

**Aus dem Physiologischen Institut Lehrstuhl I
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Michaela Kuhn**

Einfluss von Fractalkin und mfg-e8 auf die Thrombozytenaktivierung und ihre
Interaktion mit pharmakologischen Thrombozytenaggregationshemmern

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eva Maria Lausenmeyer

aus Regensburg

Würzburg, August 2015

Referent: Prof. Dr. Kai Schuh
Koreferentin: Prof. Dr. Stefanie Hahner
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2016

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Atherosklerose und Thrombozyten.....	1
1.2 Fractalkin	3
1.3 Mfg-e8.....	6
1.4 Ausblick	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Puffer und Lösungen.....	9
2.2 Herstellung gewaschener Thrombozyten aus Vollblut	10
2.2.1 Plättchenreiches Plasma (<i>PRP</i>).....	10
2.2.2 Thrombozytenisolierung	10
2.2.3 Thrombozytenaufbereitung und -reinheit.....	11
2.3 Western blot	13
2.3.1 Herstellung der Proben mit Fractalkin	13
2.3.2 Herstellung der Proben mit mfg-e8.....	14
2.3.3 Western blot Analyse	14
2.4 Flusskammer	16
2.4.1 Prinzip und Aufbau der Flusskammer.....	16
2.4.2 Probenpräparation	18
2.4.3 Durchführung der Versuche	19
2.5 Durchflusszytometrie (FACS)	19
2.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie	19
2.5.2 Herstellung der Proben.....	20
2.5.3 Auswertung der Messergebnisse.....	22
2.6 Statistische Auswertung.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1 PI3-Kinase vermittelter Signalweg über P2Y12.....	25
3.2 Fractalkin induzierte PI3K Aktivierung.....	27
3.2.1 ADP-unabhängige aktivierende Wirkung.....	29
3.2.2 Potenzierung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung...	33
3.3 Effekt von mfg-e8 auf PI3K-Signalweg	35
3.4 Effekte auf Thrombozyten unter arteriellen Scherbedingungen	37

3.4.1	Unstimulierte oder mit Kollagen stimulierte Thrombozyten	38
3.4.2	Mfg-e8 stimulierte Thrombozyten	40
3.5	Effekte von mfg-e8 auf die GPIIb/IIIa Aktivierung	42
3.5.1	Aktivierung nicht vorstimulierter Thrombozyten	42
3.5.2	Aktivierung ADP-vorstimulierter Thrombozyten	44
4.	Diskussion	46
5.	Zusammenfassung	54
6.	Abkürzungen und Einheiten	55
7.	Literatur	58

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose und Thrombozyten

Atherosklerose und damit assoziierte Folgeerkrankungen zählen zu den führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in der industrialisierten Welt^[1]. Die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung, die sich z.B. als Herzinfarkt an den Koronararterien oder als Schlaganfall an den hirnversorgenden Gefäßen manifestiert, werden durch verschiedene systemische Risikofaktoren begünstigt. So wirken sich Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Tabakkonsum, Adipositas und Diabetes mellitus ungünstig auf das Fortschreiten der Krankheit aus^[2]. Der Pathogenese liegen ein gestörter Lipidstoffwechsel mit Ansammlungen von Lipoproteinen in der Arterienwand sowie eine chronische Entzündungsreaktion mit Fehlregulation des Immunsystems zugrunde. Die Entzündungsreaktion entwickelt sich auf dem Boden endothelialer Dysfunktion und in Bereichen mit gestörter Durchblutung^[3]. Dabei kristallisierte sich in den letzten Jahren eine entscheidende Rolle für Thrombozyten in der Pathogenese von Atherosklerose^[4, 5] sowie der Entstehung inflammatorischer Erkrankungen heraus^[6, 7].

Thrombozyten sind kernlose Zellen mit einem Durchmesser von 1-3µm. Nach der Bildung durch Abschnürung aus Megakaryozyten des Knochenmarks zirkulieren sie ca. 7 Tage im Blut, bevor sie v.a. in der Milz durch Phagozytose abgebaut werden^[8]. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Einleitung der Hämostase, ein Vorgang, der die Blutung nach Gefäßverletzungen stoppt. Über die geschädigte Endothelzellbarriere kommt es zum Freiliegen subendothelialer extrazellulärer Matrix (EZM). Deren Komponenten, unter anderem Laminin, Fibronectin, Kollagen und von Willebrand Faktor, interagieren mit entsprechenden Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche und führen dadurch zur Adhäsion und Aktivierung. Neben Integrinen spielen auch thrombozytäre Glykoproteine, die als Adhäsionsrezeptoren fungieren, eine entscheidende Rolle^[9]. So vermittelt Kollagen seine Wirkung über GP VI und Integrin $\alpha_2\beta_1$, vWF über GPIIb-V-IX, Fibronectin bindet an das Integrin $\alpha_5\beta_1$, Laminin an Integrin $\alpha_6\beta_1$ ^[10-12]. Der Komplex GPIIb/IIIa auf aktivierten Thrombozyten gibt Bindestellen für lösliches Fibrinogen frei und ermöglicht dadurch die Brückenbildung zwischen zwei Blutplättchen, ein unerlässlicher Schritt für die primäre Aggregation^[9].

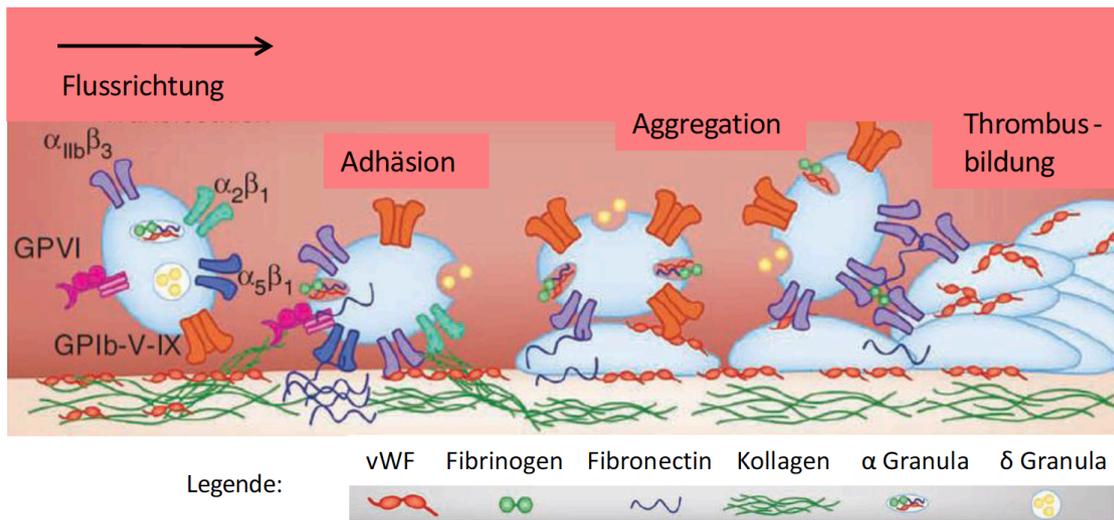


Abb. 1: Vorgänge während der Adhäsion und Aktivierung am defekten Endothel mit freiliegender EZM. Schematisch dargestellt sind wichtige Liganden und Rezeptoren. Unter Flussbedingungen werden die Thrombozyten durch Interaktion mit GPIb-V-IX „gefangen“, die feste Adhäsion wird durch GPIVI und die Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ vermittelt. Modifiziert nach Jackson, S.P.^[13]

Infolge des Kontakts mit der Gefäßwand ändern Thrombozyten ihre typische diskoide Form und bilden Pseudopodien aus (*shape change*). Darüber hinaus sezernieren sie Inhaltsstoffe aus ihren Speichergranula, u.a. ADP und Thromboxan A_2 . Zudem werden weitere lösliche Agonisten, wie der Gerinnungsfaktor IIa und Thrombin, aus geschädigten Endothelzellen freigesetzt^[9]. Sie führen autokrin zu einer Verstärkung der Aktivierung und weiterer Anreicherung von Thrombozyten. Die anschließende Aggregation der Plättchen unter Ausbildung von Fibrinogenbrücken führt zur Bildung eines stabilen Thrombus und trägt zum Verschluss des Endotheldefektes bei. Den genannten löslichen Substanzen ist gemeinsam, dass sie ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln^[14]. Diese sind heptahelikal in der Zellwand verankert und auf zytoplasmatischer Seite an G-Proteine gekoppelt. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer α - und einer $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sie erfahren nach der Aktivierung des Rezeptors eine Konformationsänderung und können dadurch unterschiedliche Effektoren regulieren. Es existieren drei Subfamilien, G_s -Proteine mit cAMP abhängigen Reaktionen, G_i -Proteine als inhibitorisch wirksame Untergruppe sowie G_q -Proteine, deren Aktivierung an die Phospholipase C gekoppelt ist.

Thrombozyten interagieren nicht nur mit entzündlich veränderten Zellen^[15], sie erfahren auch eine Aktivierung durch inflammatorische Stimuli und setzen daraufhin Zytokine und Chemokine in ihre Umgebung frei^[15-17]. Diese wiederum greifen in das entzündliche Geschehen ein und erhalten es aufrecht^[7, 18]. Des Weiteren sezernieren Blutplättchen Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, welche sowohl das Wachstum glatter Muskelzellen (*SMCs*) als auch die Angiogenese in atherosklerotischen Plaques fördern^[19].

Die beschriebenen Mechanismen und Vorgänge am defekten Endothel finden nicht nur im Rahmen der physiologischen Hämostase, sondern auch unter pathophysiologischen Bedingungen statt. Insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen, die mit einem geschädigten Endothel bzw. endothelialer Dysfunktion einhergehen, führen sie zur Thrombus- bzw. Plaqueformation^[20]. Die prothrombotische und proinflammatorische Funktion und die Tatsache, dass Thrombozyten schon vor dem Manifestwerden der Atherosklerose die ersten adhärierenden Blutzellen am Gefäßendothel sind, unterstreichen ihre wichtige Rolle im Prozess der Atheroskleroseentstehung^[4, 13, 21]. In der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, speziell der koronaren Herzkrankheit (*KHK*), kommen Thrombozytenhemmer heute daher standardmäßig zum Einsatz^[22]. Ihre Wirkung entfalten die gängigsten Medikamente über Hemmung der thrombozytären Cyclooxygenase COX-1 (ASS), Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor), oder als blockierende Antikörper am Glykoproteinkomplex GPIIb/IIIa (Abciximab, Eptifibatide, Tirofiban).

