ser¹⁵⁷) bzw. Abnahme (VASP Ser²³⁹) der Phosphorylierung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 4.14). Das als zusätzliche Kontrolle verwendete SNP sowie Forskolin führten gleichfalls zu einem Anstieg der Phosphorylierung von VASP Ser¹⁵⁷ und VASP Ser²³⁹. Es ist daher darauf zu schließen, daß innerhalb der Blutplättchen keine Wirkung auf VASP und cAMP von Insulin ausgeht.

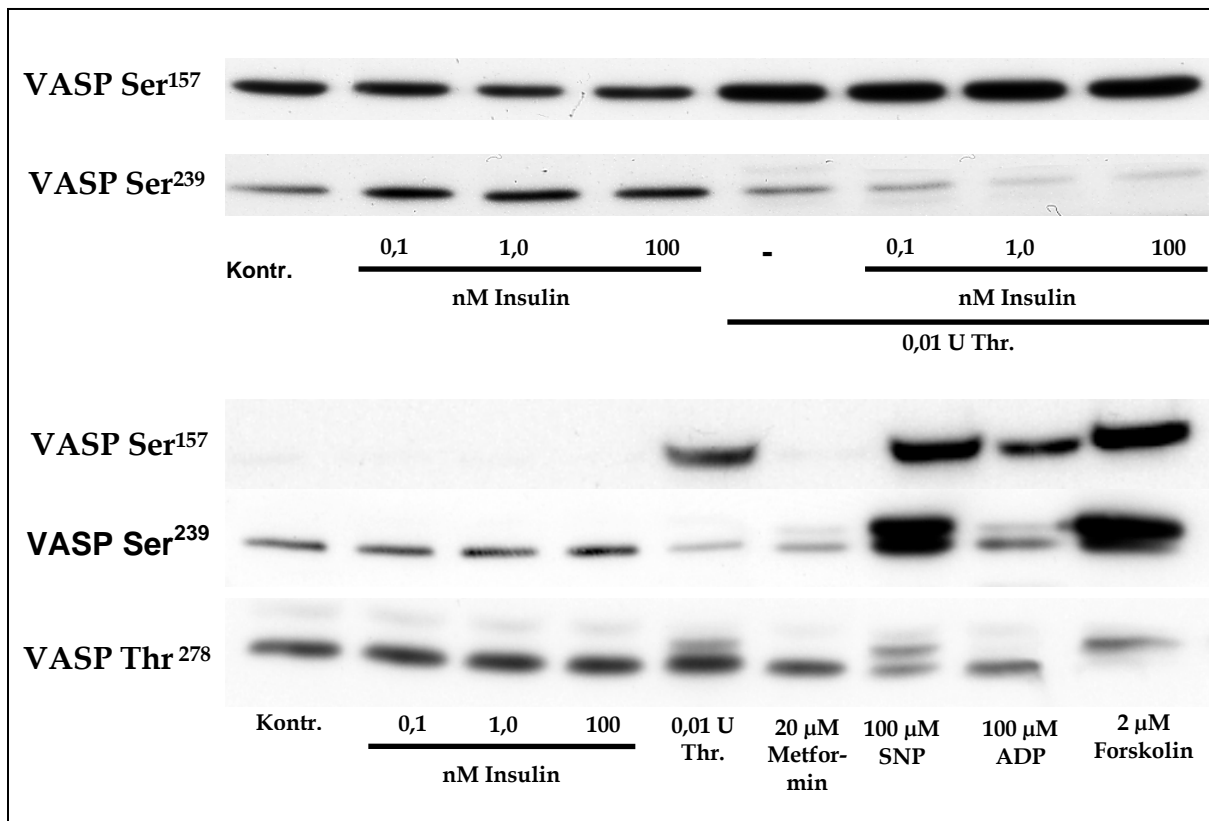


Abb. 4.14 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die VASP Phosphorylierung in Blutplättchen. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von VASP konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nachgewiesen werden. Lediglich SNP sowie Forskolin führten zu einem Anstieg der Phosphorylierung von VASP Ser¹⁵⁷ und VASP Ser²³⁹.

4.3 Einfluß von Insulin auf die Thrombozyten bei 30 mM Glukose

Nach den bisher gewonnenen Daten hat Insulin bei einer physiologischen Glukosekonzentration keinen Einfluß auf die Aktivierung, das Aggregationsverhalten und die intrazellulären Signalwege der Blutplättchen. Ein verändertes Verhalten der Blutplättchen auf *in vitro* Stimuli bei erhöhten Glukosewerten wird von mehreren Autoren berichtet.¹³²⁻¹³⁴ Daher wurden die oben beschriebenen Versuche bei pathologischen Glukosekonzentrationen wiederholt, da diese u. A. die Osmolarität und Viskosität des Mediums verändern. Hierzu wurde eine Glukosekonzentration von 30 mM gewählt. Dieser Wert liegt nahe der Blutglukosekonzentration, ab der das diabetische Koma auftritt.¹³⁵

4.3.1 Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Wirkung auf die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Wie schon unter physiologischen Glukosewerten beobachtet werden konnte, so zeigte auch die FACS-Analyse mit PAC-1 unter hyperglykämischen Bedingungen keinerlei durch das Insulin hervorgerufene Aktivierung der Thrombozyten (Abb. 4.15). Insulin führte auch hier in keiner der verwendeten Insulinkonzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, die signifikant von der unstimulierten Kontrollprobe abwich. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $7,96 \pm 3,85$ in der Kontrolle, $9,85 \pm 2,78$ bei 0,1 nM Insulin, $9,31 \pm 3,3$ bei 1 nM Insulin und $9,57 \pm 3,30$ bei 100 nM Insulin ($n = 6$, Abb. 4.17 A). Hingegen führten die eingesetzten 0,01 U Thrombin zu einer deutlichen Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $7,95 \pm 3,85$ in der Kontrolle und bei $191,2 \pm 13,16$ für 0,01 U/ml Thrombin $p < 0.05$, $n = 6$, Abb. 4.17 B).

Eine Wirkung des Insulins auf die von 0,01 U Thrombin induzierte Aktivierung der Thrombozyten blieb ebenfalls aus (Abb. 4.16). In keiner der verwendeten Insulinkonzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) wurde die durch Thrombin hervorgerufene Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ begünstigt oder inhibiert. Vielmehr entsprach sie der nur mit Thrombin stimulierten Kontrolle (durchschnittliche Fluoreszenz $7,95 \pm 3,85$ in der Kontrolle, $200,2 \pm 14,99$ bei 0,1 nM Insulin + Thrombin, $196,0 \pm 12,58$ für 1 nM Insulin + Thrombin, $205,2 \pm 10,82$ bei 100 nM Insulin + Thrombin und $191,2 \pm 13,16$ für Thrombin, $n = 6$, Abb. 4.17 B).

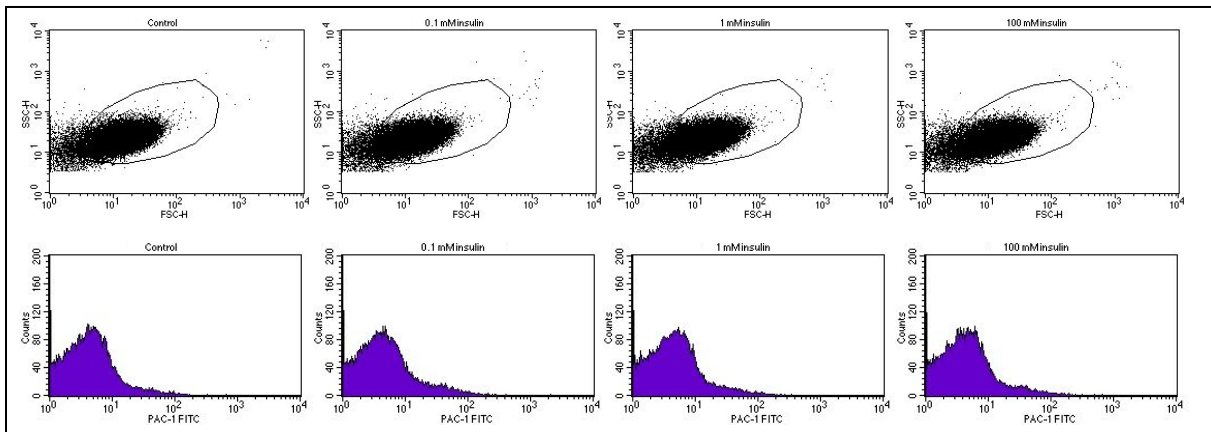


Abb. 4.15 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Oberer Reihe: Eine Formveränderung der Thrombozyten wird durch Insulin nicht induziert. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der unstimulierten Kontrolle abweichenden Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

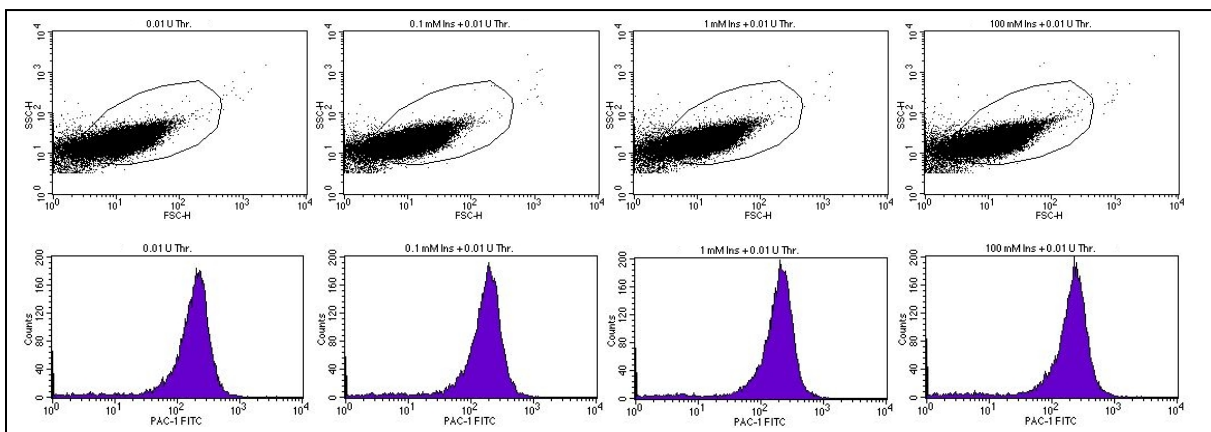


Abb. 4.16 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Thrombin induzierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Oberer Reihe: Die Gabe von 0,01 U Thrombin führte zu eine deutlichen Formveränderung der Thrombozyten. Diese wurde von Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der mit 0,01 U Thrombin stimulierten Kontrolle abweichenden Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

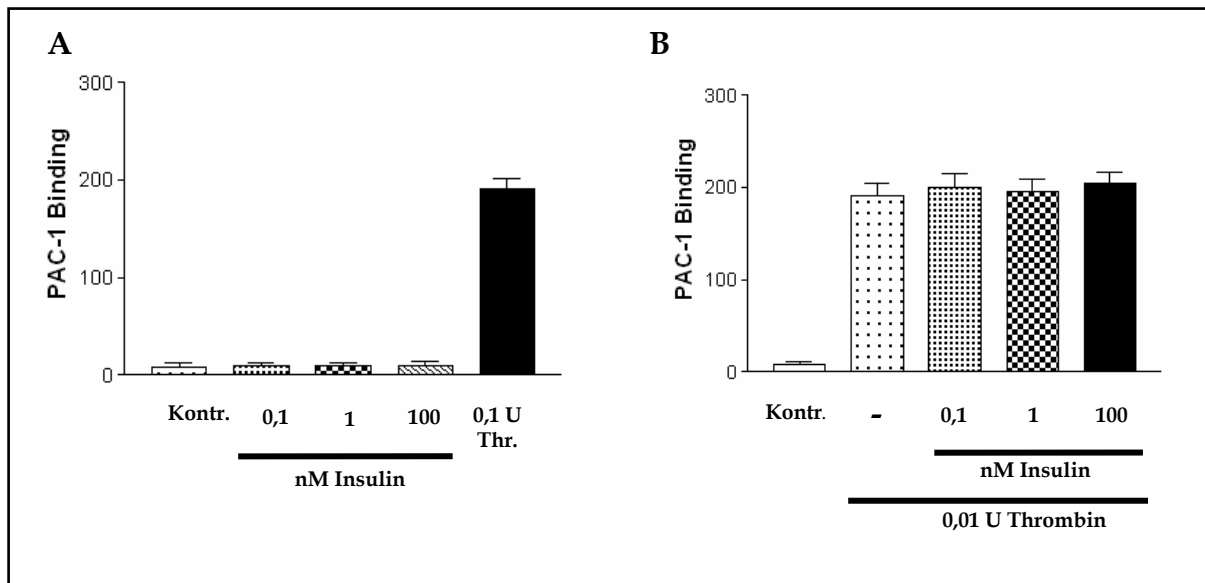


Abb. 4.17 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Insulin hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM einen Einfluß auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Diese entsprach in allen Fällen der der unstimulierten Probe. 0.01 U Thrombin hingegen führten zu einer deutlichen Aktivierung des Fibrinogen Rezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Bei einer Co-Stimulation mit Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) trat auch hier keine Veränderung zu der nur mit Thrombin stimulierten Probe auf. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$

4.3.2 Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Auswirkung auf die P-Selektin Expression der Blutplättchen

Ebenso wie die Messung der Aktivierung der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Fibrinogen Rezeptoren unter pathologischen Glukosekonzentrationen, zeigte auch die Messung der P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter hyperglykämischen Bedingungen keinen durch Insulin bedingten Anstieg (Abb. 4.18). Die Expression von P-Selektin entsprach bei einer Konzentration von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin derjenigen der unstimulierten Kontrollprobe (durchschnittliche Fluoreszenz $6,99 \pm 0,21$ in der Kontrolle, $8,01 \pm 0,89$ für 0,1 nM Insulin, $8,05 \pm 0,2$ für 1 nM Insulin und $7,64 \pm 0,37$ für 100 nM Insulin, $n = 6$, Abb. 4.20 A).

Die Stimulation mit 0,01 U Thrombin führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der P-Selektin Expression auf der Zelloberfläche der Blutplättchen

(durchschnittliche Fluoreszenz $6,99 \pm 0,21$ in der Kontrolle, $142,00 \pm 14,83$ $p < 0.05$, $n = 6$, Abb. 4.19 + 4.20 A). Auch hierbei blieb eine Wirkung des Insulins auf die Thrombin induzierte P-Selektin Expression aus. Wie schon unter physiologischen Glukosewerten beobachtet werden konnte, hatte die Gabe von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin keinen Einfluß auf die P-Selektin Expression nach der Stimulation mit Thrombin. Vielmehr entsprach sie in allen Fällen der nur mit Thrombin stimulierten Kontrollprobe (durchschnittliche Fluoreszenz $6,99 \pm 0,21$ in der Kontrolle, $142,00 \pm 14,83$ für 0,1 nM Insulin + Thrombin, $130,9 \pm 24,29$ für 1 nM Insulin + Thrombin, $131,5 \pm 4,54$ für 100 nM Insulin + Thrombin und $135,9 \pm 5,52$ für Thrombin $p < 0.05$, $n = 6$, Abb. 4.20 B).

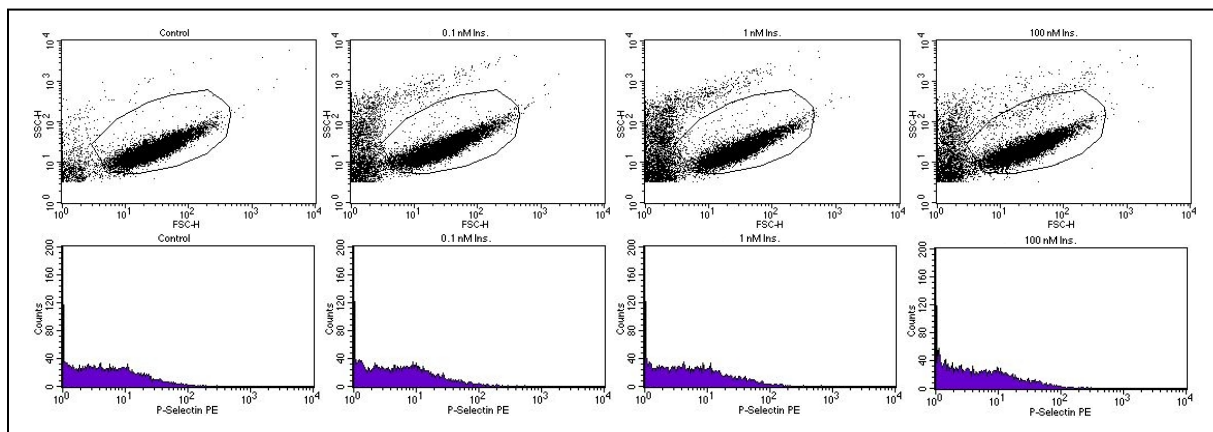


Abb. 4.18 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die P-Selektin Expression auf der Oberfläche der Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Oberer Reihe: Eine Formveränderung der Thrombozyten wird durch Insulin nicht induziert. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer von der unstimulierten Kontrolle abweichenden Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche

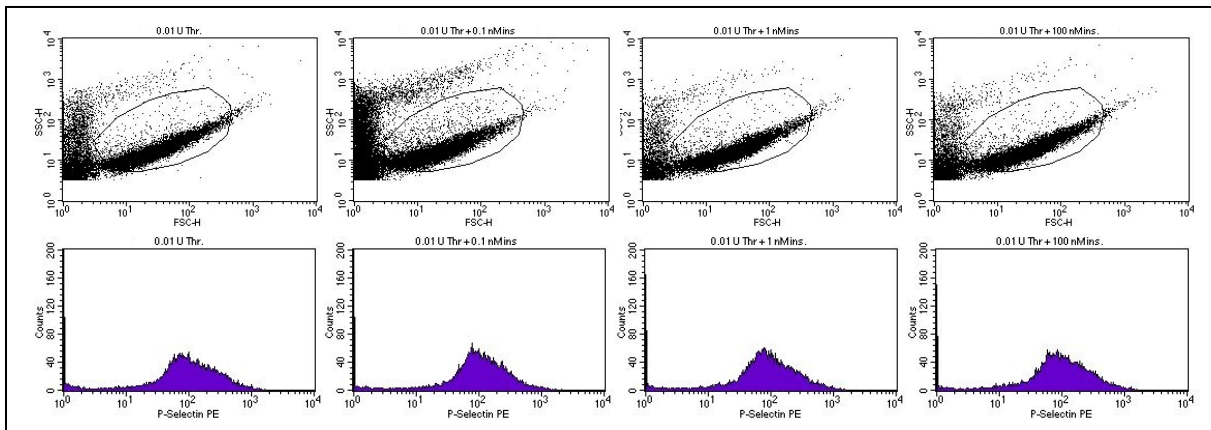


Abb. 4.19 Keine Insulin bedingte Wirkung auf die Thrombin induzierte P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche bei einem Glukosewert von 30 mM. Obere Reihe: Die Gabe von 0,01 U Thrombin führte zu eine deutlichen Formveränderung der Thrombozyten. Diese wurde von Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Unterer Reihe: Insulin führte in keiner der verwendeten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) zu einer Abweichung der durch 0,01 U Thrombin induzierten P-Selektin Expression.

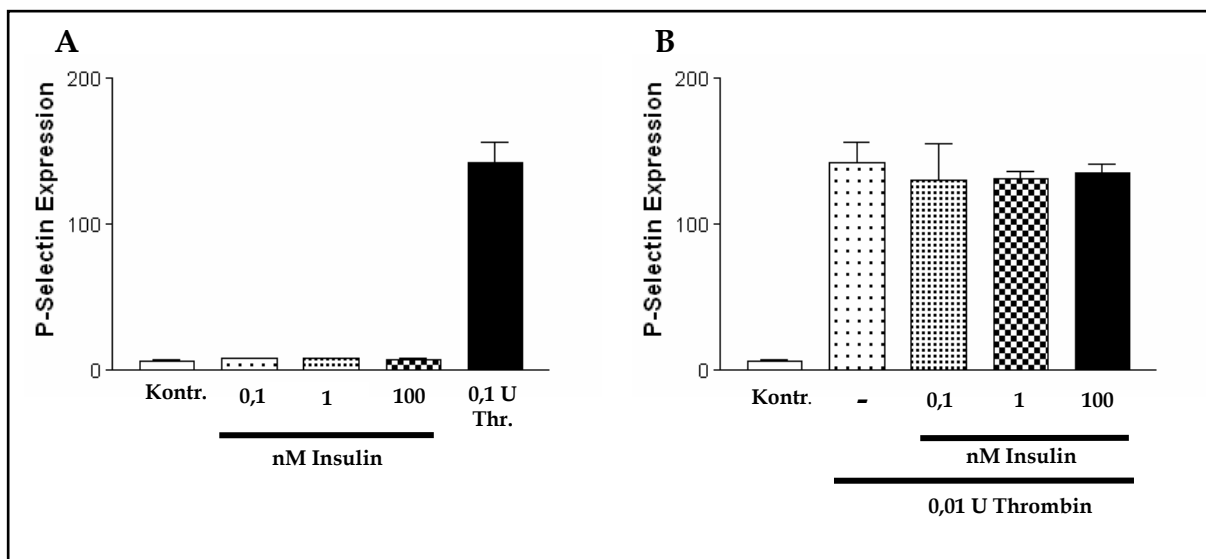


Abb. 4.20 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die P-Selektin Expression auf der Oberfläche der Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Insulin führte in keiner der eingesetzten Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM zu einer gesteigerten P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Die Expression entsprach in allen Fällen derjenigen der unstimulierten Probe. 0.01 U Thrombin hingegen führten zu einem deutlichen Anstieg der P-Selektin Expression. Auch hier trat bei einer Co-Stimulation mit Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) keine Veränderung zu der nur mit Thrombin stimulierten Probe auf. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$

4.3.3 Bei pathologischen Glukosekonzentrationen zeigt Insulin keine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen

Nach dem Ausbleiben eines durch die FACS Analyse meßbaren Effektes des Insulins auf die Thrombozytenaktivierung unter hyperglykämischen Bedingungen, wurde erneut das Aggregationsverhalten untersucht. Die Blutplättchen wurden unter den hyperglykämischen Bedingungen erneut mit Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) alleine, sowie zusammen mit den Agonisten Thrombin (0,025 U), ADP (1 µM) und Kollagen (1 µg) stimuliert.

Unter konstantem Rühren (Plättchenaggregometer, 1000 rpm) zeigten die mit 0,1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin stimulierten Blutplättchen unter hyperglykämischen Bedingungen keine Abweichung in ihrem Aggregationsverhalten im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Abb. 4.21 A). Die Maximalaggregation lag bei 1,1 % ± 0,42 % im Fall der unstimulierten Kontrolle, bei 1,1 % ± 0,74 % für 0,1 nM Insulin, bei 1,8 % ± 1,82 % für die mit 1 nM Insulin stimulierte Probe und bei 1,6 % ± 0,42 % für 100 nM Insulin, n = 6 (Abb. 4.22 A). Unter den gleichen Bedingungen führten Thrombin (0,0025 U/ml), ADP (1 µM) und Kollagen (3 µg/ml) zu einer Aggregation der Blutplättchen (Abb. 4.21 B - D). Eine Präinkubation (5 Minuten) der Thrombozyten mit Insulin (0,1 nM, 1 nM and 100 nM) vor der Stimulation mit Thrombin, ADP und Kollagen führte zu keiner Abweichung in der durch die verschiedenen Agonisten induzierten Aggregation (Abb. 4.21 B - D). Die Maximalaggregation wurde durch das Insulin ebenfalls nicht beeinflusst. Bei 0,0025 U/ml Thrombin lag die Maximalaggregation bei 67,0 % ± 12,63 % für Thrombin alleine, bei 63,6 % ± 9,32 % für Thrombin + 0,1 nM Insulin, bei 65,6 % ± 12,05 % für Thrombin + 1 nM Insulin und bei 59,40 % ± 21,05 % für Thrombin + 100 nM Insulin, n = 6 (Abb. 4.22 B).

Nach der Stimulation mit 1 µM ADP lag die Maximalaggregation mit ADP alleine bei 46,8 % ± 13,86 %, bei 44,6 % ± 19,28 % mit ADP + 0,1 nM Insulin, bei 45,80 % ± 15,40 % nach der Stimulation mit ADP + 1 nM Insulin und bei 45,4 % ± 13,96 % nach Stimulation mit ADP + 100 nM Insulin, n = 6 (Abb. 4.22 C).

Die Maximalaggregation nach Gabe von 3 µg/ml Kollagen entsprach 67,80 % ± 19,41 % nach Stimulation mit Kollagen allein, 66,0 % ± 23,57 % für Kollagen + 0,1

nM Insulin, $66,4 \% \pm 25,48 \%$ für Kollagen + 1 nM Insulin und $62,6 \% \pm 28,29 \%$ für Kollagen + 100 nM Insulin, $n = 6$ (Abb. 4.22 D). Demnach hat Insulin keinen Einfluß auf die Plättchenaggregation nach einer Präinkubation von 5 Minuten.

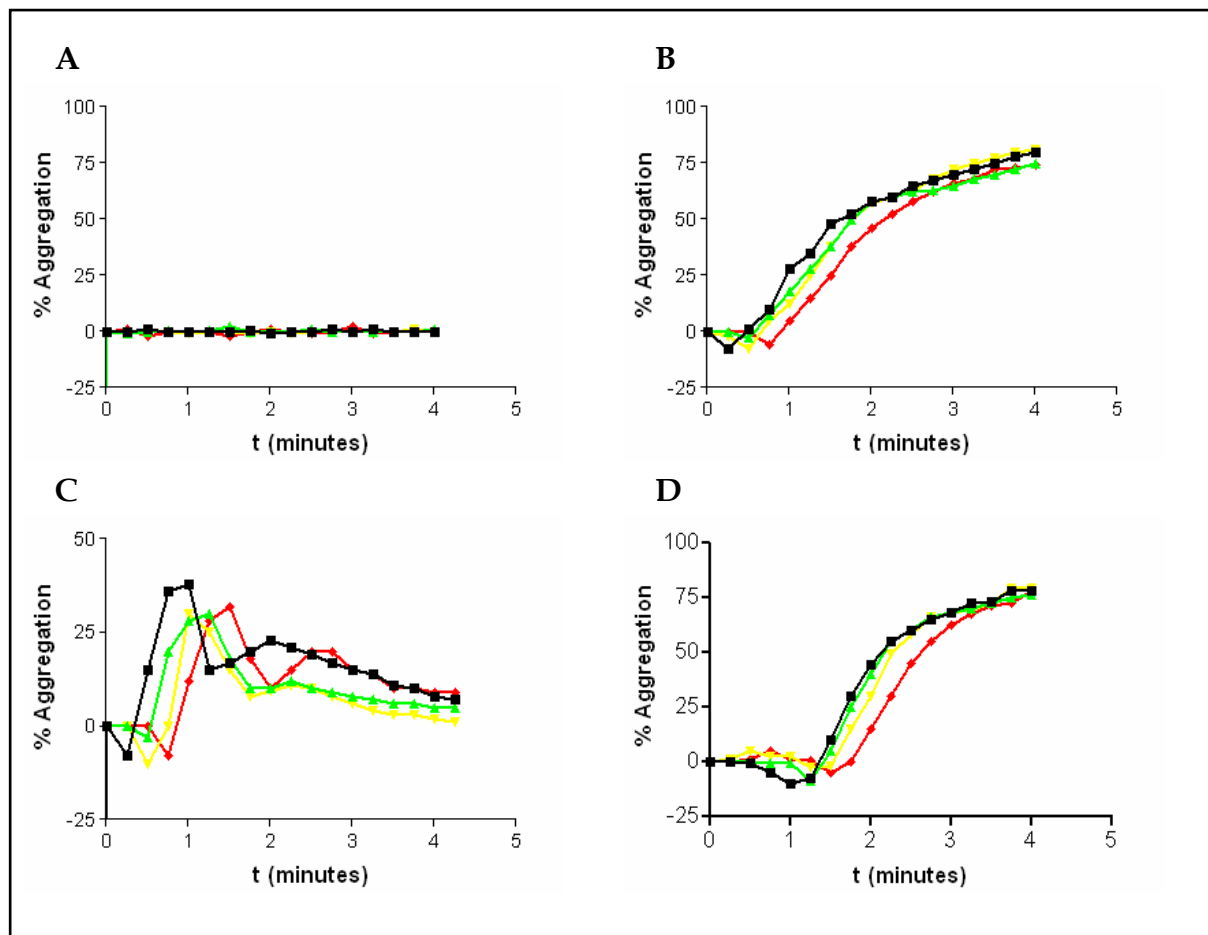


Abb. 4.21 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Aggregation der Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Die Blutplättchen wurden unter konstantem Rühren (Plättchenaggregometer, 1000 rpm) mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) präinkubiert (5 Minuten, 37°C). (A) Plättchenaggregation nach Insulinstimulation. (B) Plättchenaggregation nach Stimulation mit Insulin und 0,0025 U/ml. (C) Aggregation nach Stimulation mit Insulin und 1 μM ADP. (D) Aggregation der Blutplättchen nach Stimulation mit 3 μg/ml Kollagen und Insulin. In allen Experimenten wich die Aggregation der Kontrolle ohne Insulin (■) nicht signifikant von der Aggregation der mit 0.1 nM Insulin (▼), 1 nM Insulin (▲) oder 100 nM Insulin (◆) Proben ab.

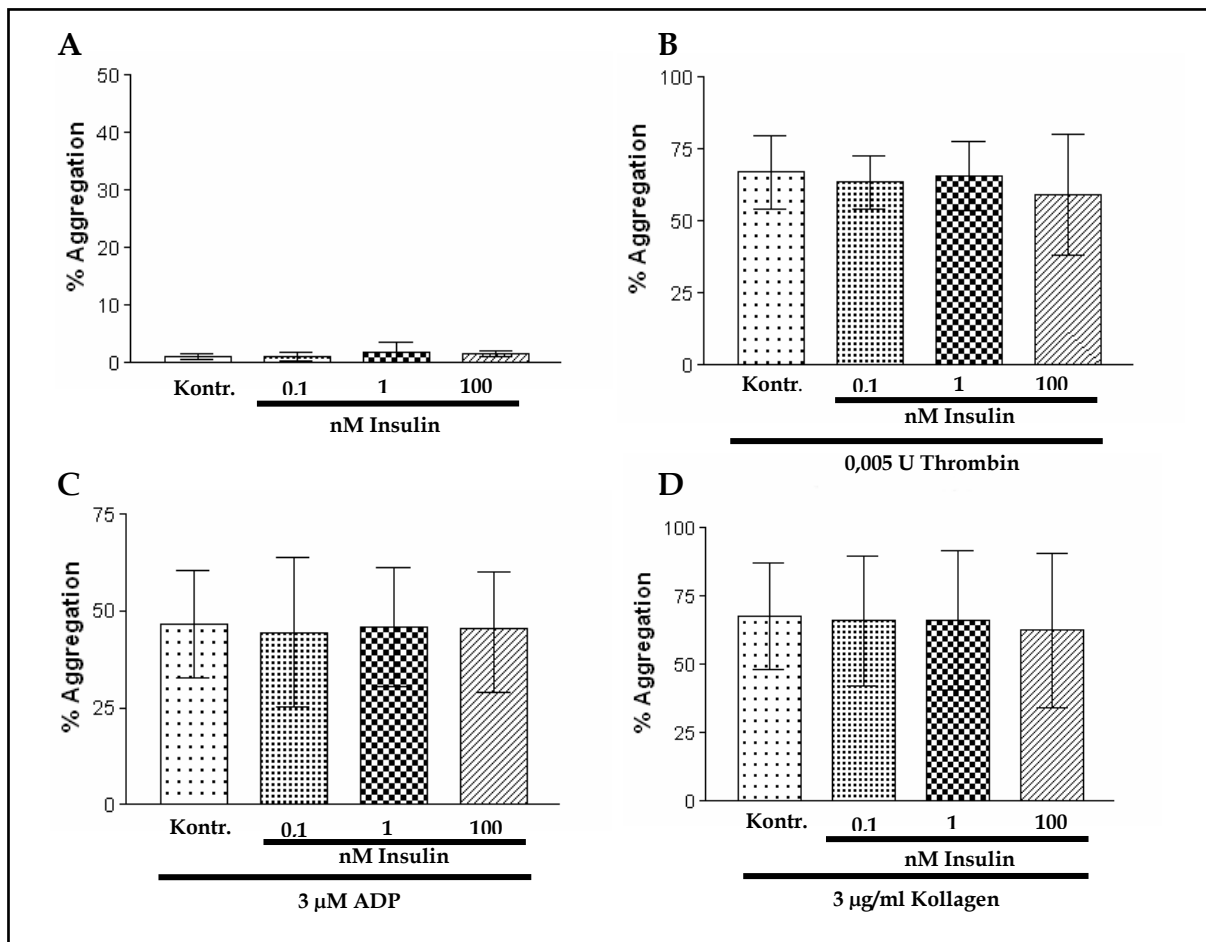


Abb. 4.22 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Maximalaggregation der Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. . (A) Insulin alleine hat keinen Einfluß auf die Maximalaggregation der Blutplättchen. Die Maximalaggregation der Blutplättchen nach Stimulation 0,0025 U Thrombin (B), 1 μ M ADP (C) und 3 μ g/ml Kollagen (D) wird durch Insulin (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht beeinflusst. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Maximalaggregation \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt.