1.2 Fractalkin

Chemokine sind eine große Gruppe niedermolekularer Proteine. Ihr Name leitet sich ab von ihrer Eigenschaft, Zellen, speziell Leukozyten, zu Orten entzündlicher Aktivität zu dirigieren: Chemotactic cytokines^[23, 24]. Chemokine vermitteln pleiotrope Effekte, u. a. in den Bereichen Angiogenese, Hämatopoiese, Übertragung von Viruserkrankungen und Lymphozyten-Transport^[25]. Zusätzlich zu ihrer Hauptaufgabe, der Immunabwehr, induzieren viele auch proinflammatorische und proatherosklerotische Effekte^[18, 26-29]. Die Benennung der Vertreter erfolgt systematisch. Nach der hochkonservierten Anordnung der beiden Cystein Aminosäuren (*C*) und der zusätzlich zwischen ihnen angeordneten Aminosäuren (*X*) am N-terminalen Ende des Proteins werden sie in vier Gruppen eingeteilt (Abb. 2). An das Gruppenkürzel (*C*, *CC*, *CXC*, *CX3C*) wird ein *R* für Rezeptor

oder ein *L* für Ligand angehängt, gefolgt von einer Zahl^[30]. Die Signalübertragung erfolgt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembranhelices. Bis heute sind 50 verschiedene humane Chemokine bekannt. Der einzige Vertreter der zuletzt entdeckten Gruppe mit dem CX3C-Motiv ist CX₃CL1, auch bekannt als Neurotactin oder Fractalkin.

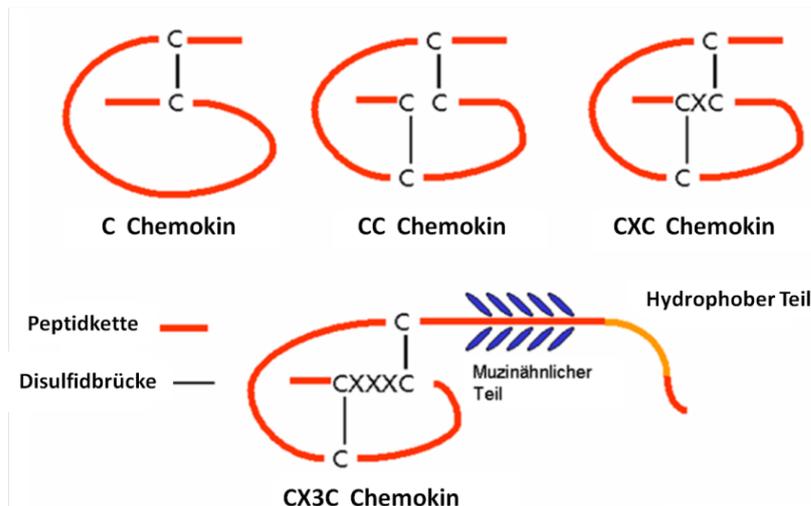


Abb. 2: Schematische Struktur der Chemokine mit jeweils typischer Anordnung der beiden Cystein (C) Aminosäuren am N-Terminus des Proteins; unten: Fractalkin; Kohidai, L; 2008^[31]

Die Erstbeschreibung von Fractalkin brachte 1997 neben der Einführung einer neuen Chemokin-Klasse auch eine strukturelle Neuheit mit sich, da es sich durch den Aufbau von anderen Chemokinen unterscheidet. Mit einem muzinähnlichen, membranverankerten Proteinstrang, der die Chemokindomäne trägt, liegt es membrangebunden vor, kann jedoch durch Proteolyse auch als lösliches Chemokin freigesetzt werden^[32]. Neben Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimieren im Blut zirkulierende natürliche Killerzellen, Monozyten und Makrophagen sowie Leukozyten und Thrombozyten den Rezeptor für Fractalkin, CX₃CR1, auf ihrer Oberfläche^[33]. Die Expression des Chemokins wird durch entzündungsfördernde Stoffe reguliert und ist gesteigert unter pathologischen Verhältnissen, so in atherosklerotischen Plaques, bei koronarer Herzkrankheit und endothelialer Dysfunktion^[34-37]. Die membranständige Form agiert als Adhäsionsmolekül und sorgt als Antwort auf inflammatorische Reize für eine vereinfachte Adhäsion und Migration von Zellen, die den Fractalkin-Rezeptor tragen. Dies wurde sowohl unter statischen Bedingungen als auch bei physiologischen Flussraten im Gefäßsystem ge-

zeigt^[38, 39]. Schon früh wurde membrangebundenes CX₃CL1 mit der erleichterten Adhäsion und Migration von Leukozyten in Verbindung gebracht^[40].

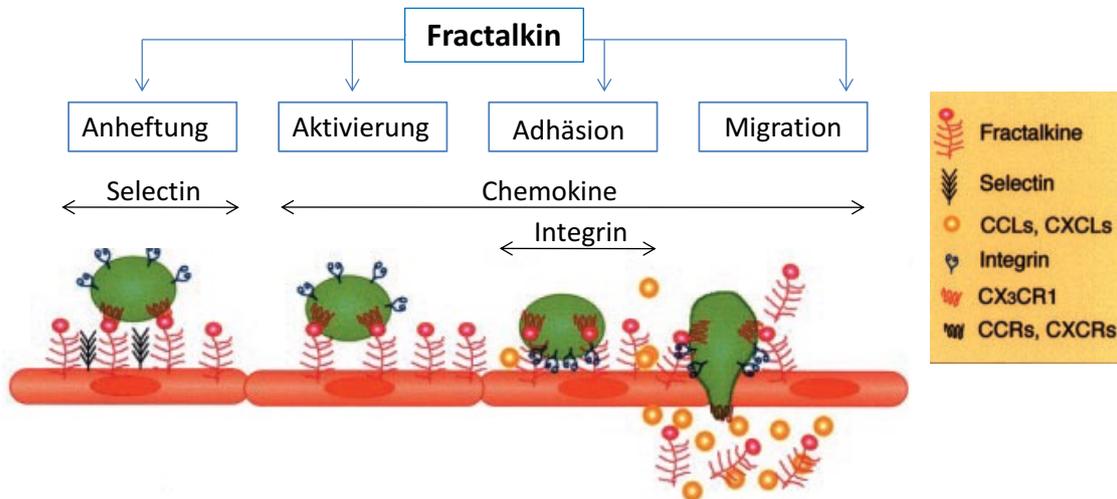


Abb. 3: Schematisches Modell der Fractalkin-vermittelten, erleichterten Leukozyten-Migration: Fractalkin liegt membrangebunden auf Endothelzellen vor und vermittelt Selectin- und Integrin-unabhängig die Rekrutierung der Leukozyten; Verstärkung der Integrin-Wirkung durch CX₃CR1-Fractalkin-Interaktion mit nachfolgender Extravasation der Leukozyten; nach Umehara, H., et al.^[41]

Fractalkin führt zudem zu einer rezeptorabhängigen und -unabhängigen Thrombozytenaktivierung, die in vermehrter P-Selectin Expression resultiert^[42]. Entzündlich veränderte Endothelzellen exprimieren vermehrt CX₃CL1, welches Thrombozyten über den Fractalkin-Rezeptor abfängt und aktiviert. Daraufhin präsentieren die aktivierten Blutplättchen P-Selectin auf der Oberfläche, welches entscheidend für die initiale Bindung der Leukozyten unter arteriellen Scherraten ist. Im Folgenden führt diese Interaktion zur festen Adhäsion und Migration der Leukozyten, die zudem über deren eigenen Rezeptor für Fractalkin getriggert wird^[33].

1.3 Mfg-e8

Glykoproteine sind Proteine mit einer oder mehreren kovalent gebundenen Kohlehydratgruppen, die durch co- oder posttranslationale Glykosilierung an das Protein gebunden werden. Lactadherin oder milk fat globule EGF Faktor 8 (*mfg-e8*) ist ein hauptsächlich durch Phagozyten und Endothelzellen sezerniertes Glykoprotein, das in Tier und Mensch einen leicht unterschiedlichen Aufbau aufweist^[43, 44]. Die humane Form des Proteins besteht aus drei Domänen, einer EGF-ähnlichen Domäne sowie zwei Discoïdin-Domänen^[45]. 1990 wurde das Glykoprotein erstmalig im Oberflächenepithel von laktierenden Brustdrüsen der Maus beschrieben. Die spätere Benennung in *mfg-e8* zeugt sowohl davon, als auch von der Sequenzähnlichkeit zum epidermalen Wachstumsfaktor (*EGF*) und zum Gerinnungsfaktor V und VIII^[46, 47]. Die Ähnlichkeit mit den Faktoren V/VIII bezieht sich auf die C-terminale Domäne. Sie kann an anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin (*PS*) binden. Am N-terminalen Ende findet sich eine Cystein-reiche EGF Domäne (siehe Abb. 4). Diese beinhaltet ein Arginin-Glycin-Aspartat (*RGD*)-Motiv, über welches mit den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Zelladhäsion und Signaltransduktion vermittelt werden kann^[47, 48]. Mithilfe des Phosphatidyl-bindenden C-Terminus trägt Lactadherin zur Clearance apoptotischer Zellen bei^[44, 49, 50]. Darüber hinaus kann *mfg-e8* via FV/VIII-Bindungsdomäne auch an Kollagen binden und fördert so den Umsatz der EZM^[51].

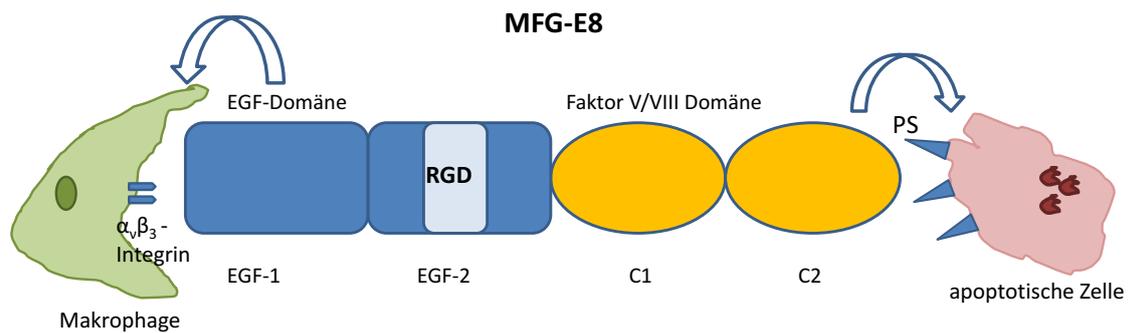


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur von mfg-e8. Das humane Glykoprotein besitzt am N-Terminus eine EGF-Domäne (bzw. zwei bei der bovinen und murinen Form), die eine RGD-Domäne beinhaltet. Über diese erfolgt die Kontaktaufnahme mit Makrophagen bzw. deren Integrinen. Die beiden C-Domänen ähneln in ihrer Sequenz den Gerinnungsfaktoren V und VIII, sie können Phosphatidylserin (PS) auf Zellen erkennen und daran binden. So kann mfg-e8 als Bindeglied zwischen apoptotischer Zelle und phagozytierender Zelle seine Hauptaufgabe wahrnehmen: die Beseitigung apoptotischer Zellen als Oponin zu verstärken. Modifiziert nach Kusunoki, R.^[52]

Mfg-e8 wird von unterschiedlichen Zelltypen unter anderem in Gehirn, Herz, Niere, Lunge und Milz exprimiert und erfüllt diverse Aufgaben im Bereich der Zell-Zell-Interaktion^[47, 53, 54]. Beispielsweise fördert es die Angiogenese durch VEGF-induzierte Proliferation in Endothelzellen, reguliert die Migration von Epithelzellen im Darm und der Brustdrüse und erfüllt diverse weitere Rollen in den Bereichen Immunmodulation und Apoptose^[50, 55-57]. Pathophysiologisch tritt das Glykoprotein auch in Zusammenhang mit Atherosklerose auf, Wirkungen sind vor allem auf das kardiovaskuläre Remodeling beschrieben^[58]. Weiterhin wurde eine antikoagulatorische Wirkung von Lactadherin berichtet sowie der mögliche Einsatz zur Phosphatidylserin-Quantifizierung aufgrund der PS-Bindestelle^[59].

1.4 Ausblick

Interessanterweise wurde eine mögliche Wechselwirkung von Fractalkin und mfg-e8 beschrieben. So kann die Expression von mfg-e8 in Microglia und Peritonealmakrophagen von Ratten durch das Chemokin Fractalkin induziert werden^[49, 60]. Dieser Zusammenhang zwischen CX₃CL1 und mfg-e8 ist gerade am Gefäß wegen der möglichen Interaktion mit Blutplättchen interessant. Unter Umständen kann mfg-e8 dort mit Thrombozyten interagieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst näher auf die Bedeutung von Fractalkin und dessen Signalweg am Thrombozyten einzugehen. Insbesondere soll untersucht werden, ob P2Y₁₂ und CX₃CR1 intrazellulär eine ähnliche Signalkaskade aufweisen. Weiterhin sollen erste Versuche mit mfg-e8 Aufschluss über dessen bislang nicht beschriebene Interaktion mit Blutplättchen über das RGD-Motiv geben. Diese Versuche könnten dann die Grundlage für weitere Experimente zum besseren Verständnis eines bislang nicht beschriebenen Mechanismus der frühen Atheroskleroseentstehung darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

ACD-Puffer	Acid-Citrat [3,8 mM], Dextrose [125 mM]
Blocking-Lösung	0,1% TBS-Tween mit 5%igem ECL TM -Blocking Agent (<i>Amersham</i>)
DTT	Dithiothreitol [1,25mM]
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethanesulfonsäure [1M]
Loading Buffer	Tris-HCl [187,5mM], pH 6,8, 6%(w/v) SDS, 30%(w/v) Glycerol, 0,03%(w/v) Bromphenol blue
PBS-Puffer, 0,01M	D-Glucose [5,5mmol/l], 0,5% BSA
Sample Buffer	Loading Buffer + DTT
TBS-Tween, 0,1%	Tris-HCl [20 mmol/L], NaCl [150 mmol/L], 0.05% Tween 20; pH 7.6
Translocation-Puffer	Tris-HCl, 200 mmol/L [pH 6.7]; 15% [vol/vol] glycerol; 6% [wt/vol] sodium dodecyl sulfate
Tyrodes-Puffer 1	NaCl [132mM], KCl [4mM], NaHCO ₃ [11,9mM], NaH ₂ PO ₄ [0,36mM], Glucose [10mM]; pH 6,5 1ml PRP/1,5 ml Puffer
Tyrodes-Puffer 2	NaCl [132mM], KCl [4mM], NaHCO ₃ [11,9mM], NaH ₂ PO ₄ [0,36mM], Glucose [10mM]; pH 7,4;

2.2 Herstellung gewaschener Thrombozyten aus Vollblut

Die Versuche wurden mit Blut von freiwilligen, gesunden Probanden im Alter zwischen 22 und 46 Jahren durchgeführt. Sie standen zu diesem Zeitpunkt nicht unter dem Einfluss von Medikamenten, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Die Proben wurden durch Punktion der Vena cubitalis mit einer 21G Nadel gewonnen. Hierbei wurden die ersten 5ml des erhaltenen Blutes verworfen, um eine spontane Plättchenaggregation infolge des Kontakts von Gerinnungsfaktoren mit dem Blut durch die induzierte Gefäßverletzung zu verhindern. Zur Gewinnung von gewaschenen Thrombozyten wurde das Blut in Monovetten mit ACD-Puffer im Verhältnis 1ml Puffer/4ml Blut gesammelt.

2.2.1 Plättchen-reiches Plasma (*PRP*)

Zunächst wurde durch Zentrifugation (400g, 17min, Raumtemperatur, keine Abbremsung; Eppendorf-Centrifuge 5810R, *Eppendorf*) des Vollblutes Plättchenreiches-Plasma (*PRP*, *Platelet rich plasma*) hergestellt. Infolge der Zentrifugation kommt es zur Auftrennung des Vollblutes in Erythrozyten, PRP und die dazwischen befindliche Grenzschicht der Leukozyten. Um eine unerwünschte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden, wurde die Zentrifugation ohne Abbremsung durchgeführt. Mithilfe einer Pipette wurde das PRP ohne Störung der anderen Schichten abgenommen und in 15ml Kunststofffalcons gegeben.

2.2.2 Thrombozytenisolierung

Um Plasma-freie, sogenannte gewaschene Thrombozyten zu erhalten, folgte die Zugabe von 0,02U/ml Apyrase (Adenosin 5'-triphosphat Diphosphohydrolase, *Sigma-Aldrich*), 0,005 μ M PGE₁ (*Sigma-Aldrich*,) und HEPES (*Calbiochem*) -modifiziertem Tyrodes-Puffer 1 zum PRP. Prostaglandin E₁ beugt dabei einer vorübergehenden Plättchenaktivierung während der Aufbereitung vor. Die Apyrase hingegen hydrolysiert bereits freigesetztes ADP und erhält sowohl die Integrität von Thrombozyten gegenüber ADP, als auch die diskoidale Form der Plättchen^[61].

Durch einen sich direkt anschließenden zweiten Zentrifugationsschritt (400g, 10min, 21°C, mittlere Beschleunigung, keine Abbremsung) bildet sich ein Pellet. Der Überstand, das Plättchen-arme Plasma (*Platelet-poor Plasma, PPP*) wurde mit einer Pipette ohne Zurücklassen von Resten abgenommen. Das Pellet wurde mit 0,5ml Tyrodes-Puffer 1 und 0,5ml Tyrodes-Puffer 2 resuspendiert. Nachfolgend wurden zur Vermeidung von Aktivierung erneut 0,02U/ml Apyrase hinzugegeben.

2.2.3 Thrombozytenaufbereitung und -reinheit

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zwischen den Probanden zu gewährleisten, wurde in den Proben eine einheitliche, physiologische Thrombozytenzahl von 300.000/ μ l angestrebt. Hierfür wurde die Thrombozytenzahl mit Hilfe eines automatischen Analysegerätes (Sysmex XT2000iV, *Sysmex Deutschland GmbH*) bestimmt und durch Zugabe von Tyrodes-Puffer 2 auf obige Anzahl verdünnt. Die Proben wurden nun für 60 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Es folgte die Zugabe und 30-minütige Inkubation mit CaCl_2 (1mM) und MgCl_2 (1mM).



Abb. 5: Ausschnitt aus Sysmex-Bildschirmansicht bei Messung der aufgereinigten Probenlösung. Rot umrahmt WBC = Leukozyten.

Die Erstellung des Differentialblutbildes im Sysmex beruht auf den Grundlagen der Durchflusszytometrie. Für die Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde das für die Blutplättchen spezifische Fluoreszenzsignal im RET-Kanal verwendet. Eine Interaktion mit vorhandenen Kryoglobulinen wurde durch eine Messung bei 41°C vermieden. Aus der beispielhaften Abbildung (Abb. 5) wird ersichtlich, dass sich außer Blutplättchen nahezu keine anderen Zellen in der aufgereinigten Probe befinden. Somit sind beobachtete Adhäsionseffekte nicht auf vorhandene Leukozyten zurückzuführen.

Einstellungen und Dauer der beiden Zentrifugationsschritte sowie die Menge der zugegebenen Aggregationshemmstoffe Apyrase und PGE₁ wurden in einer Reihe von Vorversuchen ermittelt. Dabei wurde sowohl auf bereits vorhandene Protokolle in der Literatur ^[62], als auch auf Erfahrungen mit der Herstellung gewaschener Thrombozyten von Wistar-Ratten aus der eigenen Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Die Herstellung gewaschener humaner Thrombozyten konnte so protokolliert in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

2.3 Western blot

Die aufbereiteten gewaschenen Thrombozyten wurden zu 9 Aliquots von 250µl in *Eppendorf*-Cups pipettiert. Zur Stimulation der Thrombozyten wurden ADP (1,5mM; *Sigma-Aldrich*), rekombinantes menschliches Fractalkin (CX₃CL1; 250µg/ml; *R&D Systems*) und rekombinantes menschliches mfg-e8 (0,1µg/µl; *R&D Systems*) in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

2.3.1 Herstellung der Proben mit Fractalkin

Tab. 1: Pipettierschema für Western blot Proben mit Fractalkin

1. Basal (unstimuliert)
2. 5 µM ADP
3. 10 µM ADP
4. 1µg/ml FKN
5. 2 µg/ml FKN
6. 1 µg/ml FKN + 5 µM ADP
7. 1 µg/ml FKN + 10 µM ADP
8. 2 µg/ml FKN + 5 µM ADP
9. 2 µg/ml FKN + 10 µM ADP

Die Inkubationszeit betrug jeweils 5 Minuten für ADP und Fractalkin, wobei den Proben 6 – 9 zuerst Fractalkin, dann ADP zugesetzt wurde (siehe Tab. 1). Zur Gewährleistung einer einheitlichen Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Proben wurde schließlich Tyrodes-Puffer 2 bis zu einem Endvolumen von 300µl zugesetzt. Im Anschluss daran wurden jeweils 50µl jeder Probe mit 50µl Translocation-Puffer versetzt, wodurch ein Abstoppen der Thrombozyten-Aktivierungsreaktion stattfand. Nach sorgfältiger Durchmischung wurden die *Eppendorf*-Cups mit den enthaltenen Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2 Herstellung der Proben mit mfg-e8

Tab. 2: Pipettierschema für Western blot Proben mit mfg-e8

1. Basal (unstimuliert)
2. 5 μ M ADP
3. 10 μ M ADP
4. 20 μ M ADP
5. 250ng/ml mfg-e8
6. 500ng/ml mfg-e8
7. 5 μ M ADP + 250ng/ml mfg-e8
8. 10 μ M ADP + 250ng/ml mfg-e8
9. 20 μ M ADP + 250ng/ml mfg-e8
10. 5 μ M ADP + 500ng/ml mfg-e8
11. 10 μ M ADP + 500ng/ml mfg-e8
12. 20 μ M ADP + 500ng/ml mfg-e8

Die gewaschenen Thrombozytenproben wurden jeweils 5 Minuten mit ADP und mfg-e8 inkubiert, die Proben 7 - 12 zunächst mit ADP, dann mit mfg-e8 versetzt. Für vergleichbar große Proteinmengen in den Proben wurde Tyrodes-Puffer 2 bis zum Gesamtvolumen von 100 μ l aufgefüllt. Jeweils 50 μ l Probe und 50 μ l Translocation-Puffer wurden sorgfältig vermischt und die Cups bei -20°C gelagert.