4.3.4 Die Ca^{2+} Mobilisierung in Blutplättchen wird bei pathologischen Glukosekonzentrationen von Insulin nicht beeinflusst

Wie schon bei physiologischen Glukosekonzentrationen konnten wir auch unter hyperglykämischen Bedingungen die beschriebene signifikante Hemmung der ADP-induzierten Ca^{2+} Mobilisierung durch Insulin¹²⁴ nicht nachweisen. Die Blutplättchen wurden mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM), sowie mit Thrombin (0,01 U/ml) und ADP (5 μ M) in An- und Abwesenheit von Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) stimuliert. Das der Ca^{2+} Mobilisierung proportionale Fluoreszenzsignal wich

nach 5 minütiger Insulinstimulation (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht signifikant von demjenigen der unstimulierten Kontrolle ab. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei $514,7 \pm 3,12$ für die unstimulierte Kontrolle, bei $509,0 \pm 3,25$ nach Stimulation mit 0,1 nM Insulin, bei $513,4 \pm 4,93$ für 1 nM Insulin und bei $519,2 \pm 2,34$ nach der Stimulation mit 100 nM Insulin (Abb. 4.23 A). Ähnlich verhielt es sich nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin (0,01 U/ml) und ADP (5 μ M) in An- und Abwesenheit von Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM). Hier konnte ebenfalls keine signifikante Abweichung in dem zu der Ca^{2+} Mobilisierung der Blutplättchen proportionalem Fluoreszenzsignal festgestellt werden.

Die Stimulation mit Thrombin (0,01 U/ml) und ADP (5 μ M) führte zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz. Die Präinkubation (5 Minuten) mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) hatte keinen Einfluß auf die durch Thrombin und ADP induzierte Ca^{2+} Mobilisierung und den damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenz. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag für Thrombin zwischen $666,0 \pm 116,1$ für die nur mit Thrombin stimulierte Kontrolle, bei $681,8 \pm 119,7$ für 0,1 nM Insulin + Thrombin, bei $677,2 \pm 117,2$ für 1 nM Insulin + Thrombin and bei $676,2 \pm 118,5$ für 100 nM Insulin + Thrombin (Abb. 4.23 B). Eine Stimulation der Thrombozyten mit 5 μ M ADP führte zu einer durchschnittlichen Fluoreszenz von $644,7 \pm 98,54$ im Fall der nur mit ADP stimulierten Probe, $628,8 \pm 89,03$ für die mit 0,1 nM Insulin + ADP stimulierten Plättchen, $627,1 \pm 82,11$ nach der Stimulation mit 1 nM Insulin + ADP und $622,0 \pm 82,01$ nach Stimulation mit 100 nM Insulin + ADP (Abb. 4.23 C).

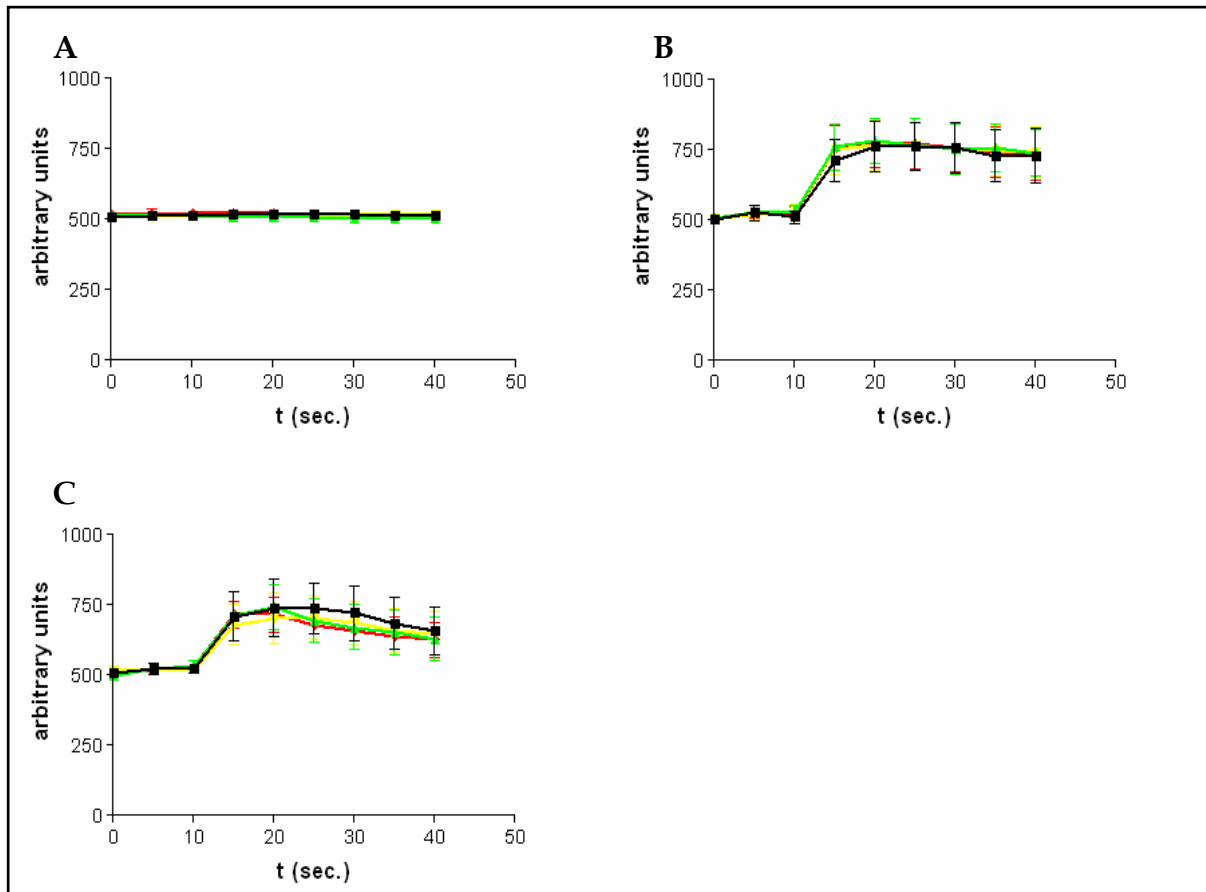


Abb. 4.23 Der Ca^{2+} Spiegel in Blutplättchen wird auch bei einem Glukosewert von 30 mM durch Insulin nicht beeinflusst. Insulin zeigte keinen Effekt auf die zu der Ca^{2+} Mobilisierung proportionalen Fluoreszenz in den nur mit Insulin behandelten Blutplättchen (A) sowie in den mit Insulin und 0,01 U/ml Thrombin (B) oder 5 μM ADP (C) co-stimulierten Plättchen. In allen Experimenten zeigte die Kontrolle ohne Insulin (■) keine Abweichung in der zu der Ca^{2+} Mobilisierung proportionalen Fluoreszenz im Vergleich zu den mit 0.1 nM Insulin (▼), 1 nM Insulin (▲) oder 100 nM Insulin (◆) stimulierten Proben. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Fluoreszenz \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten dargestellt.

4.3.5 Intrazelluläre Signalwege

Eine Insulin induzierte Wirkung auf die Aktivierung, die Aggregation und den Ca^{2+} Spiegel der Thrombozyten konnte bisher auch unter pathologischen Glukosekonzentrationen nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der intrazellulären Signalwege sollte nun zeigen, inwieweit pathologische Glukosekonzentrationen zusammen mit physiologischen und pathologischen

Insulinkonzentrationen zu Veränderungen der Phosphorylierung der Signalproteine führt.

4.3.5.1 Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine akute Wirkung auf PKB in den Blutplättchen

Die Western Blot Analyse der PKB Phosphorylierung bei pathologischen Glukosekonzentrationen erbrachte keinen Nachweis einer insulinabhängigen Veränderung der Phosphorylierung. Wie bereits unter physiologischen Glukosewerten beobachtet, kam es nur durch 0,01 U Thrombin zu einem Anstieg der PKB Phosphorylierung, während diese nach der Gabe von Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht über den Wert der basalen Phosphorylierung der unstimulierten Probe hinausging. Die unterschiedlichen Insulinkonzentrationen hatten, wie schon unter physiologischen Glukosekonzentrationen, keinen Einfluß auf die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung von PKB (Abb. 4.24).

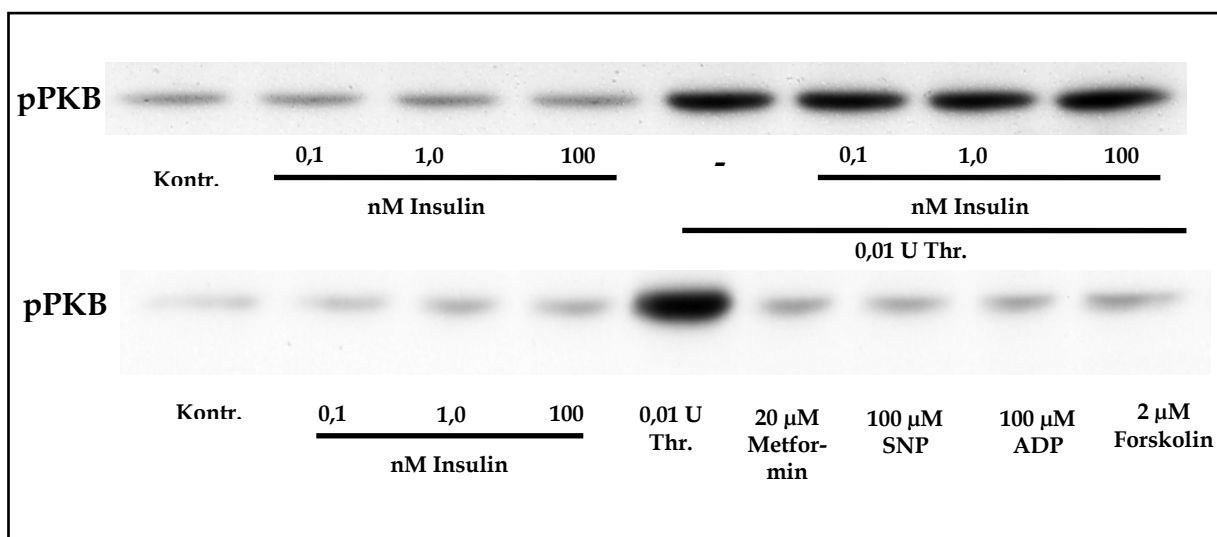


Abb. 4.24 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die PKB Phosphorylierung in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von PKB konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nachgewiesen werden. Lediglich die eingesetzten 0,01 U Thrombin führten zu einem Anstieg der PKB Phosphorylierung.

4.3.5.2 Keine insulinabhängige Wirkung auf die MAP-Kinase in den Blutplättchen bei pathologischen Glukosekonzentrationen

Ein Einfluß auf die Phosphorylierung von P38 und ERK MAPK durch Insulin konnte bei pathologischen Glukosewerten nicht nachgewiesen werden. Hier zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie bei physiologischen Glukosekonzentrationen. Die Phosphorylierung der mit 0,1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin stimulierten Proben wichen nicht von dem basalen Wert der unstimulierten Kontrollprobe ab. Lediglich Thrombin (0,01 U) und ADP (100 µM) führten hier zu einem Anstieg der Phosphorylierung. Die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung von P38 und ERK MAPK wurde durch eine 5 minütige Präinkubation mit Insulin (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) nicht verändert (Abb. 4.25).

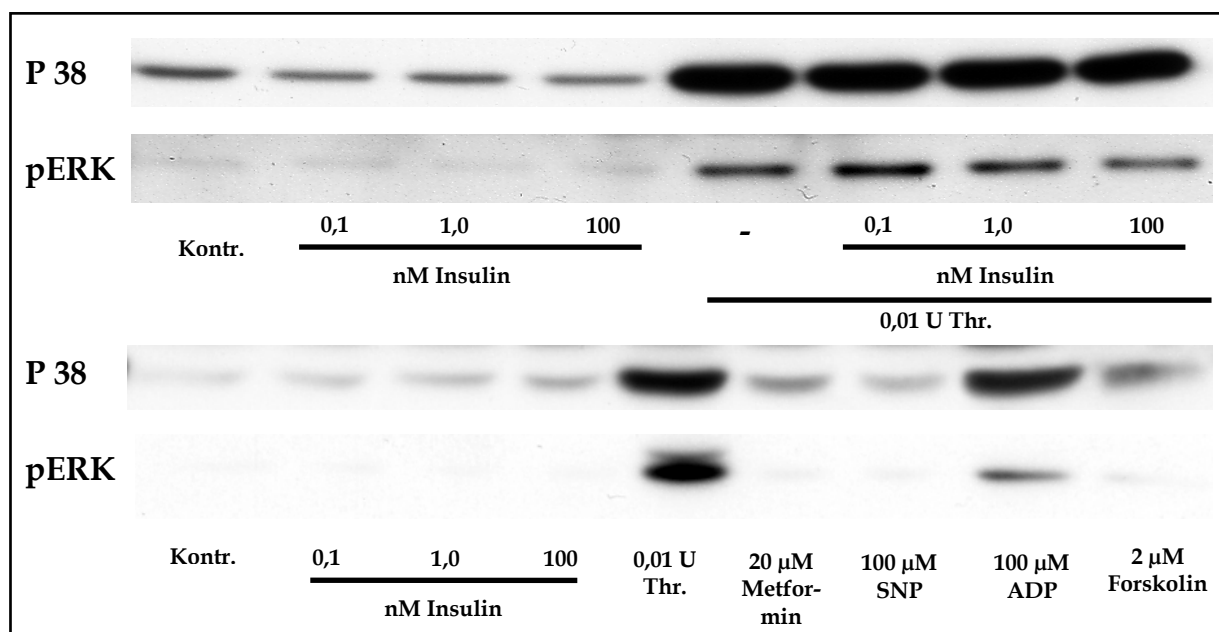


Abb. 4.25 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die MAP-Kinase Signalweg Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von P 38 und ERK konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) nachgewiesen werden. Ein Anstieg der Phosphorylierung wurde nur durch die Stimulation mit 0,01 U Thrombin und 100 µM ADP herbeigeführt.

4.3.5.3 Einfluß von Insulin auf AMPK unter hyperglykämischen Bedingungen

Wie bereits bei der Phosphorylierung von PKB und der MAP-Kinase Signalkaskade, zeigte das Insulin ebenfalls keinen Einfluß auf die Phosphorylierung vom AMPK. Hier wick die Phosphorylierung der mit Insulin behandelten Proben nicht von der unbehandelten Kontrollprobe ab. Nur die Stimulation mit 20 μM des AMPK Aktivators Metformin führte zu einem Anstieg der AMPK Phosphorylierung (Abb. 4.26).

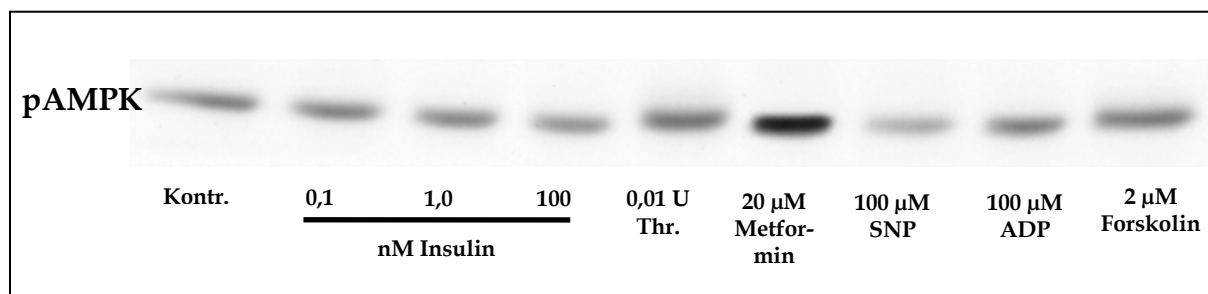


Abb. 4.26 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die AMPK Phosphorylierung in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von AMPK konnte blieb bei allen eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) aus. Ein Anstieg der Phosphorylierung von AMPK konnte nur nach der Stimulation mit 20 μM des AMPK Aktivators Metformin beobachtet werden.

4.3.5.4 Insulin zeigt unter hyperglykämischen Bedingungen keine Wirkung auf die VASP Phosphorylierung der Blutplättchen

Das schon für PKB, MAP-Kinase und AMPK beobachtete Ergebnis zeigte sich auch im Fall der verschiedenen Phosphorylierungsstellen von VASP. Die Stimulation mit Insulin führte, wie bereits unter physiologischen Glukosekonzentrationen, zu keiner Veränderung der Phosphorylierung bei VASP Ser¹⁵⁷, VASP Ser²³⁹ und VASP Thr²⁷⁸ (Abb.) Ein Einfluß von Insulin auf die durch Thrombin induzierte Zu- (VASP Ser¹⁵⁷) bzw. Abnahme (VASP Ser²³⁹) der Phosphorylierung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 4.27). Neben Thrombin führten die als zusätzliche Kontrolle verwendeten SNP und Forskolin zu einem Anstieg der Phosphorylierung

von VASP Ser¹⁵⁷ und VASP Ser²³⁹. Es ist daher darauf zu schließen, daß innerhalb der Blutplättchen keine Wirkung auf cGMP und cAMP von Insulin ausgeht.