2.3.3 Western blot Analyse

Die Proben für die Western blot-Analyse (aufbereitete gewaschene Thrombozyten, siehe 2.3.1) wurden zunächst auf Eis langsam aufgetaut und danach 10 Minuten bei 10.000g und 4°C zentrifugiert (Hettich Universal 320R, *Hettich-Zentrifugen*). Jeder der Reaktionsansätze wurde in drei Aliquots zu je 20 μ l aufgeteilt. Anschließend wurden die Proben mit Sample Buffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Auf einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel von 1,5mm Dicke wurden pro Gelta-sche 33 μ l Probe aufgetragen. Erster Schritt des Western blot ist die elektrophoreti-

sche Auftrennung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine dienten die beiden Vergleichsskalen Prestained Protein Marker (*Cell Signaling*) und Precision Plus Protein™ Standards (*Bio-Rad*) als Standard.

In einer mit eisgekühltem Transferpuffer gefüllten Blotkammer schloss sich nun das sogenannte Blotting an. Die Proteine wurden dabei vom Gel über eine senkrecht dazu angelegte Spannung von 100V über 90 Minuten auf eine PVDF-Membran (Immun-Blot® 0,2µM, *Bio-Rad*) übertragen. Auf den Transfer folgte die Inkubation der Membran in Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dadurch sollten alle unspezifischen Bindungsstellen für den primären Antikörper auf der Membran blockiert werden. Anschließend wurden die Membranen mit den in TBS-T verdünnten primären Antikörpern bei 4°C über Nacht unter Schwenken inkubiert. Zum Einsatz kamen Antikörper gegen Phospho-Akt (Ser⁴⁷³) (1:1000), Phospho-Akt (Thr³⁰⁸) (1:1000), Akt (pan) (1:2000) (alle *Cell-Signaling*) und GAPDH (*abcam*) (1:50.000).

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBS-T unter Schwenken gewaschen. Schließlich wurde der als sekundärer Antikörper fungierende Anti-rabbit IgG-HRP-Antikörper (1:10.000; *Cell-Signaling*) für eine Stunde Inkubation hinzugegeben. Seine Kopplung an Meerrettich-Peroxidase (HRP) machte den Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes mittels Chemilumineszenz-Reaktion möglich. Nach Abwaschen des Sekundärantikörpers (dreimal je 10 Minuten in TBS-T) konnten die Banden daher mithilfe von Detektionsreagenzien (ECL Plus™ und ECL, *Amersham*) und einer Entwicklermaschine auf Autoradiographiefilmen (Hyperfilm™ ECL, *Amersham*) sichtbar gemacht werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Scion Image for Windows Beta 4.0.2 (*Scion Cooperation*).

2.4 Flusskammer

2.4.1 Prinzip und Aufbau der Flusskammer

Die Flusskammer stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung von Zelladhäsion an Oberflächen unter physiologischen Flussbedingungen dar. Dabei können Scherkräfte, wie sie im Blutgefäß zu erwarten sind, simuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozytenadhäsion unter arteriellen Flussbedingungen untersucht. Die Versuche wurden mit einer Parallelplattenflusskammer vom Typ FCS2 Closed Chamber System (*Bioptechs Inc.*) durchgeführt. Boden und Deckel des Systems bestehen aus einem zusammenschraubbaren, auslaufsicheren Metallkorpus. Dieser verfügt über Adapter für ein Zu- und Ablaufsystem der zu perfundierenden Flüssigkeit. In den Deckel des Korpus ist ein Glasfenster eingearbeitet, das eine Sichtkontrolle der Versuche durch ein Mikroskop ermöglicht. Die eigentliche Flusskammer besteht aus zwei Glasplättchen (Cover Slips, *Bioptechs Inc.*) von 25mm Durchmesser. Zwischen beiden wird ein 0,5mm dicker Dichtungsring aus Silikon mit einer rechteckigen Aussparung von 14 x 22mm (Gasket, *Bioptechs Inc.*) durch eine Haltevorrichtung befestigt. Der Abstand der Plättchen definiert die Höhe, die Aussparung des Dichtungsringes die Fläche der Kammer (siehe Abb. 6).

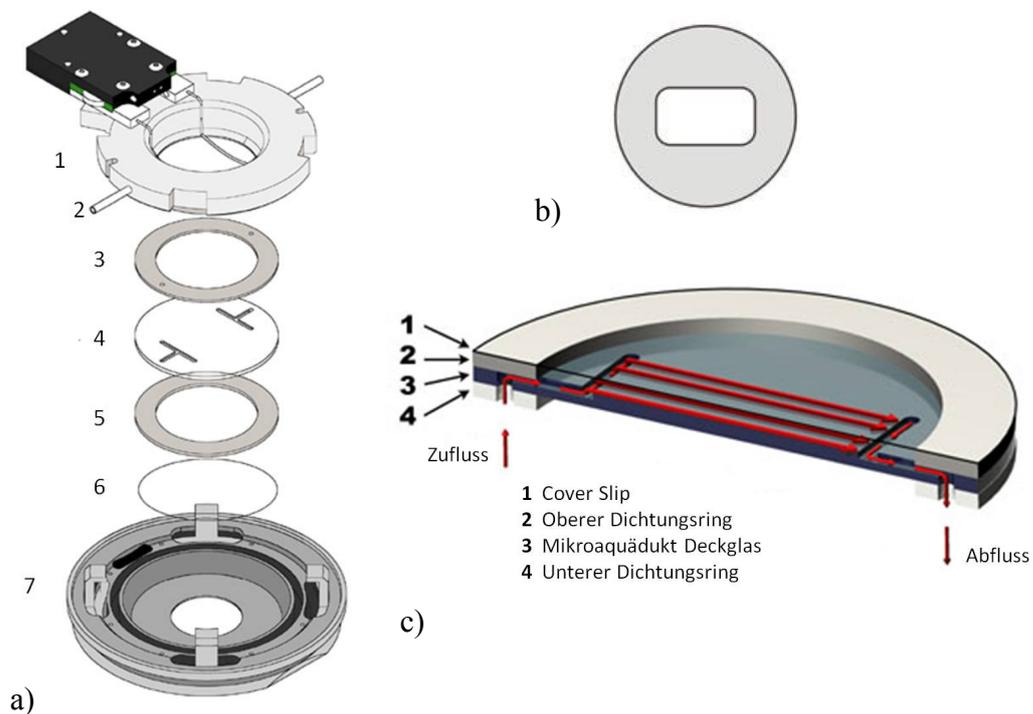


Abb. 6: Komponenten der FCS2, Closed Chamber System *Biopetechs Inc.*; a) Aufbau der Flusskammer: 1) Kammerdeckel, mit 2) Zu- und Abflussröhrchen, 3) oberer Silikondichtungsring, 4) Mikroquädukt-Deckglas, 5) unterer Dichtungsring, entspricht Abb. 4b), 6) Cover-Slip, 7) Kammerbasis; 1) und 7) bilden den Metallkorpus; b) verwendeter unterer Dichtungsring mit rechteckiger Aussparung; c) Funktionsweise des Kammerhohlraums. Zur besseren Darstellung liegt das Cover Slip oben (in der Flusskammer unten, siehe a)), das durchsichtige Deckglas ist grau eingefärbt; rote Pfeile zeigen die Flussrichtung während der Perfusion an; modifiziert nach *Biopetechs Inc.*

Der Zulauf wurde über einen Dreiwegehahn mit einer 50ml Spritze verbunden, die für den Gebrauch in einer Spritzenpumpe geeignet ist, der Ablauf erfolgte über einen kleinen Schlauch in ein Falconröhrchen. Die Scherrate betrug dabei 1000/s, entsprechend den Abscherkräften von Arterien mittlerer Größe unter physiologischen Bedingungen, wie dies auch in entsprechenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe üblich war^[42].

2.4.2 Probenpräparation

Für die Cover Slips wurde zunächst eine Verdünnungslösung hergestellt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Verdünnungslösungen für Cover Slips mit resultierender Endkonzentration

<i>Cover Slip</i>	<i>Verdünnungslösung</i>	<i>Endkonzentration</i>
Fibrinogen-Beschichtung	2,4g Fbg/240ml PBS	10mg/ml Fbg
Negativ-Kontrolle	1,5g BSA/75ml PBS	2% BSA

In Petrischalen mit einem Fassungsvermögen von 6ml wurden die Cover Slips 2h bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS und das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 2% BSA für 2h bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die Cover Slips unter sterilen Bedingungen zum Trocknen ausgelegt. Zur Aufbewahrung wurden die beschichteten Glasplättchen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die Flusskammerversuche wurden mit gewaschenen humanen Thrombozyten durchgeführt. Die Herstellung erfolgte wie in 2.2 beschrieben. Die Konzentration von CaCl_2 wurde auf 2mM festgelegt und die Suspension schließlich auf eine Thrombozytenzahl von 150.000/ μl eingestellt. Um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten durch die höhere Calciumionenkonzentration zu verhindern, wurde die Inkubationszeit für CaCl_2 und MgCl_2 auf 15min verkürzt. 5ml je Probe wurden unstimuliert belassen oder vor Versuchsbeginn mit mfg-e8 (100ng/ml) versetzt.

2.4.3 Durchführung der Versuche

Das Flusskammersystem wurde ordnungsgemäß nach Herstellerangaben mit unbeschichteten bzw. präparierten Cover Slips (siehe 2.4.2) zusammengesetzt. Für jeden Versuch wurde ein neues Cover Slip eingesetzt. Anschließend wurden Schlauch und Kammer mit PBS-Puffer entlüftet. Die Thrombozytensuspension wurde direkt nach Inkubation mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$ vorsichtig in eine Perfusor-spritze aufgezogen und diese in eine Spritzenpumpe eingespannt. Für 6 Minuten durchlief die Suspension mit einer Geschwindigkeit von 20ml/h die Flusskammer. Im Anschluss folgte die Spülung der Kammer mit PBS-Puffer (6 Minuten, 20ml/h) zur Entfernung der nicht adhärenen Plättchen. Zur Versuchsbeobachtung diente ein invertiertes Mikroskop (TE 2000-S, *Nikon*), auf dem die Flusskammer angebracht war. Die Dokumentation erfolgte durch die angeschlossene Digital-Kamera (DS-2 M, *Nikon*), die mit einem Computer verbunden war. Mit Hilfe einer Software (NIS Elements F 2.2; *Nikon*) wurden in einem festgelegten Raster 6 Gesichtsfelder fotografiert und für die Auszählung gespeichert und ausgedruckt. Aus den Zahlenwerten der 6 Gesichtsfelder wurde das arithmetische Mittel gebildet. Die Mittelwerte der stimulierten und unstimulierten Proben wurden einander gegenübergestellt.

2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

2.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Charakterisierung der Eigenschaften von Einzelzellen oder Zellpopulationen. Als FACS® (Fluorescence activated cell sorting) kommt sie in Klinik und Forschung standardmäßig zum Einsatz. Für die Analyse müssen die zu messenden Zellen in Suspension vorliegen. Diese wird, durch einen Hüllstrom fokussiert, kontinuierlich durch ein Ansaugsystem in eine Messzelle transportiert, sodass die Zellen diese einzeln hintereinander passieren^[63]. Hier kreuzt die Probe den Messpunkt, einen Laserstrahl von 488nm Wellenlänge, der im rechten Winkel zum Zellfluss angeordnet ist.

Photodioden erfassen das von den Zellen in charakteristischer Weise reflektierte Streulicht. Dabei werden zwei Hauptrichtungen registriert: In einem Engwinkel zum Laser das Vorwärtsstreulicht (forward scatter; *FSC*) und orthogonal dazu das Seitwärtsstreulicht (side scatter, *SSC*). Während das Vorwärtsstreulicht proportional zur Zellgröße ist, korreliert die Seitwärtsstreuung mit der Granularität der Zellen^[64]. Zudem kann bei der Passage durch das Laser-Licht Fluoreszenz erzeugt und erfasst werden. Spezielle, beispielsweise gegen Oberflächenantigene der Zelle gerichtete Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die bei Anregung durch den Laser Licht bestimmter Wellenlängen abgeben. Auf diese Weise können sowohl die Morphologie als auch spezifische Eigenschaften der Zelle bestimmt werden.

2.5.2 Herstellung der Proben

Zunächst erfolgte an gesunden, freiwilligen Probanden die Blutentnahme durch Punktion der Vena cubitalis. Die Probanden hatten innerhalb einer Woche vorher keine Medikamente zu sich genommen, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Nach der Abnahme des Vollbluts in 3ml-Citrat-Röhrchen (3,8% Natrium-Citrat) erfolgte die weitere Verarbeitung zu PRP (siehe 2.2.1). Vor dem Versetzen mit dem jeweiligen Antikörper fand bei einem Teil der Proben eine Stimulation mit ADP (10 μ M) statt. Zusätzlich wurde allen Proben mit Ausnahme der Kontrolle mfg-e8 (10 μ g/ml) zugegeben. Die kumulative Inkubationszeit war dabei auf 5 Minuten beschränkt. Die Versuchsansätze befanden sich in Glasküvetten und wurden mit einem kleinen Magneten bei 37°C kontinuierlich gerührt. Anschließend folgte die Zugabe eines von drei Antikörpern. Die Inkubation fand für 10 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt statt. Ein Iso-FITC-/Iso-PE Antikörper diente zur Darstellung der unspezifischen Antikörperbindung. Bei Thrombozytenaktivierung wird aus den α -Granula vermehrt P-Selectin ausgeschüttet und auf der Oberfläche exprimiert. Es kann mit dem gegen P-Selectin gerichteten Antikörper CD62P PE (*BD Biosciences*) detektiert werden, der hier zum Einsatz kam. Für Versuche zur PAC-1-Bindung wurde der PAC-1 FITC Antikörper (*BD*

Biosciences) verwendet. Zum Monitoring der mfg-e8 Bindung wurde ein anti-HIS-Antikörper mit AF 488 Labeling (Penta His Alexa Fluor 488; *Qiagen*) eingesetzt, da das verwendete mfg-e8 einen HIS-Tag besaß. Die im PRP enthaltenen Blutplättchen wurden schließlich 10 Minuten bei Raumtemperatur in Methanol-freiem Formaldehyd (1,5%) fixiert, mit PBS-Puffer verdünnt und der FACS®-Analyse zugeführt.

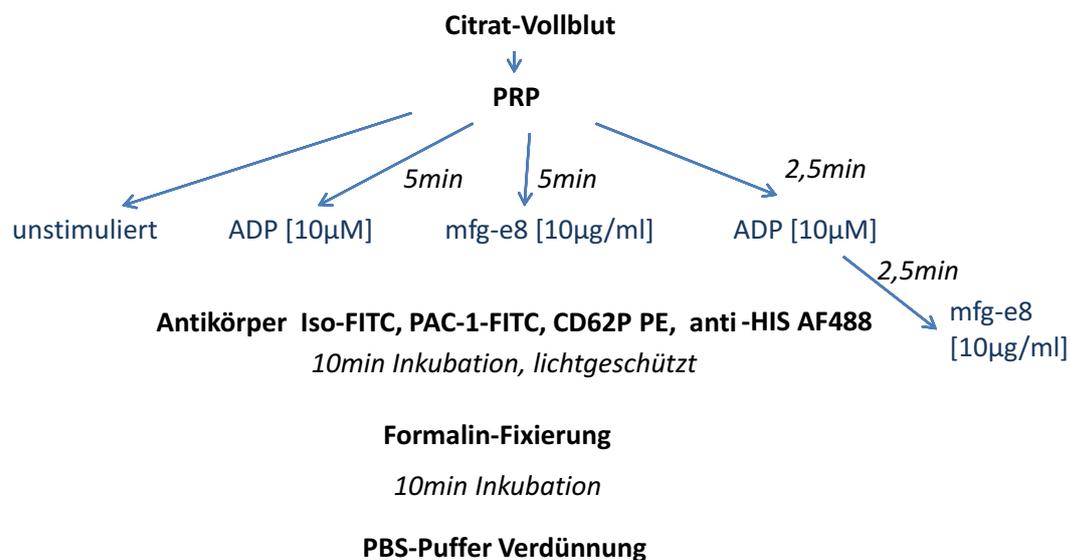


Abb. 7: Protokoll zur Thrombozytenfärbung mit und ohne vorherige Stimulation für FACS®-Analyse; nach Aufbereitung folgte die Zugabe der verschiedenen Antikörper: Iso-FITC/Iso-PE diente als Markierung der Hintergrundbindung, PAC-1-FITC und CD62P PE sind Marker der Thrombozytenaktivierung, anti-HIS AF488 wurde für die mfg-e8 Bindung verwendet

2.5.3 Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung erfolgt typischerweise mit Dot Plots. In diesen Diagrammen werden Ereignisse in Form einer Punktwolke aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einem aufgezeichneten Ereignis (Event), also einer Zelle. Die X-Achse entspricht dabei dem FSC, die Y-Achse dem SSC. Eine andere Möglichkeit der Darstellung bieten Histogramme, in welchen die gezählten Ereignisse gegen einen weiteren Parameter wie Fluoreszenz aufgetragen werden (siehe Abb. 8). Da nur bestimmte Zelleigenschaften als Teil der Messergebnisse in die Auswertung einfließen, lässt sich die Datenmenge bereits durch die Wahl von Voreinstellungen einschränken. Diese Vorauswahl wird als *Gate* bezeichnet und kann am FACS®-Gerät gespeichert werden. Alle Messungen in dieser Arbeit wurden am FACS®-Calibur (*Becton Dickinson*) bei niedriger Flussrate durchgeführt. Im „Thrombozytengate“ wurde die zu messende Thrombozytenzahl auf 20.000 begrenzt. Der Leerwert wurde auf eine mittlere Fluoreszenz von 10 eingestellt und schließlich optisch von den Messgraphen subtrahiert. Die mittlere Fluoreszenz wurde mit CELLQuest Software, Version 3.1f (*BD Biosciences*) analysiert.

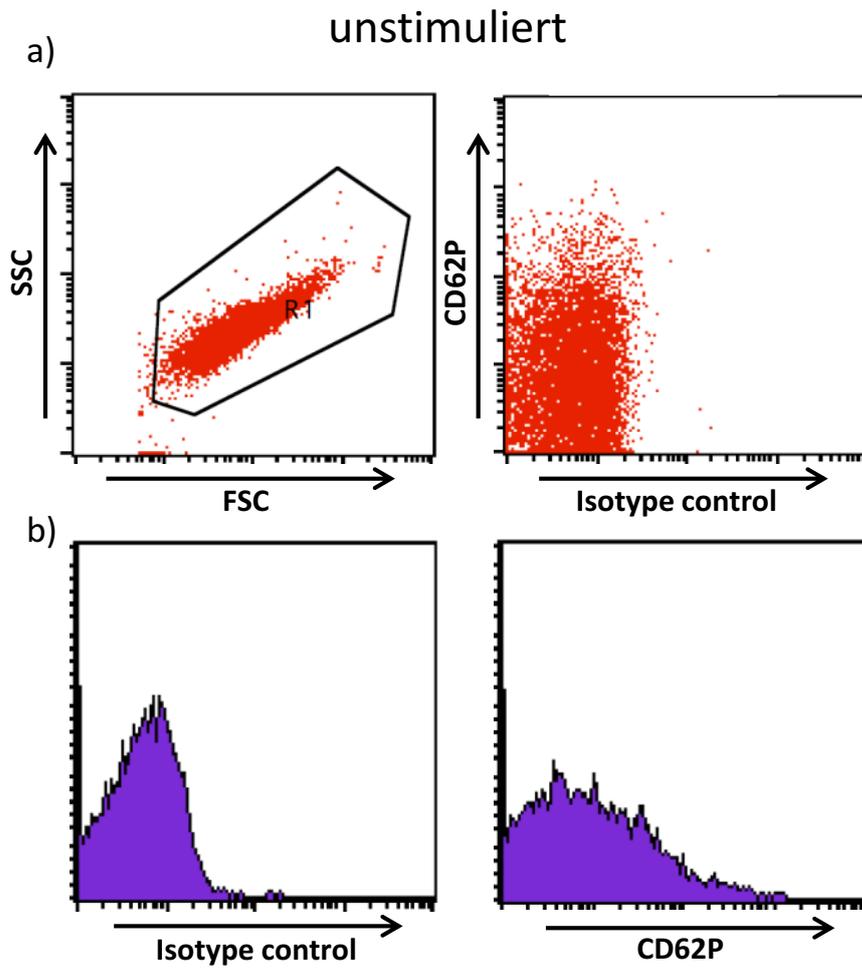


Abb. 8: Originalabbildungen durchflusszytometrischer Analysen mit unstimulierten Thrombozytenproben; a) Dotplot Darstellung, links: mit markiertem Thrombozytengate; rechts: mit dem Antikörper CD62P PE markierte Thrombozyten; b) Histogramm Darstellung, links: Fluoreszenzintensität der Isotypenkontrolle; rechts: Fluoreszenzintensität der markierten Blutplättchen

2.6 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind alle Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test für paarige oder unpaarige Stichproben oder mit Hilfe der einseitigen Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet, eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.01$ als hochsignifikant.