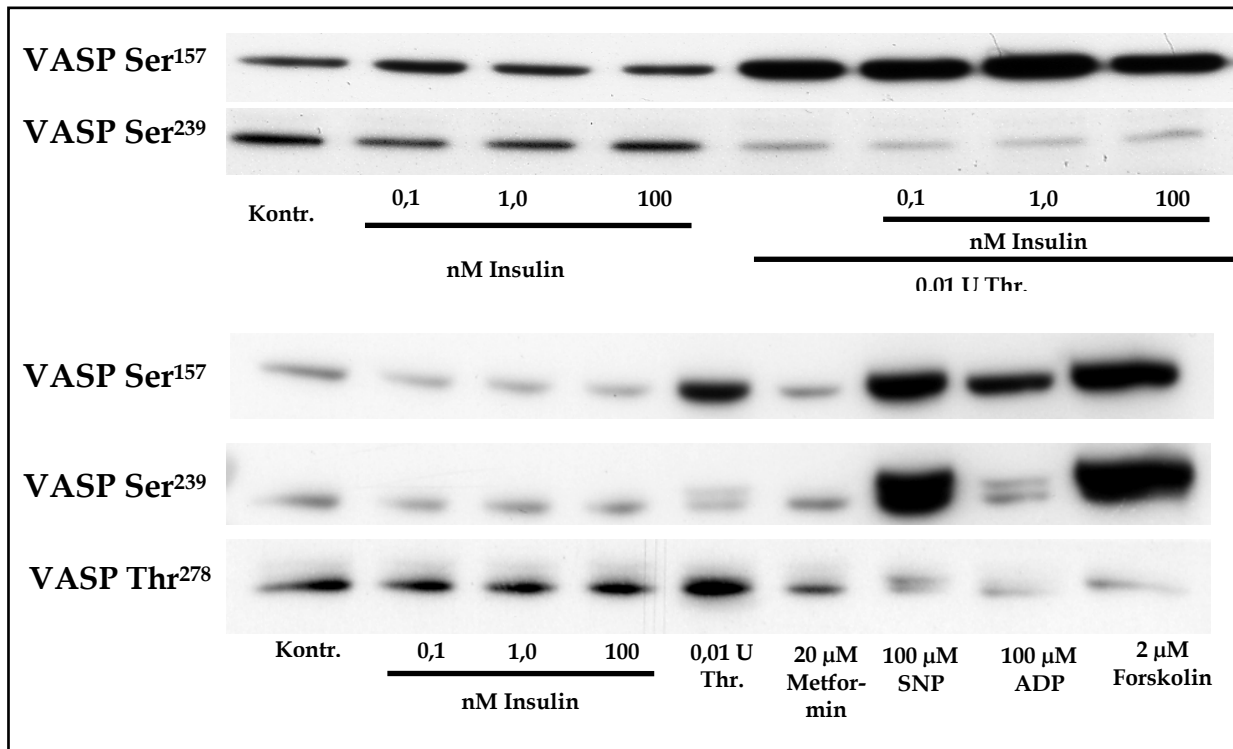


Abb. 4.27 Kein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die VASP Phosphorylierung in Blutplättchen bei einem Glukosewert von 30 mM. Ein durch Insulin hervorgerufener Effekt auf die Phosphorylierung von VASP konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 100 nM) nachgewiesen werden. Lediglich SNP und Forskolin führten zu einem Anstieg der Phosphorylierung von VASP Ser¹⁵⁷ und VASP Ser²³⁹ unter pathologischen Glukosekonzentrationen.

4.4 Zeitabhängiger Insulineffekt auf Blutplättchen

Verschiedene Studien weisen darauf hin, daß von Insulin ein zeitabhängiger Effekt auf die Blutplättchen ausgeht.⁷³ Da wir mit unseren vorhergehenden Experimenten eine Wirkung des Insulins auf die Blutplättchen nach einer relativ kurzen Inkubation (5 Minuten) nicht nachweisen konnten, wurden die Blutplättchen 10, 15 und 30 Minuten mit Insulin inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde hierbei hitzeinaktiviertes Insulin verwendet, um einen etwaigen durch die Alterung der Plättchen bedingten Effekt ausschließen zu können.

Ein zeitabhängiger Effekt des Insulins auf die intrazellulären Signalwege konnte mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der

Signalproteine PKB, VASP Ser¹⁵⁷, P38 und ERK nimmt im Zeitverlauf kontinuierlich ab, bzw. im Fall von VASP Ser²³⁹ kontinuierlich zu, ohne daß hierbei ein Unterschied zwischen den unstimulierten und den mit hitzeinaktiviertem bzw. funktionsfähigen Insulin stimulierten Plättchenproben erkennbar gewesen wäre (Abb. 4.28).

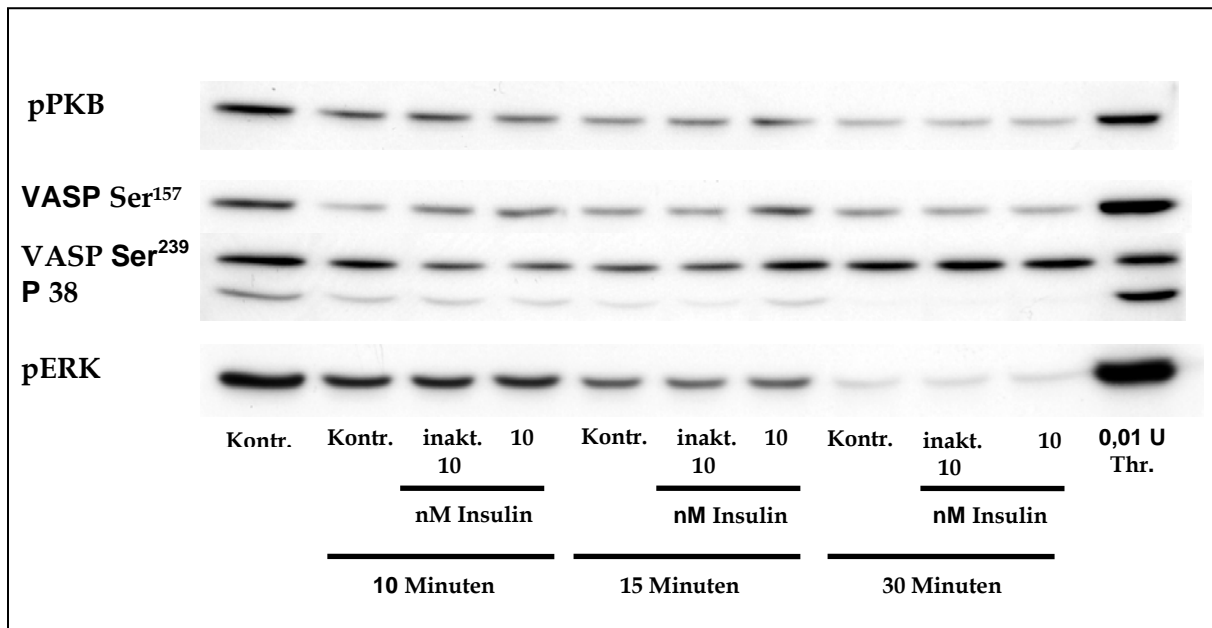


Abb. 4.28 Kein zeitabhängiger Effekt von Insulin auf die Signalkaskaden in Blutplättchen. Die Stimulation mit 10 nM Insulin und 10 nM hitzeinaktiviertem Insulin führte im Zeitverlauf über 30 Minuten zu keiner von der unstimulierten Kontrolle abweichenden Phosphorylierung von PKB, VASP Ser¹⁵⁷, VASP Ser²³⁹, P 38 und ERK.

4.5 Der Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor wurde für humane Blutplättchen erstmals 1979 beschrieben.⁶² Mittels Bindungsanalyse von radioaktiv markiertem ¹²⁵I-insulin wurde die Anzahl der Insulinrezeptoren auf der Plättchenoberfläche auf ~ 570 geschätzt. Erst 1988 erfolgte der Nachweis der Insulinrezeptors durch Western Blot.⁶³ Diesem Nachweis fehlte jedoch die Positivkontrolle. Nach der Bindung von Insulin wird die intrazelluläre Domäne des IR am Tyr¹¹⁴⁶ phosphoryliert. Hierdurch werden mehrere intrazelluläre Signalwege über das Insulinrezeptor Substrat (IRS) aktiviert.

Da die bisherigen Ergebnisse auf das Fehlen eines funktionell aktiven Insulinrezeptors auf der Oberfläche der Thrombozyten hindeuteten, wurde sein Vorhandensein mittels Western Blot und rtPCR überprüft. Als Positivkontrolle dienten Endothelzellen der ECV 304 Zelllinien.

4.5.1 Western Blot

ECV 304 Zellen wurden bei 37°C 5 Minuten mit 10 nM Insulin inkubiert. Die Stimulation der Thrombozyten erfolgte mit 0,1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin derselben Lösung. Die Western Blot Analyse der mit Insulin stimulierten Blutplättchen und Endothelzellen bestätigte, daß den Thrombozyten ein funktionell aktiver IR fehlt und zeigte zugleich, daß das von uns eingesetzte Insulin wirksam ist.

Wir konnten den Insulinrezeptor und seine phosphorylierte Form (pIR) nach 5 minütiger Inkubation mit Insulin auf den Endothelzellen nachweisen, hingegen nicht auf den Thrombozyten. Phospho-PKB, phospho-P38 und phospho-ERK konnte ebenfalls für die Endothelzellen nachgewiesen werden, nicht jedoch für die Thrombozyten (Abb. 4.29). Es ist davon auszugehen, daß die schwachen Signale für IR, die in der humanen Plättchenprobe zu sehen sind, auf unspezifische Bindungsreaktionen zurückzuführen sind, da ein Signal für p-IR nach der Stimulation mit 0,1 nM, 1 nM und 100 nM Insulin nicht nachgewiesen werden konnte.

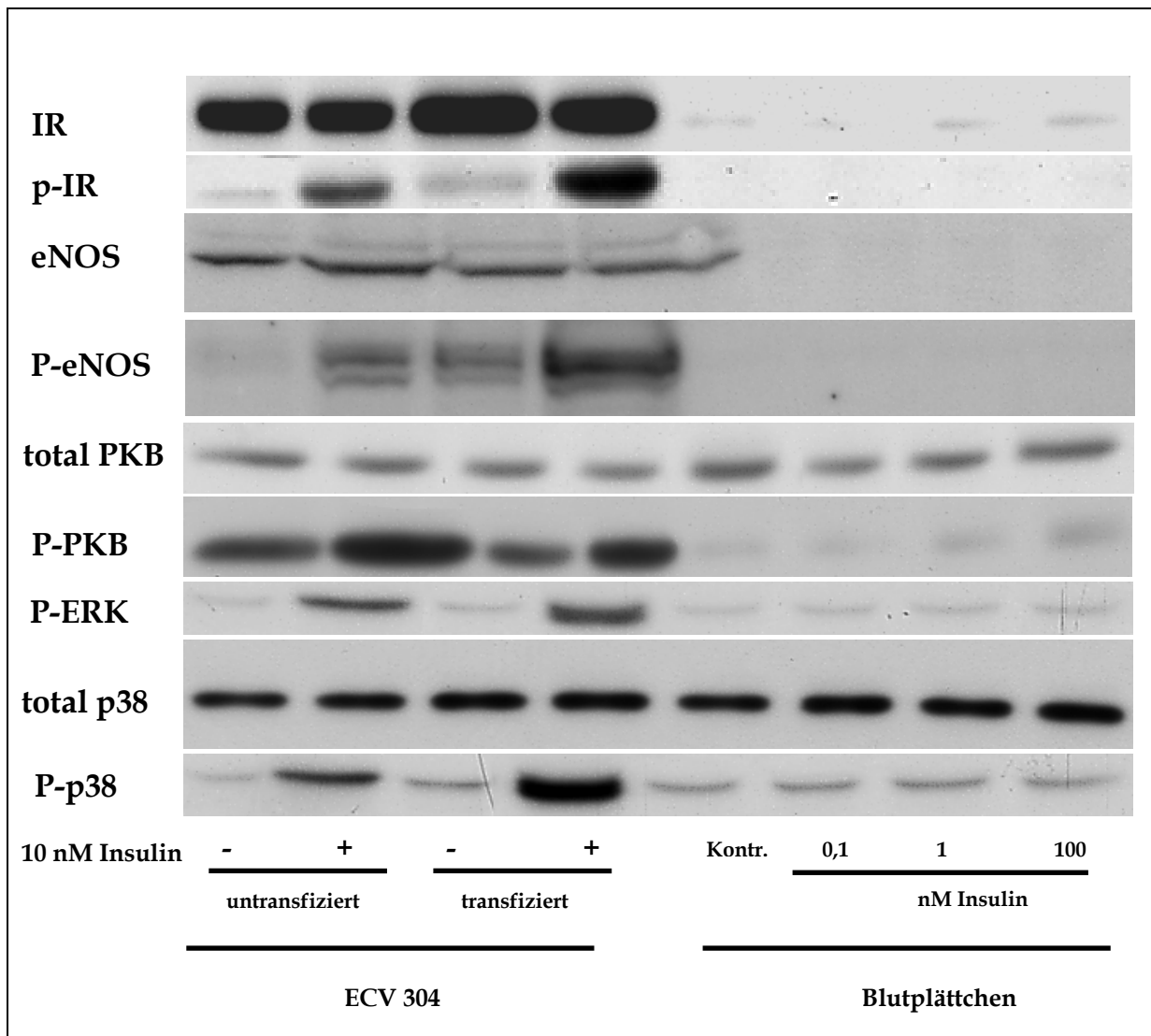


Abb. 4.29 Der Insulinrezeptor ist mittels Western Blot auf Endothelzellen, nicht aber auf Blutplättchen nachweisbar. In Kultur gehaltene ECV304 Zellen, sowie ECV304 Zellen, welche den IR überexprimieren und gewaschene humane Blutplättchen wurden mit Insulin stimuliert. Nach fünf Minuten Stimulation wurden die Zellen lysiert und Proben für einen Western Blot gegen IR, P-IR, eNOS, P-eNOS, total p38, P-p38 P-ERK, P-PKB, und total PBK entnommen. Die Abbildung ist repräsentativ für vier verschiedene Experimente mit ähnlichem Ergebnis. IR, P-IR, P-eNOS, P-p38, P-ERK und P-PKB konnten nach Insulinstimulation für die Endothelzellen, nicht jedoch für die Blutplättchen nachgewiesen werden.

4.6 eNOS in Blutplättchen

Mehrer Publikationen weisen auf die Existenz von eNOS in Blutplättchen und auf seine Rolle in der Aktivierung und Hemmung der Thrombozyten hin. ^{73, 136,}

¹³⁷ So soll es u. A. eine Rolle bei der von Flemming *et al.* beschriebenen Hemmung der Blutplättchen durch Insulin spielen.^{70, 132}

Mit dem von Flemming *et al.* ebenfalls verwendeten Antikörper gegen phospho-eNOS Ser¹¹⁷⁷ gelang uns zunächst ebenfalls der Nachweis von phospho-eNOS in Blutplättchen mittels Western Blot. Hierbei war eine deutliche Bande nur nach Stimulation mit dem Agonisten Thrombin und nicht nach Stimulation mit Insulin sichtbar. Nachdem wir als Negativkontrolle eNOS ^{-/-} doppel-knock-out Mäuse verwendeten, zeigte sich hier gleichfalls eine Bande für P-eNOS nach Thrombin Stimulation. Wir müssen daher davon ausgehen, daß der polyklonale P-eNOS Ser¹¹⁷⁷ Antikörper nicht nur P-eNOS erkennt, sondern auch ein anderes Protein von gleichem Proteingewicht, welches nach Thrombin Stimulation ebenfalls phosphoryliert wird.

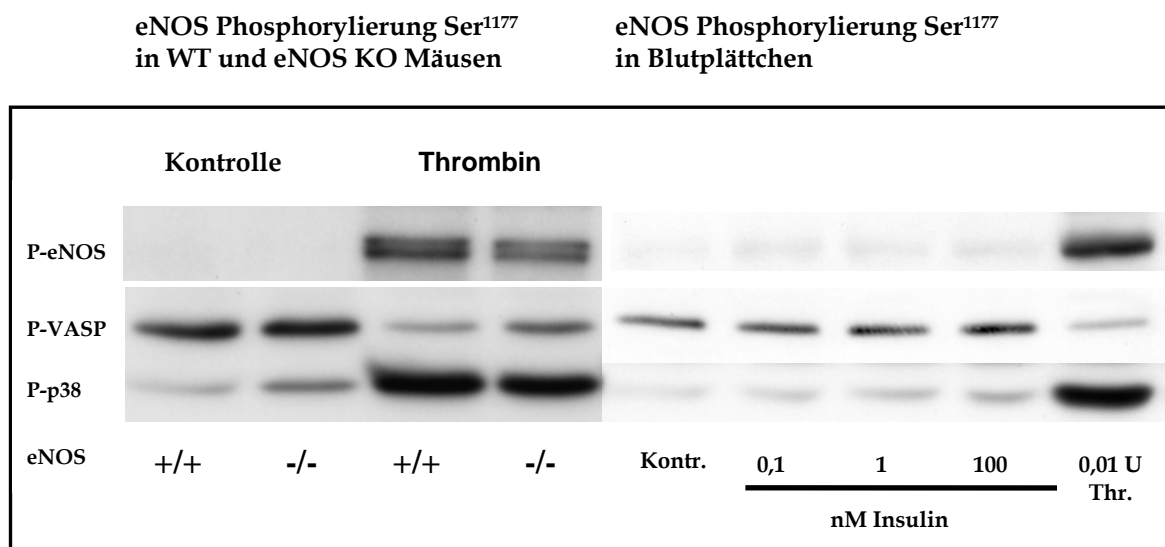


Abb. 4.30 Der P-eNOS Ser¹¹⁷⁷ Antikörper erkennt ebenfalls ein anderes Protein von gleichem Proteingewicht. Mit dem von uns verwendeten p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ Antikörper ließ sich in eNOS doppel-knock-out Mäusen eine Proteinbande nach Thrombinstimulation erkennen.