3. Ergebnisse

3.1 PI3-Kinase vermittelter Signalweg über P2Y₁₂

Humane gewaschene Thrombozyten wurden mit ADP inkubiert und anschließend für Western blot Versuchsreihen aufbereitet. Die Bindung von ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor auf der Oberfläche der Blutplättchen bewirkt über die G_{βγ}-Untereinheit des intrazellulär an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins die Aktivierung der PI3K und die Phosphorylierung von Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸.

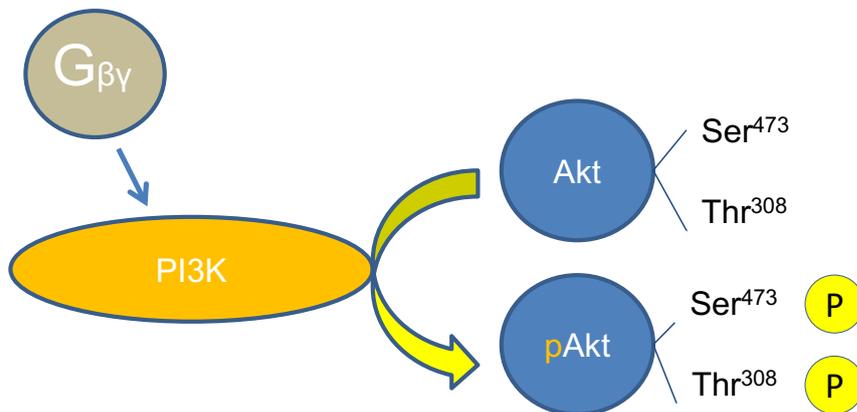


Abb. 9: Ausschnitt aus dem G-Protein gekoppelten PI3-Kinase-Signalweg: Die G_{βγ}-Untereinheit aktiviert PI3K, nachfolgend kommt es zur Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt); Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ gehen in den phosphorylierten Zustand über

Die Aktivierung von Thrombozyten durch den starken Plättchen-Agonisten ADP zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlauf (siehe Abb. 10). Dies wird ersichtlich am Ergebnis der Auswertungen für Ser⁴⁷³. Die Zugabe von 5 μM ADP führte zu einer hochsignifikanten (p<0.001) PI3-Kinase Aktivierung. Verdoppelung der Konzentration auf 10 μM ergab eine weitere Aktivitätssteigerung verglichen mit 5 μM (p<0.05). Dieses Ergebnis konnte in Ansätzen auch für die Bindungsstelle Thr³⁰⁸ an Akt nachgewiesen werden. Die Zugabe von 5 μM ADP erbrachte eine

signifikante Aktivierung gegenüber unstimulierten Proben. Die Erhöhung der ADP-Konzentration auf 10µM drückte sich hingegen nicht in einer signifikanten Steigerung aus ($p=0.19$). Auffällig war hier bereits, dass für Thr³⁰⁸ nicht nur die Konzentrationsabhängigkeit unter Signifikanzniveau blieb. Im Vergleich mit Ser⁴⁷³ fiel auch die absolute Phosphorylierung schwächer aus.

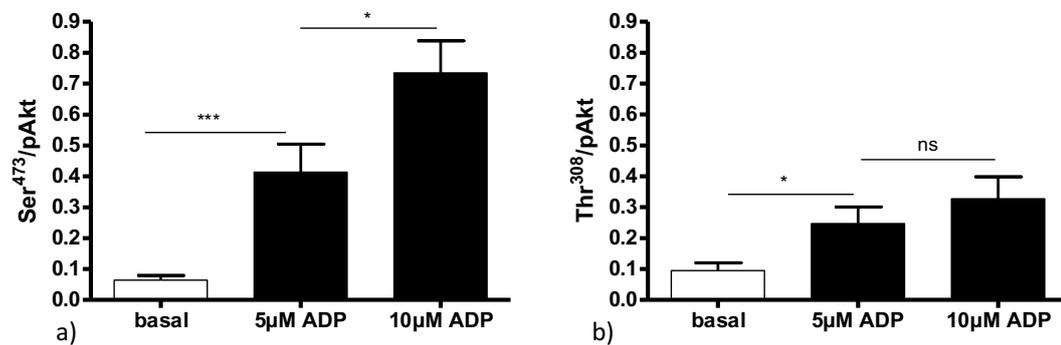


Abb. 10: Konzentrationsabhängige PI3-Kinase Aktivierung über P2Y₁₂; a) phosphoryliertes Ser⁴⁷³, b) phosphoryliertes Thr³⁰⁸, n=9, * $p<0.5$, *** $p<0.001$, ns nicht signifikant

3.2 Fractalkin induzierte PI3K Aktivierung

Um zu überprüfen, ob der FKN vermittelte Signalweg ähnlich wie der P2Y12 Signalweg ebenfalls über PI3K mediiert wird, wurden Proben stimuliert und Western blots zugeführt. In den Western blot Experimenten kamen Antikörper gegen phosphoryliertes Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ zum Einsatz. Das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung ist proportional zur Häufigkeit der Phosphorylierungen an diesen Stellen und somit zur Menge der gebundenen Antikörper und kann quantitativ ermittelt werden.

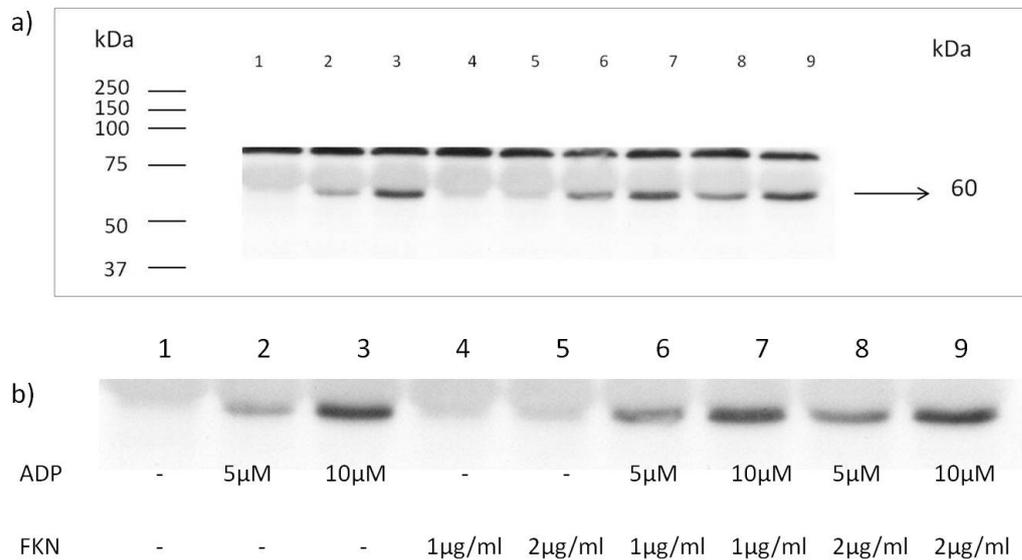


Abb. 11: **a)** Originalabbildung eines Western blot mit gewaschenen Thrombozyten, repräsentativ für n=10 in die Auswertung eingegangene blots. Links aufgetragen die *Bio-Rad*® Standard Skala zur Ermittlung der Proteinmasse; bei ca. 85kDa Bande mit unspezifischer Bindung; → Bande für das Signal des Antikörpers Phospho-Akt(Ser⁴⁷³) bei 60kDa; **b)** Vergrößerte Phospho-Akt(Ser⁴⁷³)-Bande mit Aufschlüsselung der Banden nach zugegebenen Agonisten der Thrombozytenaktivierung.

Um unterschiedliche Proteinmengen in den einzelnen Proben normalisieren zu können, wurde die ubiquitär vorkommende Akt(pan), die totale Menge endogener Akt-Proteine, verwendet (siehe Abb. 12). Diese Banden geben im Sinne einer Ladungskontrolle quantitativ den Proteingehalt der jeweiligen Proben wieder (siehe in Abb. 11).

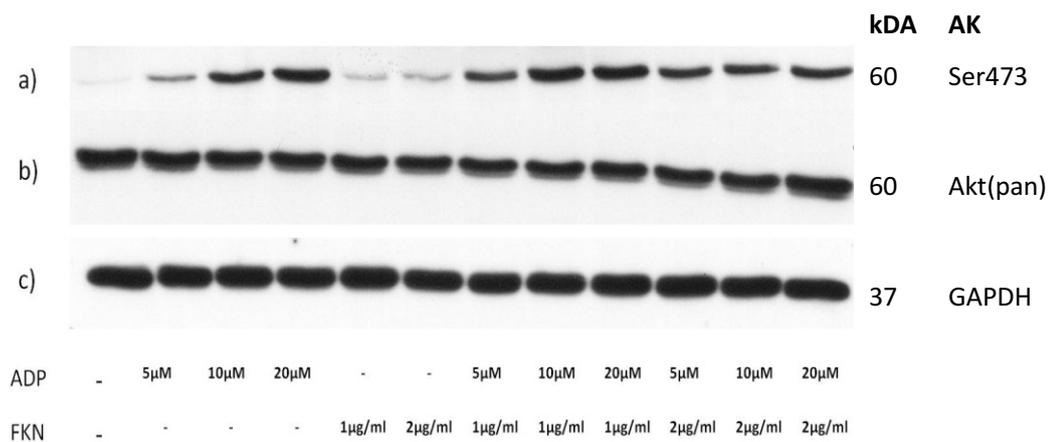


Abb. 12: Originalabbildungen des Western blots eines Probanden mit ausgewählten Banden; **a)** Bande für das Signal mit AK Phospho-Akt(Ser⁴⁷³) bei 60kDa; **b)** Bande für das Signal mit AK Akt(pan) bei 60kDa; **c)** Bande für das Signal mit AK GAPDH bei 37kDa

Zur Konzentrationsfindung von ADP wurden auch einige Western blots mit zusätzlichen Proben angefertigt (siehe Abb. 12). In diesen Versuchen war die Steigerung der ADP-Konzentration auf 20 μM ADP untersucht worden. Hier konnte in der statistischen Auswertung jedoch keine Auswirkung auf die Fractalkin-Wirkung im Sinne einer stärkeren additiven Aktivierung nachgewiesen werden. Daher wurden die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

3.2.1 ADP-unabhängige aktivierende Wirkung

Die Stimulation von gewaschenen humanen Thrombozyten mit dem Chemokin Fractalkin induzierte eine Aktivierung der PI3Kinase und führte zur Akt-Phosphorylierung. Diese wurde mittels der Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ indirekt gemessen und war gegenüber den Kontrollproben mit unstimulierten Thrombozyten signifikant erhöht. Bereits optisch ist anhand der Western blot das unterschiedliche Ausmaß der Aktivierung der PI3Kinase nach Stimulation mit ADP bzw. mit Fractalkin zu erahnen (Abb. 11 und Abb. 12).