4.7 Flußkammerversuche**4.7.1 Adhäsion der Blutplättchen an Kollagen IV**

Zu der weiteren Untersuchung einer Wirkung des Insulins auf die Plättchenfunktion wurde die Adhäsion humaner Blutplättchen auf eine Kollagen IV-beschichtete Oberfläche unter konstantem Fluß ($\tau = 0,8$ [dyn/cm²]) in An- und Abwesenheit von Insulin (10 nM) beobachtet. Nach 15 minütigem Fluß wurde die Bindung der Blutplättchen an die Kollagen IV-beschichtete Oberfläche gemessen. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsion in An- und Abwesenheit von Insulin beobachten. Die durch die Thrombozyten bedeckte Oberfläche der Flußkammer lag bei 28,89 % \pm 7,38 % bei den unbehandelten Thrombozyten und bei 31,24 % \pm 9,72 % nach der Stimulation mit 10 nM Insulin (n = 6, Abb. 4.31).

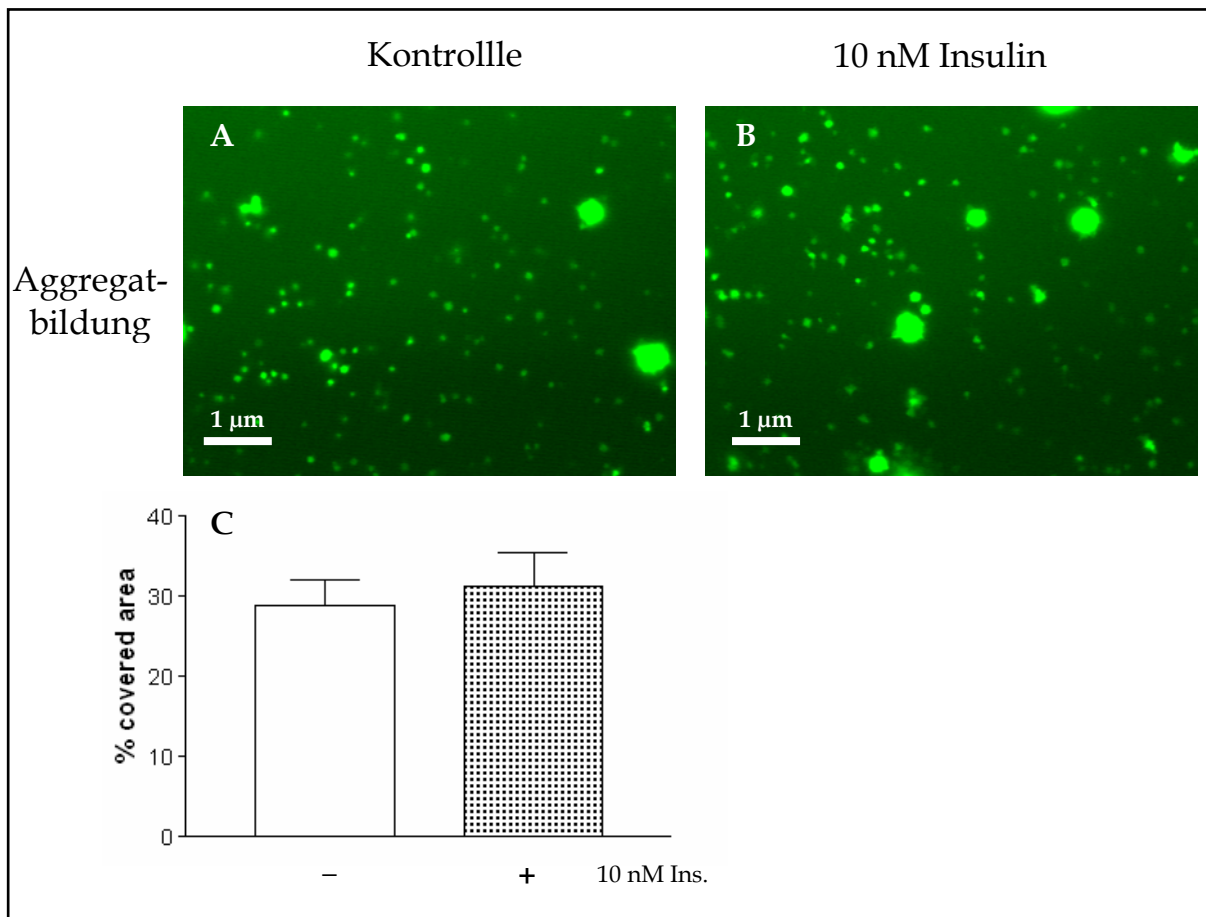


Abb. 4.31 Die Bildung von Plättchenaggregaten an Kollagen wird durch Insulin nicht beeinflusst. Unter konstantem Fluß ($\tau = 0,8$ [dyn/cm²]) wurde die Adhäsion der Blutplättchen an Kollagen IV gemessen. Die Stimulation mit Insulin (10 nM) führt zu keiner signifikanten Verringerung der Plättchenadhäsion an das Kollagen. Der Graph in Abbildung C zeigt die durchschnittliche bedeckte Fläche \pm SEM aus 6 einzelnen Experimenten, * $p < 0,05$.

4.7.2 Aggregatbildung auf Endothelzellen

Da eine direkte akute insulininduzierte Wirkung auf die Plättchenadhäsion und -aggregation nicht nachgewiesen werden konnte, untersuchten wir nun die Möglichkeiten eines indirekten durch das Insulin herbeigeführten Effekts auf die Plättchenadhäsion und -aggregation über eine antithrombotische Wirkung des Endothels. Daher wurde die Adhäsion humaner Plättchen auf eine mit Endothelzellen bedeckte Oberfläche unter konstanten Flußbedingungen ($\tau = 0,8$

[dyn/cm²]) in An- und Abwesenheit von Insulin (10 nM) gemessen. Die Stimulation mit 10 nM Insulin führte zu einer signifikanten Abnahme der Plättchenaggregation auf der Endothelzellschicht. Die mit Thrombozyten bedeckte Oberfläche lag im Fall der unstimulierten Kontrolle bei 23,47 % ± 11,60 %, während nach der Stimulation mit Insulin nur noch 4,80 % ± 4,62 % der Oberfläche bedeckt war (n = 6, p < 0,05, Abb. 4.32). Des Weiteren kam es durch die Stimulation mit Insulin zu einer Aktivierung von eNOS innerhalb der Endothelzellen (Abb. 4.33). Wir schließen daraus, daß der beobachtete Rückgang der Plättchenadhäsion und -aggregation an die Endothelzellen auf den durch das Insulin induzierten Effekt auf diesen zurückzuführen ist, durch den es zu einem Anstieg der NO Produktion kommt.

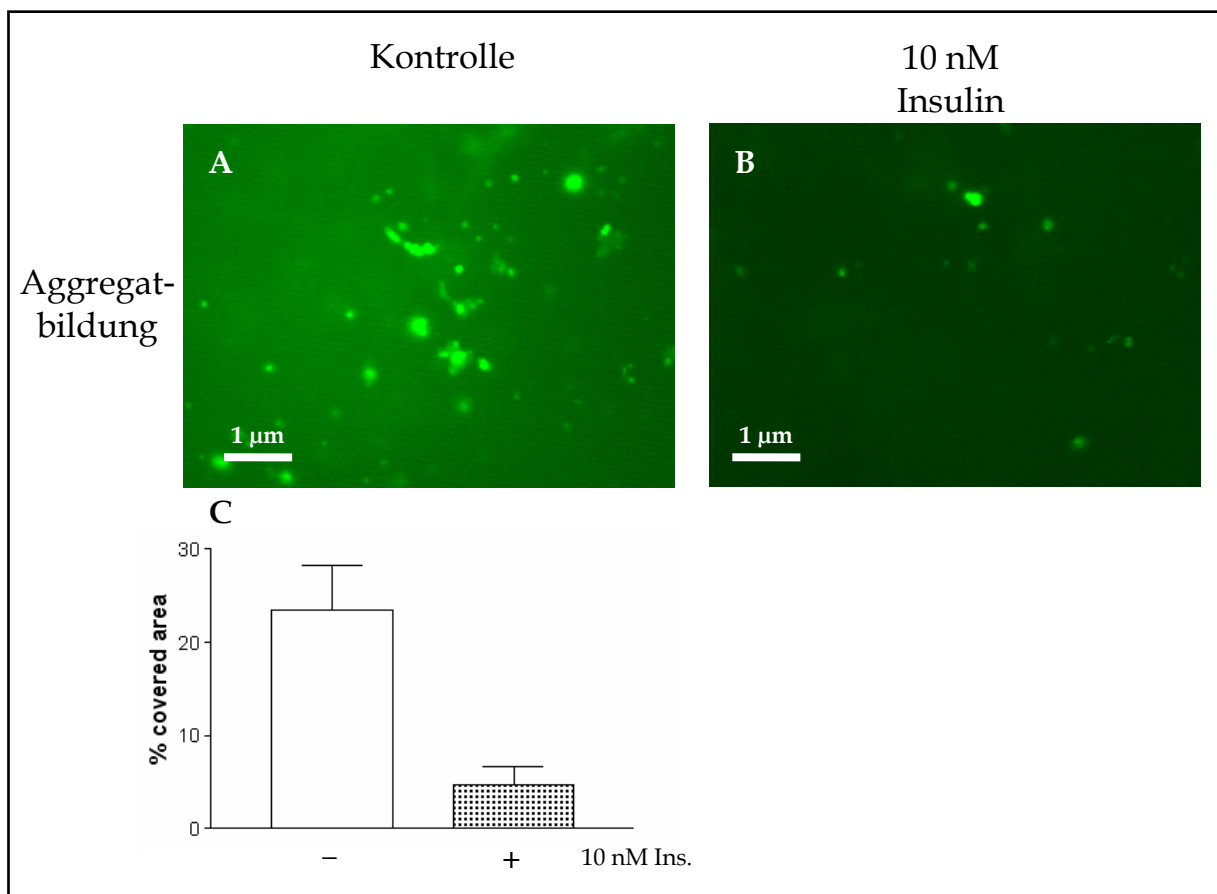


Abb. 4.32 Auswirkung von hohen Insulinkonzentrationen auf die Thrombusbildung. Unter konstantem Fluß ($\tau = 0,8$ [dyn/cm²]) wurde die Adhäsion der Blutplättchen an ECV 304 Endothelzellen gemessen. Die Stimulation mit Insulin (10 nM) führt zu einer signifikanten Verringerung der Plättchenadhäsion an die Endothelzellen. Der Graph in Abbildung C zeigt die durchschnittliche bedeckte Fläche ± SEM aus 6 einzelnen Experimenten, * p < 0,05.

4.7.3 Wirkung von Insulin auf das Endothel

Der von uns beobachtete Rückgang der Plättchenadhäsion an das Endothel nach der Stimulation mit 10 nM Insulin ist auf eine durch dieses herbeigeführte Aktivierung von eNOS innerhalb der Endothelzellen zurückzuführen. Dies führte zu einem Anstieg der NO-Produktion im Endothel, welcher durch einen Anstieg der Fluoreszenz des DAF-FM sichtbar wurde (Abb. 4.33). Das frei werdende NO wirkte hemmend auf die Blutplättchen und verminderte ihre Adhäsion an das Endothel.

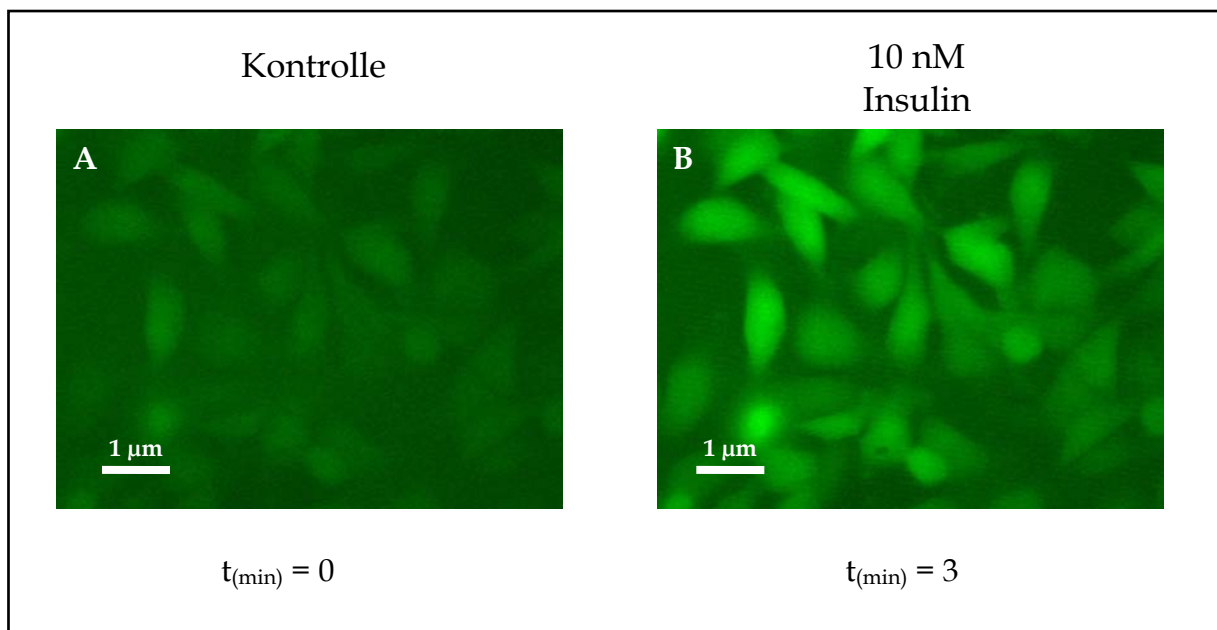


Abb. 4.33 Zeitabhängiger Anstieg der NO-Produktion in Endothelzellen nach Insulinstimulation. Die Stimulation mit Insulin (10 nM) führt zu einem sichtbaren Anstieg der NO-Produktion. (A) NO-Produktion in den Endothelzellen vor der Stimulation mit 10 nM Insulin. (B) NO-Produktion in den Endothelzellen nach der Stimulation mit 10 nM Insulin.

5. DISKUSSION

5.1. Aktivierung der Blutplättchen durch Insulin

Die dieser Forschungsarbeit zu Grunde liegenden Daten werfen ein neues Licht auf die widersprüchlichen Berichte bezüglich der Insulinwirkung auf Blutplättchen. Die wichtigste Entdeckung und die sich daraus ergebende Schlußfolgerung unserer Studie sind, daß Insulin anti- und/oder prothrombotischen Signalwege innerhalb der Blutplättchen nicht direkt beeinflusst. Vielmehr inhibiert es indirekt Wechselwirkungen zwischen dem Endothel und den Blutplättchen, indem Insulin zu einem Anstieg der endothelialen Stickstoffmonoxid-Produktion führt. Eine ebenfalls wichtige Beobachtung bestand darin, daß ein Teil der bereits publizierten widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Insulinwirkung auf die Aktivierung/Hemmung der Thrombozyten auf das verwendete Lösungsmittel des Insulins zurückgeführt werden kann. Wurde das Insulin in reinem H₂O gelöst, so konnten keine stimulierenden oder inhibierenden Effekte beobachtet werden, während das Lösungsmittel, das bei klinischer Anwendung eingesetzten Insulins zu einer Aktivierung der Blutplättchen führte. Diese Aktivierung beschränkte sich auf den Integrinrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Eine durch das Lösungsmittel des Insulins hervorgerufene Wirkung auf die Blutplättchen liegt wahrscheinlich auch den Beobachtungen von Murer *et al.* zugrunde, bei denen eine durch Insulin hervorgerufene Aggregation der Blutplättchen beschrieben wird.⁶⁴ Diese Aggregation wurde ebenfalls durch ein Insulin-Lösungsmittelgemisch (Humulin) hervorgerufen. Das von uns verwendete Insuman rapid®, welches im gleichen Lösungsmittel wie Humulin gelöst ist, führte ebenfalls zu einer Aktivierung der Blutplättchen, während das reine Insulin hier keine Wirkung zeigte.