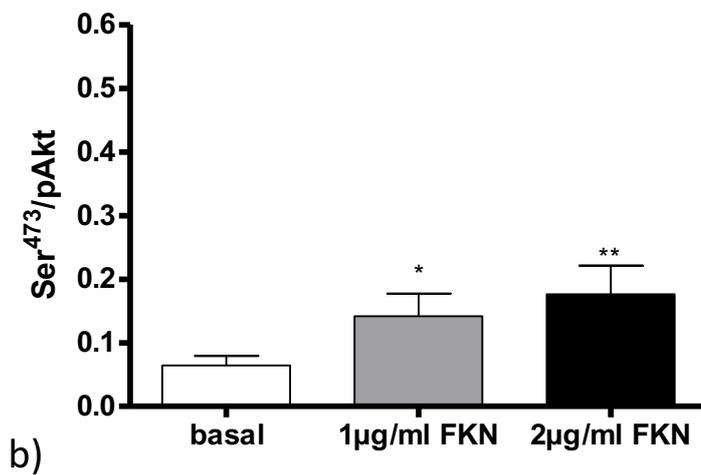
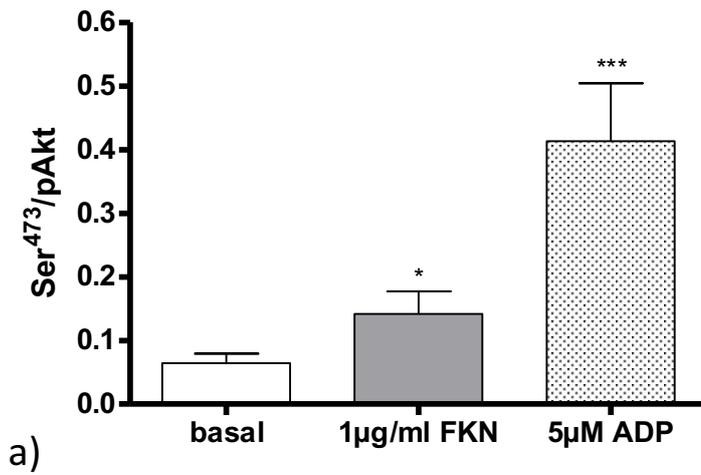


Abb. 13: Phosphorylierung an Ser⁴⁷³. Basal entspricht unstimulierten und somit nicht aktivierten Thrombozyten. **a)** Signifikanter Anstieg der Aktivierung nach Stimulation mit FKN (1µg/ml). Vergleiche dazu Stimulation mit ADP (5µM); n=9; **b)** Konzentrationsabhängig unterschiedlicher Anstieg der Aktivierung nach Stimulation mit Fractalkin (1µg/ml) und (2µg/ml); n=9; *p<0.05 vs. basal; **p<0.01 vs. basal; ***p<0.001 vs. basal

Die Zugabe von 1µg/ml Fractalkin zu primär nicht stimulierten Thrombozyten erbrachte eine signifikant erhöhte Rate der Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ ($p < 0.05$). Die Zugabe von 5µM ADP zeigte ein höheres Signifikanzniveau ($p < 0.001$) (siehe Abb. 13). Um die Fractalkinwirkung auf die bei ADP vorhandene Konzentrationsabhängigkeit zu testen, wurden die gewaschenen Thrombozyten mit Fractalkin unterschiedlicher Konzentrationen, 1µg/ml sowie 2µg/ml, versetzt. Die Erhöhung der Fractalkin-Konzentration auf 2µg/ml erbrachte eine signifikante Steigerung der Aktivierung ($p < 0.01$) verglichen mit dem basalen Wert. Der Vergleich 1µg/ml zu 2µg/ml blieb jedoch unter Signifikanzniveau ($p = 0.279$), sodass eine direkte Konzentrationsabhängigkeit der Fractalkinwirkung nicht nachgewiesen werden konnte.

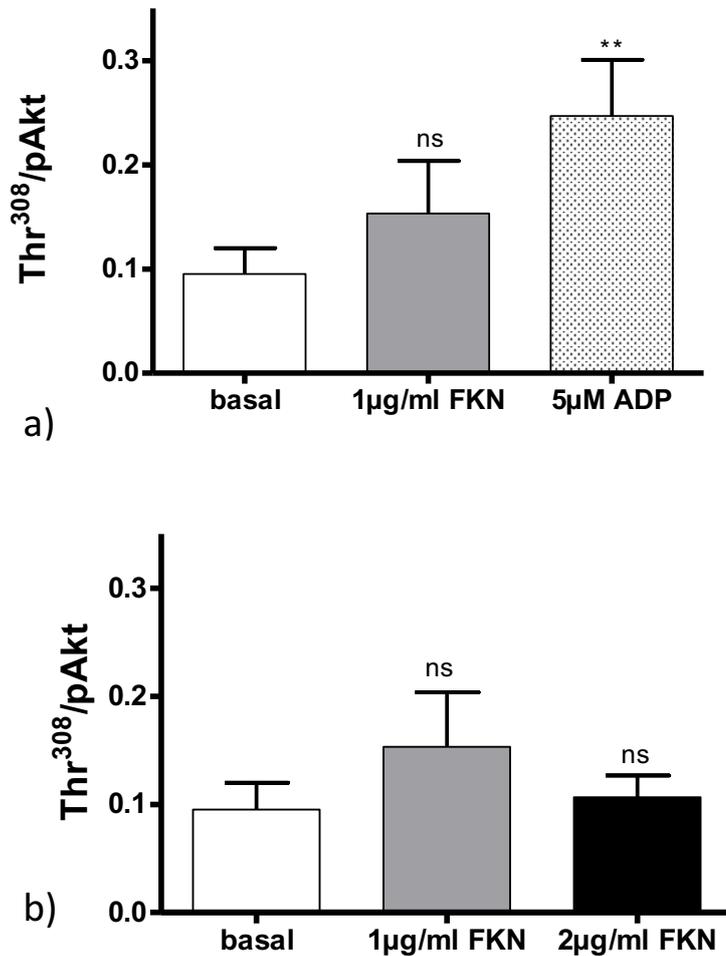


Abb. 14: **a)** Phosphorylierung an Thr³⁰⁸; **b)** Ergebnis für Konzentrationsabhängigkeit an Thr³⁰⁸, n=9 **p<0.01 vs. basal; ns nicht signifikant vs. basal

Die Inkubation der gewaschenen Thrombozyten weder mit 1µg/ml noch mit 2µg/ml Fractalkin erzielte gegenüber nicht stimulierten Proben eine signifikante Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ (Abb. 14). Auch nach Zugabe von 5µM ADP zu unstimulierten Plättchen fiel die Aktivierung sowohl absolut als auch auf Signifikanzniveau weniger deutlich aus als bei Zugabe des Antikörpers gegen phosphoryliertes Ser⁴⁷³ (p<0.01).

3.2.2 Potenzierung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung

Gewaschene Thrombozyten wurden nicht nur alleine mit Fractalkin, sondern nach Vorinkubation mit Fractalkin zusätzlich mit ADP stimuliert. Dies sollte die Frage klären, ob Fractalkin durch Bindung an seinen Rezeptor einen additiven Effekt zur ADP-induzierten Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors bewirkt. Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen wiesen darauf hin, dass beide Agonisten ihre Wirkung auf Thrombozyten zumindest zum Teil über den PI3K-Signalweg entfalten. Zugabe beider Substanzen zu gewaschenen Plättchen kann potentiell eine noch stärkere Aktivierung bewirken. Daher wurden für diese Versuche die Thrombozyten nacheinander zunächst mit Fractalkin, dann mit ADP versetzt.

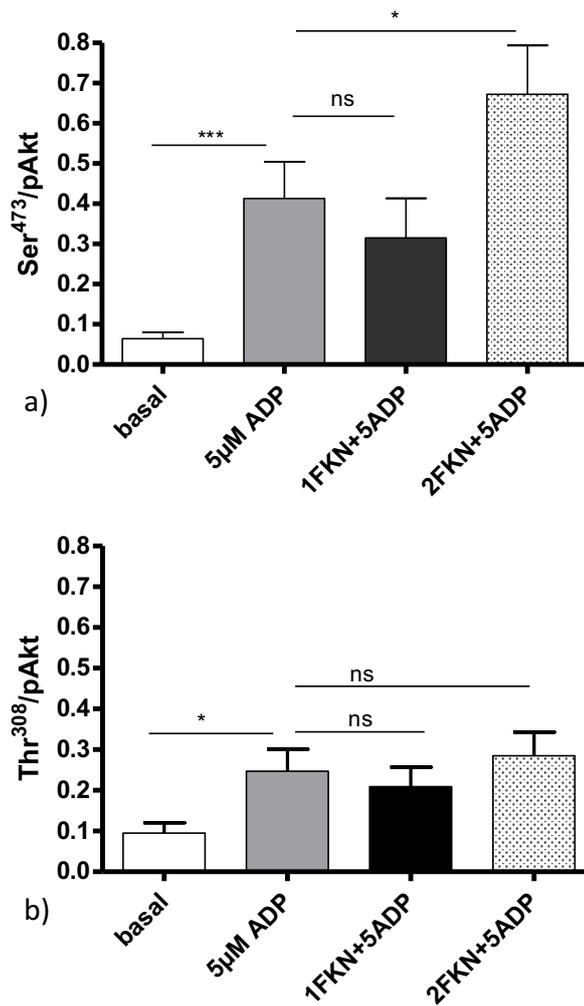


Abb. 15: Potenzierung der ADP-induzierten PI3-Kinase Aktivierung nach Vorinkubation mit Fractalkin; n=9, ***p<0.001, *p<0.05, ns= nicht signifikant **a)** an Ser⁴⁷³; **b)** an Thr³⁰⁸

Verglichen mit der alleinigen Wirkung von ADP wird die Aktivierung der Plättchen durch Vorinkubation mit Fractalkin gesteigert. Bei Zugabe von 5µM ADP zeigt sich, wie bereits beschrieben, eine signifikante Aktivierung gegenüber den unstimulierten Proben (p<0.001). Wurden die gewaschenen Thrombozyten vor der Zugabe von 5µM ADP mit 2µg/ml Fractalkin versetzt, nahm die absolute Aktivierung zu. Durch die Gabe beider Agonisten konnte gegenüber der alleinigen ADP-Wirkung eine signifikant stärkere Aktivierung (p<0.05) nachgewiesen werden.

Wiederum trat dieser Effekt nur für die Bindungsstelle Ser⁴⁷³ auf, an Thr³⁰⁸ war keine signifikante Potenzierung der ADP-Wirkung durch Fractalkin zu sehen.