5.2. Wirkung des Insulins auf intrazelluläre Signalwege

Ein akuter, durch das Insulin hervorgerufener Effekt auf die intrazellulären Signalwege im Blutplättchen konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden.

Die für das Insulin in anderen Zelltypen beschriebenen^{50, 51} und durch den Insulinrezeptor vermittelten Signalwege über PKB,^{125, 126} und MAPK^{53, 60, 127} wurden in unseren Untersuchungen an Thrombozyten durch Insulin nicht beeinflusst. Hier widersprechen unsere Ergebnisse früheren Publikationen, die eine gesteigerte Aktivierung der Blutplättchen nach der Stimulation mit physiologischen^{65, 66} ebenso wie mit supraphysiologischen⁶⁴ Insulinkonzentrationen zeigen. Durch reines Insulin kam es zu keiner veränderten Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle wie Akt/PKB, ERK, p38 MAPK und VASP (Abb. 4.11 - 4.14). Die durch Thrombin induzierte Veränderung in der Phosphorylierung dieser Proteine wurde durch Insulin ebenfalls nicht beeinflusst.

Akt/PKB ist ein wichtiger Knotenpunkt in den durch Insulin aktivierten Signalwegen¹²⁵, wie sie beispielsweise für Leber- und Fettzellen beschrieben sind, und wird durch PDK1 am Thr³⁰⁸ phosphoryliert.¹²⁶ Wir konnten hingegen keine durch Insulin hervorgerufene Phosphorylierung von Akt/PKB Thr³⁰⁸ in Blutplättchen nachweisen, während in ECV 304 Zellen die Phosphorylierung von Akt/PKB Thr³⁰⁸ nach der Stimulation mit Insulin anstieg (Abb. 4.28). Weitere intrazelluläre Ziele des Insulins sind die P38 MAPK und ERK1/2 Proteine des Ras-MAPK Signalwegs.⁵³ Für ERK 1/2 wurde gezeigt, daß es IRS1 an Serinresten phosphoryliert und dadurch als negativer Rückkopplungsmechanismus für die Wirkungen des Insulins dient.¹²⁷ Die Aktivierung von p38 MAPK durch Insulin wird für die GLUT4 Translokation benötigt.⁶⁰ In gewaschenen humanen Blutplättchen konnten wir keine Phosphorylierung von P38 MAPK und ERK1/2 nach Insulinstimulation nachweisen (Abb. 4.12).

Die Phosphorylierung von VASP korreliert mit der Hemmung der Blutplättchen und der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung.^{128, 129} VASP wird sowohl durch cAK als auch durch cGK am Ser¹⁵⁷ und Ser²³⁹ phosphoryliert.^{128, 130, 131} Eine durch Insulin hervorgerufene Veränderung der basalen Phosphorylierung von VASP Ser¹⁵⁷ und Ser²³⁹ in den gewaschenen Blutplättchen konnte von uns nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls hatte Insulin keine Wirkung auf die durch Thrombin hervorgerufenen Veränderungen in der Phosphorylierung von VASP Ser¹⁵⁷ und Ser²³⁹. Dies deutet darauf hin, daß der cGMP/PKG und cAMP/PKA Signalweg in Blutplättchen nicht durch Insulin beeinflusst werden, da angenommen wird, daß

PKA und PKG zwei der wichtigsten Ziele stromabwärts des NO/cGMP und Prostazyklin/cAMP Signalwegs in Blutplättchen sind, die zu der VASP Phosphorylierung führen.¹³⁸⁻¹⁴⁰

Fleming *et al.* beschreiben in ihren Studien einen zeitabhängigen Insulineffekt auf die PKB Phosphorylierung in Blutplättchen.⁷³ Hier wurde ein Anstieg der PKB Phosphorylierung im Zeitraum einer 30 minütigen Insulinstimulation demonstriert. Diesen Ergebnissen widersprechen die von uns erhobenen Daten. Ein zeitabhängiger Insulineffekt auf die Signalwege innerhalb der Blutplättchen konnte von uns nicht nachgewiesen werden. In unseren Experimenten nahm die Phosphorylierung von PKB, VASP Ser¹⁵⁷, VASP Ser²³⁹ und P38 sowie ERK MAPK in der unstimulierten Kontrolle und den mit Insulin und hitzeinaktiviertem Insulin stimulierten Proben kontinuierlich im Zeitverlauf ab bzw. im Fall von VASP Ser²³⁹ kontinuierlich zu (Abb. 4.29). Ein Unterschied zwischen Insulin, hitzeinaktiviertem Insulin und der unstimulierten Kontrolle war allerdings nicht ersichtlich.

Wir gehen davon aus, daß die in den vorangegangenen Publikationen beschriebenen zeitabhängigen Effekte auf die Präparation der Blutplättchen und/oder ihre Alterung außerhalb des körperlichen Milieus zurückzuführen ist. Ebenfalls fehlten hier unstimulierte Kontrollen und mit hitzeinaktiviertem Insulin stimulierte Proben.

5.3. Aggregation und Adhäsion der Blutplättchen

Vorangegangene Arbeiten zeigten eine herabgesetzte Sensibilität humaner Blutplättchen für Agonisten wie Thrombin, ADP oder Kollagen nach vorhergehender Insulin Stimulation.^{69, 70, 72, 73} Eine verzögerte Akkumulation und Aggregation wurde für murine Blutplättchen nach einer Stimulation mit Insulin nachgewiesen.⁶⁸ Während Touyz und Schiffrin noch keinen plausiblen Mechanismus der Insulininduzierten Hemmung der durch Thrombin hervorgerufene Aggregation der Blutplättchen anführen konnten,⁷² geht er nach Flemming *et al.* auf eine insulininduzierte Aktivierung von PKB und AMPK und eine daraus folgende Phosphorylierung von eNOS zurück, die zu einer Akkumulation von cGMP in den

humanen Blutplättchen führt.⁷³ Hierdurch kommt es zu der Hemmung der Plättchenaggregation. Dieser Anstieg des cGMP Spiegels innerhalb der Blutplättchen nach Insulinstimulation und eine daraus folgende Hemmung der Aggregation wurde ebenfalls von Westerbacka *et. al.* beobachtet.⁷⁰ Dem gegenüber stehen Ergebnisse, in denen die zusätzliche Stimulation mit Insulin zu einer gesteigerten Aggregation der Blutplättchen nach der Gabe von ADP beobachtet wurde.^{64, 65} Von uns konnte weder ein die Aggregation der Blutplättchen begünstigender, noch ein vom Insulin ausgehender inhibierender Effekt auf die gewaschenen humane Blutplättchen beobachtet werden. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig die Abwesenheit einer signifikanten durch Insulin hervorgerufenen Wirkung auf die Plättchenaggregation und die durch verschiedene Agonisten induzierte Aggregation. Insulin alleine hatte keinen Einfluß auf die Plättchenaggregation und die durch Thrombin (0.0025 U/ml), ADP (1 μ M) und Kollagen (3 μ g/ml) hervorgerufene Aggregation (Abb. 4.8 + 4.9).

Eine zentrale Bedeutung in der Aggregation besitzt der Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Er bindet in aktiviertem Zustand lösliches plasmatisches Fibrinogen, sodaß sich zwischen benachbarten Thrombozyten „Fibrinogenbrücken“ bilden können. Durch unsere FACS-Analysen war ein auf das reine Insulin zurückzuführender Einfluß auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht nachweisbar. Insulin zeigte keine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Abb. 4.4 A) und hatte keine Auswirkung auf die durch Thrombin herbeigeführte Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Abb. 4.4 B). Weitere Bestätigung hierfür erhielten wir durch die von uns durchgeführten durchflußzytometrischen Experimente. Unter konstantem Fluß [Scherkraft $\tau = 0,8$ (dyn/cm²)] kam es zu keiner signifikanten Abweichung in der Plättchenadhäsion an eine Kollagen-beschichtete Oberfläche bei physiologischen und pathologischen Insulinkonzentrationen (Abb. 4.31).

Die in der vorangegangenen Publikationen beschriebenen Effekte des Insulins auf das Aggregationsverhalten der Blutplättchen kann mehrere Ursachen haben. Neben einem Einfluß der Präparation oder der Alterung der Blutplättchen außerhalb des physiologischen Milieus kann das eingesetzte Insulin bzw. das für das Insulin verwendete Lösungsmittel einen Einfluß auf die Aggregation der Thrombozyten haben. Wie bereits beschrieben führte das mit dem von Humulin® identische

Lösungsmittel von Insuman® rapid® zu einer Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dies kann gleichzeitig das Aggregationsverhalten der Blutplättchen beeinflussen. Ebenfalls muß aufgezeigt werden, daß die in den vorangegangenen Arbeiten *in vitro* beschriebenen Effekte des Insulins auf die Aggregation der Blutplättchen *in vivo* nicht beobachtet werden können. Für Patienten die an Diabetes mellitus oder Insulinresistenz leiden ist weder eine erhöhte Thrombose- noch eine erhöhte Blutungsneigung beschrieben. Es ist nicht auszuschließen, daß indirekte insulinabhängige Effekte auf die Plättchenaggregation *in vivo* vorhanden sind, die durch eine chronisch erhöhte Insulinkonzentration im Blut hervorgerufen werden. Direkte chronische Auswirkungen einer krankhaft erhöhten Insulinkonzentration im Blut sind auch aufgrund der nur sehr kurzen durchschnittlichen Lebensdauer der Blutplättchen von acht bis zwölf Tagen wenig wahrscheinlich.

5.4. Ca²⁺ Mobilisierung

Ca²⁺ ist in hohen Konzentrationen im dichten tubulären System und in dichten Granula gespeichert. Während der Aggregation der Blutplättchen wird es an das Zytosol abgegeben. Es ist eines der drei Komponenten Scherkraft, Fibrinogen und Ca²⁺, ohne die Thrombozyten nicht aggregieren können. Zwischen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und dem Stimulierungsgrad der Thrombozyten besteht eine direkte Korrelation. Überschreitet die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration eine bestimmte Schwelle, so verändert das Blutplättchen seine Form und bildet Pseudopodien aus. Die Ausschüttung von Ca²⁺ in den Extrazellulärraum begünstigt die Bindung von Fibrinogen an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie andere Gerinnungsmechanismen.

Das von uns verwendete reine Insulin hatte keine Auswirkung auf den Ca²⁺ Spiegel ruhender Blutplättchen und auf die durch ADP und Thrombin induzierte Ca²⁺ Mobilisierung (Abb. 4.10). Gegensätzliche Beobachtungen von Ferreira *et al.* ¹²⁴ sprechen von einer 20 %igen Hemmung der ADP-induzierten Ca²⁺ Mobilisierung in Blutplättchen durch 100 nM Insulin und durch den P2Y₁₂ Rezeptor Antagonisten AR-C69931MX. In unseren Experimenten blieb die durch ADP und Thrombin

stimulierte Kalzium Mobilisierung so gut wie unverändert nach einer 5minütigen Präinkubation mit Insulin in den Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 100 nM. Ebenso wurde in verschiedenen anderen Studien gezeigt, daß eine Hemmung von P2Y₁₂ keinen Einfluß auf die Ca²⁺ Mobilisierung in Blutplättchen hat.^{141, 142} Unterschiedliche Plättchenpräparationen und abweichende experimentelle Bedingungen können der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen sein.

Die von uns erhaltenen Daten zu der Ca²⁺ Mobilisierung decken sich mit den anderen von uns erhobenen Daten, nachdem Insulin zu keiner Formveränderung, Aggregation und Aktivierung der Blutplättchen führen.

5.5. Thrombozytäre Granula

Werden die Blutplättchen durch Agonisten wie Thrombin oder ADP aktiviert, kommt es zu einer Sekretion der Speichergranula und damit zur Sekretion des in den α -Granula gespeicherten P-Selektins und der Expression des P-Selektins auf der Plättchenoberfläche. Das P-Selektin spielt eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. Für die Messung der Thrombozytenaktivierung ist es geeignet, da es auf der Oberfläche der ruhenden Blutplättchen nicht exprimiert wird.

Unsere Messungen zeigten, daß die Expression des P-Selektins durch Insulin auf der Oberfläche gewaschener humaner Blutplättchen nicht herbeigeführt wird. Weder physiologischen (0.1 nM und 1 nM) noch pathologische (100 nM) Insulinkonzentrationen zeigten hier eine Wirkung (Abb.). Das Gleiche gilt für die Stimulation der gewaschenen Blutplättchen mit Thrombin (0.01 U). Hier hatte das Insulin ebenfalls keinen Einfluß auf die Thrombin-induzierte P-Selektin Expression (Abb. 4.7). Diese mittels FACS-Analyse gewonnen Daten decken sich mit denen der Ca²⁺ Messung. Die Inhaltsstoffe der Granula werden erst ab einem bestimmten zytoplasmatischen Ca²⁺-Schwellenwert freigesetzt. Da das Insulin keinen Einfluß auf das zytoplasmatische Ca²⁺ hat, bleibt auch eine Wirkung auf die thrombozytären Granula aus.

5.6. Insulinrezeptor

Nach Bindung des Insulins an den IR kommt es über mehrere Zwischenschritte zu der Phosphorylierung des Tyrosin 972, welches eine der Hauptbindungsstellen für Proteine der IR-Signalkaskade darstellt.⁵⁰ Zu den Proteinen, die am Tyr⁹⁷² mit dem IR interagieren, gehören die Insulin Rezeptor Substrate (IRS) 1 - 4, GAB, IRS5/DOK4 und IRS6/DOK5.⁵¹ Von hier führen der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt/Proteinkinase B Signalweg, der für den Großteil der metabolischen Wirkungen des Insulins verantwortlich ist, und der Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg weg.⁵³

Das Vorhandensein des IR auf der Oberfläche der Thrombozyten ist nicht einwandfrei bewiesen. Obwohl bereits 1979 die spezifische Bindung von radioaktiven ¹²⁵I-Insulin beschrieben⁶² und aufgrund der dadurch erhobenen Daten die Anzahl der Insulinbindungsstellen auf der Thrombozytenoberfläche auf ~ 570 geschätzt wurde, kam es später nur zu einem weiteren Nachweis des IR mittels Western Blot.⁶³ Eine Positivkontrolle wurde hier jedoch nicht verwendet. Das von uns beobachtete Fehlen eines signifikanten Insulin-abhängigen Effekts auf die Aktivierung, Aggregation, Ca²⁺ Mobilisierung und auf die Phosphorylierung der in der Signalkaskade stromabwärts vom Insulinrezeptor gelegenen Proteine PKB, ERK und p-38 MAPK deutet auf das Fehlen eines funktionell aktiven IR auf der Oberfläche der Thrombozyten hin.

Tatsächlich war es mittels konventionellem Western Blot nicht möglich den Insulinrezeptor auf den Thrombozyten nachzuweisen. Der Nachweis des IR gelang uns sowohl in seiner unphosphorylierten, als auch in seiner phosphorylierten Form auf den von uns als Positivkontrolle verwendeten ECV304 Zellen. Dies zeigt, daß das von uns verwendete Insulin funktionell aktiv und der verwendete Antikörper funktionsfähig war.

Durch unsere Forschungsergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Insulinrezeptor nicht doch in geringer, mittels konventionellem Western Blot nicht nachweisbarer Anzahl, auf der Oberfläche der Thrombozyten zur Expression kommt. Sollte dies der Fall sein, so muß davon ausgegangen werden, daß dieser IR funktionell nicht aktiv ist, da die für andere Zelltypen beschriebenen und durch

Insulin aktivierten Signalwege innerhalb der Thrombozyten durch Insulin weder aktiviert noch gehemmt werden.

5.7. eNOS in Blutplättchen

Die eNOS Aktivierung wird durch Hormone wie Katecholamine und Vasopressin und von Thrombozyten ausgeschütteten Botenstoffen wie Serotonin und ADP über eine rezeptorvermittelte G-Protein Aktivierung stimuliert.¹¹⁶ Für Skelettmuskel- und Endothelzellen ist eine durch Insulin induzierte Aktivierung von eNOS^{117, 118} über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) Signalweg¹¹⁹ beschrieben. Die Synthese von NO im Endothel wird nach der Stimulation mit Insulin über einen schnellen Translationsmechanismus¹²⁰ und die Induzierung der eNOS Genexpression¹²¹ gesteuert. Verschiedene vorangegangene Studien weisen eNOS in den Blutplättchen und einen von ihm ausgehenden Effekt auf die Plättchenaktivierung nach.^{73, 136, 137} Demnach führt Insulin über einen NO-G Kinase-VAMP-3-abhängigen Signalweg zu der Ausschüttung von vasodilatorischen Substanzen¹⁴³ und stimuliert die NO Synthese in humanen Blutplättchen.⁷⁴

Die von uns durchgeführten Versuche zeigen nicht nur das Fehlen einer durch Insulin hervorgerufenen Wirkung auf eNOS in Blutplättchen. Vielmehr weisen sie das Fehlen von eNOS in humanen Blutplättchen nach. Der in unseren Experimenten und anderen Publikationen verwendete Antikörper gegen P-eNOS Ser¹¹⁷⁷ detektiert ebenfalls ein anderes Protein mit gleichem Proteingewicht wie P-eNOS, da er selbst für eNOS^{-/-} knock-out Mäuse ein deutliches Signal zeigte. Hieraus schließen wir, daß dieser Antikörper unspezifisch an ein anderes Protein gleicher Größe bindet.

5.8. Wechselwirkung zwischen dem Endothel und den Blutplättchen

Insulin führte in unseren Experimenten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg von endotheliale NO. Dieser Anstieg des endotheliale NO nach Insulin Stimulation wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. In unseren

Experimenten führte dieser des endotheliale NO bei einer pathologischen Insulinkonzentration (10 nM) zu einer signifikanten Minderung der Plättchenadhäsion an das Endothel (Abb. 4.32). Ähnliche Effekte des endothelialen NO sind bereits für die Bindung von Leukozyten an das Endothel beschrieben.¹¹³

Zusammen mit früheren Berichten, die eine verminderten biologischen Verfügbarkeit vaskulären NOs bei Patienten mit Diabetes aufzeigen, wodurch es zu einem Anstieg der Plättchenaktivierung *in vivo* kommt,¹⁰³⁻¹⁰⁶ schließen wir, daß die Veränderungen der Plättchenfunktion bei Diabetikern nicht durch akute Wirkungen des Insulins auf die Blutplättchen herbei geführt werden, sondern auf Veränderungen der endothelialen NO Sekretion durch eine erhöhte Insulinresistenz zurück zu führen sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unter physiologischen Bedingungen spielen die Thrombozyten oder Blutplättchen eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der Hämostase. Indem sie in Blutgefäßen beschädigte Bereiche erkennen und sich dort gezielt anheften können, verhindern sie das Austreten von Blut in subendotheliale Bereiche und halten eine Blutung gering. Intrazelluläre Signalmoleküle kontrollieren das Zusammenspiel der Plättchenagonisten und der dazugehörigen Rezeptoren und regulieren somit die Aktivierung der Blutplättchen.

Verschiedene vorangegangene Publikationen demonstrierten sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte des Insulins auf die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen. Diese durch das Insulin hervorgerufenen Effekte sollen hauptsächlich über den cGMP und cAMP Signalweg sowie über die Aktivierung von eNOS durch Insulin in den Blutplättchen wirken.

Unsere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß ein akuter, durch das Insulin hervorgerufener Effekt auf die Blutplättchen sowohl unter physiologischen wie auch unter pathologischen Glukosekonzentrationen nicht nachweisbar ist. Insulin zeigte keine Wirkung auf die intrazellulären Signalmoleküle PKB, VASP, P38 und ERK, welche in der Aktivierung/Hemmung der Blutplättchen eine wichtige Rolle spielen. Gleichfalls blieb eine Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen und Aktivierung des Oberflächenrezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten nach der Stimulation durch Insulin aus. Auch konnte der Insulinrezeptor durch uns auf der Oberfläche der Thrombozyten weder in seiner unphosphorylierten, noch in seiner phosphorylierten Form nach der Stimulation mit Insulin nachgewiesen werden. Zusammen mit dem Fehlen eines direkten, akuten Insulin-abhängigen Effekts auf die Thrombozyten läßt dies auf das Fehlen eines funktionell aktiven Insulinrezeptors auf der Oberfläche der Thrombozyten schließen.

Wir konnten zeigen, daß eNOS in den Blutplättchen nicht vorhanden und damit seine in anderen Publikationen beschriebene Aktivierung durch Insulin in den Thrombozyten nicht gegeben ist. Der von uns und in anderen Publikationen verwendete Antikörper gegen phospho-eNOS erkennt vielmehr ein anderes Protein

gleicher Größe, wie wir im Kontrollexperiment mit eNOS^{-/-} knockout Mäusen zeigen konnten.

Im Flußkammerexperiment konnte ein indirekter insulinabhängiger Effekt auf die Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel und ihre Bildung von Aggregaten beobachtet werden. Die Gabe von pathologischen Insulinmengen führte zu einem Anstieg der NO Sekretion durch das Endothel, welches hemmend auf die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten wirkte.

6. Summary

Under physiologic conditions platelets play a central role in upholding the haemostasis. By recognizing lesions in the vessel walls and attachment to those areas they prevent an influx of blood into subendothelial areas. Intracellular molecules mediate the interaction of platelet agonists and their receptors and therefore control platelet activation.

Several previous publications demonstrated enhancing as well as inhibiting effects by insulin on platelet activation, adhesion and aggregation. These insulin-mediated effects are reported to act via the cGMP and cAMP pathway as well as the activation of eNOS by insulin in platelets.

Our findings show that there is no acute insulin dependent effect on platelet function under physiologic and pathologic glucose levels. Insulin showed no effect on the phosphorylation of intracellular markers of platelet activation like PKB, VASP, P38 und ERK. Furthermore an effect on platelet aggregation and the activation of the platelet surface receptor integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and the expression of P-Selectin on the platelet surface after insulin stimulation was also not detectable. Expression of the IR was not detectable in platelets which agrees with our other data that insulin-stimulation did not trigger IR phosphorylation or activation of any insulin-induced downstream signalling pathways in platelets including eNOS, PKB, ERK, and p-38 MAPK. These data indicate that either there is no functionally active IR expressed in platelets or that the copy number of IR proteins is too low to activate downstream signalling systems like PKB and MAPK.

We could also show that eNOS is not present in platelets and that its activation by insulin, postulated in previous publications, is therefore not given. The antibody which we employed and which was also used in other publications against phospho-eNOS recognizes another protein of the same size, which we could demonstrate in a control experiment with eNOS^{-/-} knock out mice.

However, we could detect an indirect insulin dependent effect on platelet endothel adhesion and aggregation in our flow chamber experiments. The insulin induced increase of endothelial NO caused a significant decrease of platelet adhesion to the endothelial cells.

7. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Die hier gezeigten Daten wurden zu dem besseren Verständnis der genauen Wirkung von Insulin auf die Blutplättchen und der Blutplättchen-Endothel Wechselwirkungen erhoben.

Der erste Teil der Versuche befaßt sich mit der Wirkung von Insulin auf die Blutplättchen unter physiologischen Glukosekonzentrationen. Hier zeigte sich, daß Insulin keine Wirkung auf die Aktivierung, Sekretion, Aggregation und die intrazellulären Signalwege der Thrombozyten hat. Zugleich konnte nachgewiesen werde, daß Insulin die Wirkung von Agonisten wie Thrombin, ADP und Kollagen weder verstärkt noch inhibiert.

Im zweiten Teil der Versuche wurden die Experimente bei pathologischen Glukosekonzentrationen wiederholt. Auch hier war keine signifikante Wirkung des Insulins auf die Thrombozyten nachweisbar. Es muß darauf hingewiesen werde, daß alle Versuche mit Blutplättchen von gesunden Spendern durchgeführt wurden. Um einen genaueren Einblick in die Pathologie der Diabetes mellitus zu erlangen, wäre es wünschenswert diese Versuche mit Blutplättchen von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern zu wiederholen um etwaige Unterschiede in ihrer Reaktion auf einen Insulin-Stimulus aufzuzeigen.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Adhäsion der Blutplättchen unter konstantem Fluß an eine Kollagen-beschichtete Oberfläche und an Endothelzellen. Im Fall der Kollagen-beschichteten Oberfläche ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion der Blutplättchen in An- und Abwesenheit von Insulin nachweisen. Dagegen kam es unter Anwesenheit von Insulin zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion der Thrombozyten an die Endothelzellen. Dies hatte eine durch das Insulin angeregte gesteigerte NO Produktion in den Endothelzellen als Ursache. Auch hierbei wäre die Wiederholung dieser Versuche mit Thrombozyten von Patienten mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes wünschenswert.

8. FINANZIERUNG

Diese Arbeit wurde von der Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB688 and OB 1373/3-1) unterstützt.

9. LITERATUR

- 1 Schultze, M., Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes, Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1865, 1: 1-42.
- 2 Bizzozero, G., Über einen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung, Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, 1882, 90: 261-332.
- 3 George, J. N., Platelets, Lancet, 2000, 355: 1531-1539.
- 4 Harrison, P., Platelet function analysis, Blood Rev, 2005, 19: 111-123.
- 5 Collier, B. S., Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation, Ann N Y Acad Sci, 1983, 416: 693-708.
- 6 Bevers, E. M., Comfurius, P., van Rijn, J. L., Hemker, H. C. and Zwaal, R. F., Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets, Eur J Biochem, 1982, 122: 429-436.
- 7 Zwaal, R. F. and Schroit, A. J., Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells, Blood, 1997, 89: 1121-1132.
- 8 Hartwig, J. H., Barkalow, K., Azim, A. and Italiano, J., The elegant platelet: signals controlling actin assembly, Thromb Haemost, 1999, 82: 392-398.
- 9 Reed, G. L., Fitzgerald, M. L. and Polgar, J., Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes, Blood, 2000, 96: 3334-3342.

- 10 Ruggeri, Z. M., Platelets in atherothrombosis, *Nat Med*, 2002, 8: 1227-1234.
- 11 Abrams, C. S., Intracellular signaling in platelets, *Curr Opin Hematol*, 2005, 12: 401-405.
- 12 Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H. and Fassler, R., Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen, *Embo J*, 2001, 20: 2120-2130.
- 13 De Candia, E., Hall, S. W., Rutella, S., Landolfi, R., Andrews, R. K. and De Cristofaro, R., Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets, *J Biol Chem*, 2001, 276: 4692-4698.
- 14 Lopez, J. A., Andrews, R. K., Afshar-Kharghan, V. and Berndt, M. C., Bernard-Soulier syndrome, *Blood*, 1998, 91: 4397-4418.
- 15 Fredrickson, B. J., Dong, J. F., McIntire, L. V. and Lopez, J. A., Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex, *Blood*, 1998, 92: 3684-3693.
- 16 Siedlecki, C. A., Lestini, B. J., Kottke-Marchant, K. K., Eppell, S. J., Wilson, D. L. and Marchant, R. E., Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor, *Blood*, 1996, 88: 2939-2950.
- 17 Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M. and Shattil, S. J., Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors, *Blood*, 2004, 103: 3403-3411.
- 18 Rogers, C., Edelman, E. R. and Simon, D. I., A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 10134-10139.

- 19 Romo, G. M., Dong, J. F., Schade, A. J., Gardiner, E. E., Kansas, G. S., Li, C. Q., McIntire, L. V., Berndt, M. C. and Lopez, J. A., The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin, *J Exp Med*, 1999, 190: 803-814.
- 20 Andrews, R. K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S. P. and Berndt, M. C., Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI, *Blood*, 2002, 99: 4219-4221.
- 21 Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A. H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J. P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., Vainchenker, W. and Villeval, J. L., Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily, *Blood*, 2000, 96: 1798-1807.
- 22 Miura, Y., Takahashi, T., Jung, S. M. and Moroi, M., Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen, *J Biol Chem*, 2002, 277: 46197-46204.
- 23 Farndale, R. W., Sixma, J. J., Barnes, M. J. and de Groot, P. G., The role of collagen in thrombosis and hemostasis, *J Thromb Haemost*, 2004, 2: 561-573.
- 24 Coller, B. S., Beer, J. H., Scudder, L. E. and Steinberg, M. H., Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins, *Blood*, 1989, 74: 182-192.
- 25 Keely, P. J. and Parise, L. V., The $\alpha 2\beta 1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase C $\gamma 2$ in platelets, *J Biol Chem*, 1996, 271: 26668-26676.

- 26 Wang, R., Kini, R. M. and Chung, M. C., Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits, *Biochemistry*, 1999, 38: 7584-7593.
- 27 Kamiguti, A. S., Theakston, R. D., Watson, S. P., Bon, C., Laing, G. D. and Zuzel, M., Distinct contributions of glycoprotein VI and alpha(2)beta(1) integrin to the induction of platelet protein tyrosine phosphorylation and aggregation, *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374: 356-362.
- 28 Jung, S. M. and Moroi, M., Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions, *J Biol Chem*, 1998, 273: 14827-14837.
- 29 Jung, S. M. and Moroi, M., Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1), *J Biol Chem*, 2000, 275: 8016-8026.
- 30 Santoro, S. A., Walsh, J. J., Staatz, W. D. and Baranski, K. J., Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation, *Cell Regul*, 1991, 2: 905-913.
- 31 Moroi, M., Onitsuka, I., Imaizumi, T. and Jung, S. M., Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions, *Thromb Haemost*, 2000, 83: 769-776.
- 32 Moroi, M. and Jung, S. M., Integrin-mediated platelet adhesion, *Front Biosci*, 1998, 3: d719-728.
- 33 Shattil, S. J. and Newman, P. J., Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets, *Blood*, 2004, 104: 1606-1615.

- 34 Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H. and Shattil, S. J., Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 13298-13302.
- 35 Arias-Salgado, E. G., Haj, F., Dubois, C., Moran, B., Kasirer-Friede, A., Furie, B. C., Furie, B., Neel, B. G. and Shattil, S. J., PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling, *J Cell Biol*, 2005, 170: 837-845.
- 36 Buensuceso, C. S., Arias-Salgado, E. G. and Shattil, S. J., Protein-protein interactions in platelet alphaIIb beta3 signaling, *Semin Thromb Hemost*, 2004, 30: 427-439.
- 37 Jackson, S. P., Nesbitt, W. S. and Kulkarni, S., Signaling events underlying thrombus formation, *J Thromb Haemost*, 2003, 1: 1602-1612.
- 38 Davey, M. G. and Luscher, E. F., Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets, *Nature*, 1967, 216: 857-858.
- 39 Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. and Coughlin, S. R., Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation, *Cell*, 1991, 64: 1057-1068.
- 40 Brass, L. F. and Molino, M., Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells, *Thromb Haemost*, 1997, 78: 234-241.
- 41 Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. and Offermanns, S., Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets, *J Cell Biol*, 1999, 144: 745-754.
- 42 Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J. P. and Gachet, C., The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation, *Blood*, 1998, 92: 152-159.

- 43 Jin, J. and Kunapuli, S. P., Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 8070-8074.
- 44 Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J. P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z. M., Evans, R. and Gachet, C., A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo, *J Exp Med*, 2003, 198: 661-667.
- 45 Kato, Y., Kaneko, M. K., Kunita, A., Ito, H., Kameyama, A., Ogasawara, S., Matsuura, N., Hasegawa, Y., Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Ozaki, Y. and Narimatsu, H., Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2, *Cancer Sci*, 2008, 99: 54-61.
- 46 Watson, A. A., Brown, J., Harlos, K., Eble, J. A., Walter, T. S. and O'Callaghan, C. A., The crystal structure and mutational binding analysis of the extracellular domain of the platelet-activating receptor CLEC-2, *J Biol Chem*, 2007, 282: 3165-3172.
- 47 Kato, H., Kashiwagi, H., Shiraga, M., Tadokoro, S., Kamae, T., Ujiie, H., Honda, S., Miyata, S., Ijiri, Y., Yamamoto, J., Maeda, N., Funahashi, T., Kurata, Y., Shimomura, I., Tomiyama, Y. and Kanakura, Y., Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 224-230.
- 48 Thomas, L., *Labor und Diagnose*, Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998.
- 49 Brown, H., Sanger, F. and Kitai, R., The structure of pig and sheep insulins, *Biochem J*, 1955, 60: 556-565.

- 50 Kido, Y., Nakae, J. and Accili, D., Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets, *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 972-979.
- 51 Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P. A., Lee, J. and Shoelson, S. E., Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5, *J Biol Chem*, 2003, 278: 25323-25330.
- 52 White, M. F., The insulin signalling system and the IRS proteins, *Diabetologia*, 1997, 40 Suppl 2: S2-17.
- 53 Saltiel, A. R. and Kahn, C. R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 2001, 414: 799-806.
- 54 Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R., The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochem J*, 2000, 346 Pt 3: 561-576.
- 55 Brazil, D. P. and Hemmings, B. A., Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow, *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 657-664.
- 56 Khan, A. H. and Pessin, J. E., Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways, *Diabetologia*, 2002, 45: 1475-1483.
- 57 Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature*, 1995, 378: 785-789.
- 58 Frame, S. and Cohen, P., GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery, *Biochem J*, 2001, 359: 1-16.
- 59 Harris, T. E. and Lawrence, J. C., Jr., TOR signaling, *Sci STKE*, 2003, 2003: re15.

- 60 Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P. E., Rondinone, C. M. and Klip, A., A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation, *J Biol Chem*, 2002, 277: 50386-50395.
- 61 Akkerman, J. W. N., In: Gresele, P., Page, C. P., Fuster, V., and Vermylen, J., (ed), *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology, and Therapeutics* Cambridge, UK, Cambridge University Press, , 2002: 204-220.
- 62 Hajek, A. S., Joist, J. H., Baker, R. K., Jarett, L. and Daughaday, W. H., Demonstration and partial characterization of insulin receptors in human platelets, *J Clin Invest*, 1979, 63: 1060-1065.
- 63 Falcon, C., Pfliegler, G., Deckmyn, H. and Vermylen, J., The platelet insulin receptor: detection, partial characterization, and search for a function, *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 157: 1190-1196.
- 64 Murer, E. H., Gyda, M. A. and Martinez, N. J., Insulin increases the aggregation response of human platelets to ADP, *Thromb Res*, 1994, 73: 69-74.
- 65 Hu, H., Hjemdahl, P. and Li, N., Effects of insulin on platelet and leukocyte activity in whole blood, *Thromb Res*, 2002, 107: 209-215.
- 66 Yngen, M., Li, N., Hjemdahl, P. and Wallen, N. H., Insulin enhances platelet activation in vitro, *Thromb Res*, 2001, 104: 85-91.
- 67 Lopez-Aparicio, P., Rascon, A., Manganiello, V. C., Andersson, K. E., Belfrage, P. and Degerman, E., Insulin induced phosphorylation and activation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in human platelets, *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186: 517-523.

- 68 Rosenblum, W. I. and El-Sabban, F., Insulin delays platelet accumulation in injured cerebral microvessels of diabetic and normal mice, *Microvasc Res*, 1983, 26: 254-257.
- 69 Trovati, M., Anfossi, G., Cavalot, F., Massucco, P., Mularoni, E. and Emanuelli, G., Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents. Studies in vitro and in vivo, *Diabetes*, 1988, 37: 780-786.
- 70 Westerbacka, J., Yki-Jarvinen, H., Turpeinen, A., Rissanen, A., Vehkavaara, S., Syrjala, M. and Lassila, R., Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 167-172.
- 71 Trovati, M., Massucco, P., Mattiello, L., Mularoni, E., Cavalot, F. and Anfossi, G., Insulin increases guanosine-3',5'-cyclic monophosphate in human platelets. A mechanism involved in the insulin anti-aggregating effect, *Diabetes*, 1994, 43: 1015-1019.
- 72 Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L., Blunted inhibition by insulin of agonist-stimulated calcium, pH and aggregatory responses in platelets from hypertensive patients, *J Hypertens*, 1994, 12: 1255-1263.
- 73 Fleming, I., Schulz, C., Fichtlscherer, B., Kemp, B. E., Fisslthaler, B. and Busse, R., AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets, *Thromb Haemost*, 2003, 90: 863-871.
- 74 Trovati, M., Anfossi, G., Massucco, P., Mattiello, L., Costamagna, C., Piretto, V., Mularoni, E., Cavalot, F., Bosia, A. and Ghigo, D., Insulin stimulates nitric oxide synthesis in human platelets and, through nitric oxide, increases platelet concentrations of both guanosine-3', 5'-cyclic monophosphate and adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, *Diabetes*, 1997, 46: 742-749.

- 75 Trovati, M., Massucco, P., Mattiello, L., Piretto, V., Cavalot, F., Mularoni, E. and Anfossi, G., The insulin-induced increase of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate in human platelets is mediated by nitric oxide, *Diabetes*, 1996, 45: 768-770.
- 76 Chakraborty, K. and Sinha, A. K., The role of insulin as an antithrombotic humoral factor, *Bioessays*, 2004, 26: 91-98.
- 77 Kahn, N. N., Bauman, W. A., Hatcher, V. B. and Sinha, A. K., Inhibition of platelet aggregation and the stimulation of prostacyclin synthesis by insulin in humans, *Am J Physiol*, 1993, 265: H2160-2167.
- 78 Jap, T. S., Kwok, C. F., Wong, M. C. and Chiang, H., The effects of in vitro and in vivo exposure to insulin upon prostaglandin E1 stimulation of platelet adenylate cyclase activity in healthy subjects, *Diabetes Res*, 1994, 27: 39-46.
- 79 Ishida, M., Ishida, T., Ono, N., Matsuura, H., Watanabe, M., Kajiyama, G., Kambe, M. and Oshima, T., Effects of insulin on calcium metabolism and platelet aggregation, *Hypertension*, 1996, 28: 209-212.
- 80 Vaidyula, V. R., Boden, G. and Rao, A. K., Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects, *Platelets*, 2006, 17: 577-585.
- 81 Hajek, A. S. and Joist, J. H., Platelet insulin receptor, *Methods Enzymol*, 1992, 215: 398-403.
- 82 Motani, A. S., Anggard, E. E. and Ferns, G. A., Recombinant insulin-like growth factor-1 modulates aggregation in human platelets via extracellular calcium, *Life Sci*, 1996, 58: PL269-274.

- 83 Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J., Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature*, 2001, 414: 782-787.
- 84 King, H., Aubert, R. E. and Herman, W. H., Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes Care*, 1998, 21: 1414-1431.
- 85 Sinha, R., Fisch, G., Teague, B., Tamborlane, W. V., Banyas, B., Allen, K., Savoye, M., Rieger, V., Taksali, S., Barbetta, G., Sherwin, R. S. and Caprio, S., Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity, *N Engl J Med*, 2002, 346: 802-810.
- 86 Committee, W. H. O. E., Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus., In, Geneva: World Health Organization, World Health Organization, 1999.
- 87 Kannel, W. B. and McGee, D. L., Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study, *Jama*, 1979, 241: 2035-2038.
- 88 DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C. and Ferrannini, E., Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview, *Diabetes Care*, 1992, 15: 318-368.
- 89 Brunzell, J. D. and Hokanson, J. E., Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance, *Diabetes Care*, 1999, 22 Suppl 3: C10-13.
- 90 Ginsberg, H. N., Insulin resistance and cardiovascular disease, *J Clin Invest*, 2000, 106: 453-458.
- 91 Simonson, D. C., Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients, *Diabetes Care*, 1988, 11: 821-827.

- 92 Rosenstock, J. and Raskin, P., Hypertension in diabetes mellitus, *Cardiol Clin*, 1988, 6: 547-560.
- 93 Haffner, S. M., Management of dyslipidemia in adults with diabetes, *Diabetes Care*, 1998, 21: 160-178.
- 94 Ayyobi, A. F. and Brunzell, J. D., Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia, *Am J Cardiol*, 2003, 92: 27J-33J.
- 95 Calver, A., Collier, J. and Vallance, P., Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes, *J Clin Invest*, 1992, 90: 2548-2554.
- 96 De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H. and Vanhoutte, P. M., Endothelial dysfunction in diabetes, *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 963-974.
- 97 McVeigh, G. E., Brennan, G. M., Johnston, G. D., McDermott, B. J., McGrath, L. T., Henry, W. R., Andrews, J. W. and Hayes, J. R., Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, *Diabetologia*, 1992, 35: 771-776.
- 98 Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G. and Baron, A. D., Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance, *J Clin Invest*, 1996, 97: 2601-2610.
- 99 Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R. A., Warnholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., Harrison, D. G., Forstermann, U. and Munzel, T., Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Circ Res*, 2001, 88: E14-22.

- 100 Zou, M. H., Cohen, R. and Ullrich, V., Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Endothelium*, 2004, 11: 89-97.
- 101 Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov, A., Delli Gatti, C., Joch, H., Volpe, M. and Luscher, T. F., High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species, *Circulation*, 2003, 107: 1017-1023.
- 102 Cardillo, C., Campia, U., Bryant, M. B. and Panza, J. A., Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus, *Circulation*, 2002, 106: 1783-1787.
- 103 Schafer, A., Flierl, U., Kobsar, A., Eigenthaler, M., Ertl, G. and Bauersachs, J., Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2813-2818.
- 104 Schafer, A., Alp, N. J., Cai, S., Lygate, C. A., Neubauer, S., Eigenthaler, M., Bauersachs, J. and Channon, K. M., Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1720-1726.
- 105 Winocour, P. D., Platelet abnormalities in diabetes mellitus, *Diabetes*, 1992, 41 Suppl 2: 26-31.
- 106 Tschoepe, D., Roesen, P., Schwippert, B. and Gries, F. A., Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis, *Semin Thromb Hemost*, 1993, 19: 122-128.
- 107 Vita, J. A. and Keaney, J. F., Jr., Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?, *Circulation*, 2002, 106: 640-642.

- 108 Chen, P. F., Tsai, A. L., Berka, V. and Wu, K. K., Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without perturbing the behavior of heme and other redox centers, *J Biol Chem*, 1997, 272: 6114-6118.
- 109 Sessa, W. C., Harrison, J. K., Barber, C. M., Zeng, D., Durieux, M. E., D'Angelo, D. D., Lynch, K. R. and Peach, M. J., Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase, *J Biol Chem*, 1992, 267: 15274-15276.
- 110 Vanhoutte, P. M., Endothelial dysfunction and atherosclerosis, *Eur Heart J*, 1997, 18 Suppl E: E19-29.
- 111 Harrison, D. G., Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction, *J Clin Invest*, 1997, 100: 2153-2157.
- 112 Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, 1987, 327: 524-526.
- 113 Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D. N., Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88: 4651-4655.
- 114 Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S., Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway, *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12: 87-88.
- 115 Vicent, D., Ilany, J., Kondo, T., Naruse, K., Fisher, S. J., Kisanuki, Y. Y., Bursell, S., Yanagisawa, M., King, G. L. and Kahn, C. R., The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance, *J Clin Invest*, 2003, 111: 1373-1380.

- 116 Boulanger, C. M. and Vanhoutte, P. M., G proteins and endothelium-dependent relaxations, *J Vasc Res*, 1997, 34: 175-185.
- 117 Scherrer, U., Randin, D., Vollenweider, P., Vollenweider, L. and Nicod, P., Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans, *J Clin Invest*, 1994, 94: 2511-2515.
- 118 Steinberg, H. O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N. and Baron, A. D., Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release, *J Clin Invest*, 1994, 94: 1172-1179.
- 119 Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L. N., Kirby, M., Mostowski, H. and Quon, M. J., Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells, *Circulation*, 2000, 101: 1539-1545.
- 120 Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A. and Quon, M. J., Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179), *J Biol Chem*, 2001, 276: 30392-30398.
- 121 Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J. and King, G. L., Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin, *Circulation*, 2000, 101: 676-681.
- 122 Gambaryan, S., Geiger, J., Schwarz, U. R., Butt, E., Begonja, A., Oberfell, A. and Walter, U., Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase, *Blood*, 2004, 103: 2593-2600.

- 123 Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. and Goto, T., Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells, *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26: 265-274.
- 124 Ferreira, I. A., Eybrechts, K. L., Mocking, A. I., Kroner, C. and Akkerman, J. W., IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi, *J Biol Chem*, 2004, 279: 3254-3264.
- 125 Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R., Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 85-96.
- 126 Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha, *Curr Biol*, 1997, 7: 261-269.
- 127 Bouzakri, K., Roques, M., Gual, P., Espinosa, S., Guebre-Egziabher, F., Riou, J. P., Laville, M., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F. and Vidal, H., Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, 2003, 52: 1319-1325.
- 128 Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. and Walter, U., Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators, *J Biol Chem*, 1990, 265: 3088-3093.
- 129 Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. and Walter, U., Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition, *Eur J Biochem*, 1994, 225: 21-27.

- 130 Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. and Walter, U., cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets, *J Biol Chem*, 1994, 269: 14509-14517.
- 131 Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. and Walter, U., Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody, *J Biol Chem*, 1998, 273: 20029-20035.
- 132 Sudic, D., Razmara, M., Forslund, M., Ji, Q., Hjemdahl, P. and Li, N., High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms, *Br J Haematol*, 2006, 133: 315-322.
- 133 Hu, H., Johansson, B. L., Hjemdahl, P. and Li, N., Exercise-induced platelet and leucocyte activation is not enhanced in well-controlled Type 1 diabetes, despite increased activity at rest, *Diabetologia*, 2004, 47: 853-859.
- 134 Tschoepe, D., Driesch, E., Schwippert, B., Nieuwenhuis, H. K. and Gries, F. A., Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia, *Diabetes*, 1995, 44: 890-894.
- 135 Stoner, G. D., Hyperosmolar hyperglycemic state, *Am Fam Physician*, 2005, 71: 1723-1730.
- 136 Patel, B., Sharifi, M., Milward, A. D., Oberprieler, N. G., Gibbins, J. M., Parkin, S. and Naseem, K. M., Platelet nitric oxide synthase is activated by tyrosine dephosphorylation: possible role for SHP-1 phosphatase, *J Thromb Haemost*, 2006, 4: 2423-2432.

- 137 Randriamboavonjy, V. and Fleming, I., Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there?, *Pharmacol Rep*, 2005, 57 Suppl: 59-65.
- 138 Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. and Hofmann, F., Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I, *J Exp Med*, 1999, 189: 1255-1264.
- 139 Moro, M. A., Russel, R. J., Celtek, S., Lizasoain, I., Su, Y., Darley-Usmar, V. M., Radomski, M. W. and Moncada, S., cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 1480-1485.
- 140 Schwarz, U. R., Walter, U. and Eigenthaler, M., Taming platelets with cyclic nucleotides, *Biochem Pharmacol*, 2001, 62: 1153-1161.
- 141 Geiger, J., Honig-Liedl, P., Schanzenbacher, P. and Walter, U., Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors, *Eur J Pharmacol*, 1998, 351: 235-246.
- 142 Storey, R. F., Sanderson, H. M., White, A. E., May, J. A., Cameron, K. E. and Heptinstall, S., The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity, *Br J Haematol*, 2000, 110: 925-934.
- 143 Randriamboavonjy, V., Schrader, J., Busse, R. and Fleming, I., Insulin induces the release of vasodilator compounds from platelets by a nitric oxide-G kinase-VAMP-3-dependent pathway, *J Exp Med*, 2004, 199: 347-356.

10. ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GPDH	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinukleotide phosphate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
RT	Raumtemperatur
sGC	Soluble guanylyl cyclase
SNP	Sodium nitropruside
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBS	Tris buffered salin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein

11. PUBLIKATIONSLISTE

Rauchfuss S, Geiger J, Walter U, Renne T, Gambaryan S.

Insulin inhibition of platelet-endothelial interaction is mediated by insulin effects on endothelial cells without direct effects on platelets.

J Thromb Haemost. 2008 Feb 12

Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, **Rauchfuss S**, Gambaryan S, Walter U.

Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A2 and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase.

Blood. 2007 Jan 15;109(2):616-8.

DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter, daß er mir die Möglichkeit gab an seinem Lehrstuhl zu promovieren.

Vielen Dank an Herrn Prof. Martin Heisenberg, daß er sich die Zeit nahm diese Arbeit als Zweitkorrektor zu begutachten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Stepan Gambaryan, dessen Verdienst es ist, daß diese Arbeit zu einem guten Abschluß kam. Thank you for all your help, your patients and your inspirations!

Vielen Dank an Dr. Elke Butt, Dr. Jörg Geiger, Dr. Thomas Renne; Dr. Natalia Rukoyatkina und Dr. Sabine Herterich für ihre Hilfe und ihren Rat. Und ganz besonderen Dank an Jörg, der Zeit und Nerven bei der Korrektur meiner Doktorarbeit opferte.

Vielen Dank an Petra, Elfi, Petra und Elfi für ihre Hilfe.

Vielen Dank an „Chrysanthenblüte“ Katja und an meine Mitdoktoranden und Mitdiplomanden Antonija, Silke, Leif, Yvonne, Naresh, Stefan und Julia für die schöne Zeit, die wir auch außerhalb des Labors zusammen hatten.

Vielen Dank an „mein“ PCR Labor im Zentrallabor: Stephie, Katja, Kathrin und Diana und natürlich den lieben Dirk!

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine Familie und Freunde: Ingrid und Dieter, Tanja und Justin, Marcus und Tania, Else und Heinz, Fritz und Reni; die Würzburger Kultisten: Leni, Matthias, Nina, Stefan, Carsten (Iäh!); Connie, Steffie, André und Andrea; Evi, Michel und Elodie.

Noch ein ganz besonderes Dankeschön an das sprachwissenschaftliche Lektorat ☺

LEBENS LAUF

Name: Steffen Rauchfuß

Geburtsdatum: 26.07.1973

Geburtsort: Wertheim am Main

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1980 – 1984 Grundschule Wertheim
1984 – 1990 Realschule Wertheim
1990 – 1993 Wirtschaftsgymnasium Wertheim

Wehrdienst 07/1993 – 06/1994
4. Jägerlehrbataillon 353 Hammelburg

Ausbildung 09/1994 – 07/1996
Ausbildung zum Industriekaufmann
alfi Zitzmann GmbH Wertheim

Studium 04/1997 – 01/2004 Studium der Biologie an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
01/2003 – 12/2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik
und Neurobiologie der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Abschluß: Diplombiologe

Promotion 05/2004 – 04/2007 Promotion am Institut für klinische
Biochemie und Pathobiochemie der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

Beruf Seit 05/2007 wissenschaftlicher Angestellter bei ICON
Clinical Research, Langen.