3.3 Effekt von mfg-e8 auf PI3K-Signalweg

Aufgrund der Ergebnisse der Western blot-Versuche mit Fractalkin als schwach wirksamem Agonist am Thrombozyten kam die Frage auf, ob und wenn ja wie auch das Oponin mfg-e8 einen aktivierenden Einfluss ausüben kann. Die Vorgehensweise wurde ähnlich den Versuchen mit Fractalkin gewählt, gewaschene Thrombozyten wurden mit dem Glykoprotein versetzt. Die Konzentrationen von mfg-e8 wurden zu 250ng/ml und 500ng/ml gewählt. Außerdem wurde getestet, ob es eine potenzierende Wirkung von mfg-e8 zusammen mit ADP an Thrombozyten gibt, indem die Proben mit jeweils beiden Substanzen versetzt wurden.

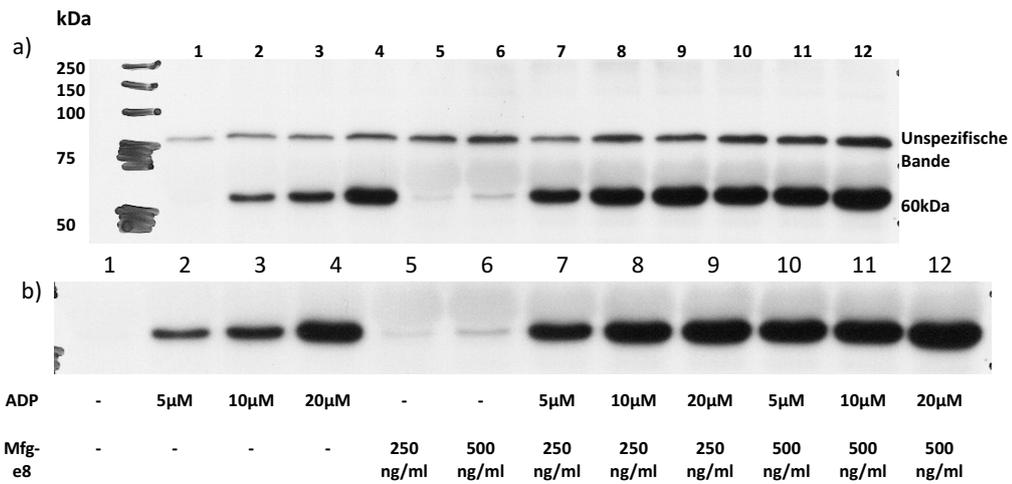


Abb. 16: **a)** Originalabbildung eines Western blot mit gewaschenen Thrombozyten, repräsentativ für n=4 in die Auswertung eingegangene blots. Links aufgetragen die *Bio-Rad*[®] Standard Skala zur Ermittlung der Proteinmasse in kDa. Bei ca. 60kDa deutlich sichtbare Bande für Phospho-Akt(Ser⁴⁷³); **b)** Vergrößerte Phospho-Akt(Ser⁴⁷³)-Bande mit Aufschlüsselung nach zugegebenen Agonisten und Konzentrationsangaben.

Es zeigte sich, dass ein von ADP unabhängiger, proaktivierender Effekt vorhanden ist. Sowohl die Stimulation mit 250ng/ml mfg ($p=0.01$), als auch mit 500ng/ml erbrachten signifikante Ergebnisse ($p=0.03$). Die niedrige Anzahl von n=4 Western blots limitiert hierbei die Aussagekraft. In Hinblick auf die Potenzierung der mfg-e8 Wirkung nach Vorinkubation mit ADP zeichnet sich ein Trend ab, der für einen additiven Effekt spricht, dieser ist jedoch noch nicht signifikant (siehe auch Abb. 17).

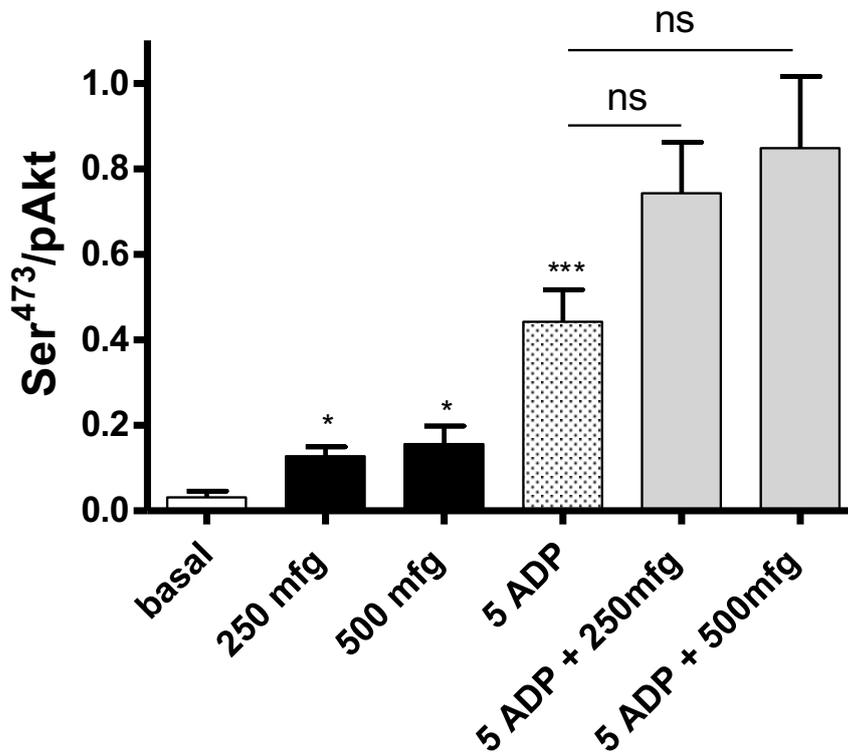


Abb. 17: Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ nach Stimulation mit ADP bzw. mfg-e8; Signifikante Aktivierung nach Stimulation mit mfg-e8 (250ng/ml und 500ng/ml). Vergleiche dazu Stimulation mit ADP (5µM) hochsignifikant; n=4; *p<0.05 vs. basal, ***p<0.001 vs. basal, ns nicht signifikant

3.4 Effekte auf Thrombozyten unter arteriellen Scherbedingungen

Für die Fragestellung, inwiefern mfg-e8 gewaschene humane Thrombozyten unter arteriellen Scherbedingungen beeinflusst, wurden mit mfg-e8 stimulierte oder unstimulierte Proben in einer Flusskammer als Suspension über Fibrinogenbeschichtete Slides perfundiert.

3.4.1 Unstimulierte oder mit Kollagen stimulierte Thrombozyten

Um zu zeigen, dass die Thrombozyten nicht an unbeschichteten Slides adhäreren, wurden zunächst Negativkontrollen angefertigt. Hierfür kamen Cover Slips zum Einsatz, an denen die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA geblockt worden waren.

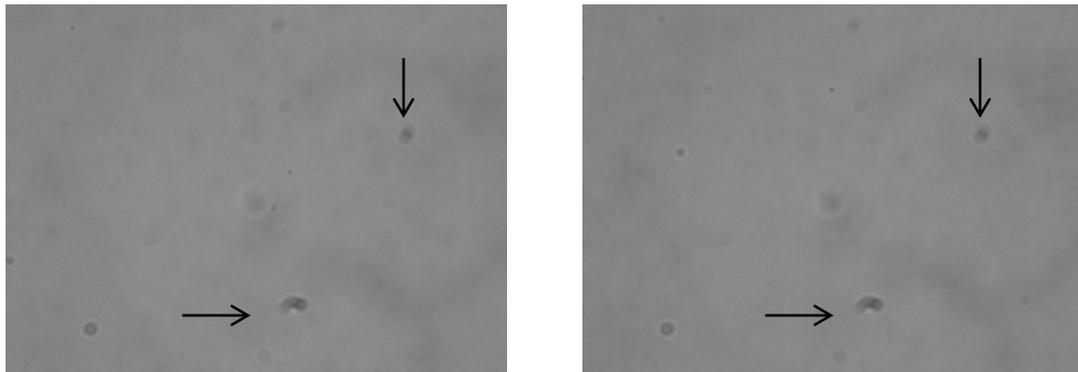


Abb. 18: Zwei repräsentative Aufnahmen für n=6; Flusskammerversuch mit BSA-geblockten Cover-Slips. Keine sichtbare Thrombozytenadhäsion im Blickfeld; → deutet auf Artefakte durch die Einstellung des Mikroskops, identisches Vorkommen auf beiden Bildern; Originalvergrößerung $\times 40$

An diesen Negativproben war erwartungsgemäß keine signifikante Thrombozytenadhäsion festzustellen (siehe Abb. 18). An Cover-Slips, deren Oberfläche mit Fibrinogen beschichtet worden war, konnten hingegen adhärente Thrombozyten beobachtet werden, selbst ohne Zugabe von stimulierenden Agonisten wie Thrombin, Kollagen oder ADP (siehe Abb. 19).

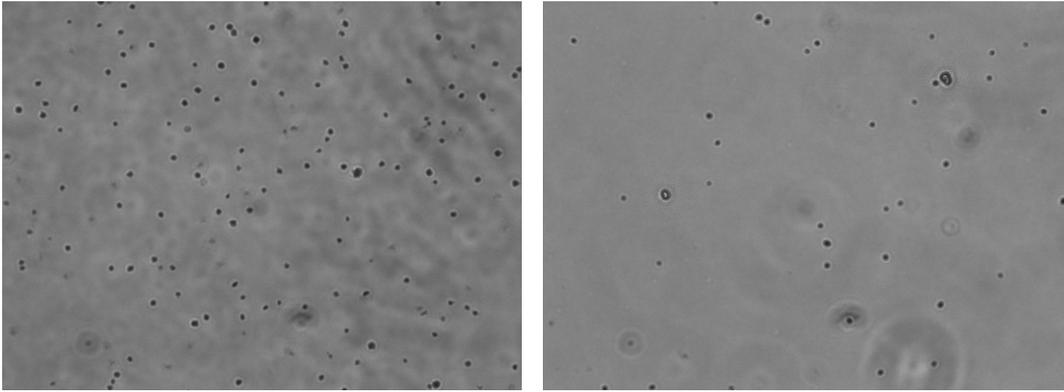


Abb. 19: Adhärenzversuch in der Flusskammer auf Cover Slips, beschichtet mit 10mg/ml Fbg; links stimulierte Thrombozyten (Kollagen [10 μ g/ml]); rechts nicht stimulierte Thrombozyten; Vergrößerung 40x

Bei Thrombozyten, die mit Kollagen vorstimuliert worden waren, war die Anzahl adhärenter Plättchen deutlich höher (Daten nicht gezeigt). Nach dem Spülen der Kammer mit PBS-Puffer wurden sie ausgezählt, zehn Versuchsdurchläufe wurden in die Auswertung einbezogen. Proben wurden verworfen, wenn eine Aggregatbildung der Plättchen in Suspension im Sinne einer Voraktivierung schon in der Perfusorspritze bedingt durch die Aufbereitung eingetreten war. Der Zahlenwert der unstimulierten Probe wurde als Referenzwert mit 100% festgesetzt, die absoluten Zahlen adhärenter Plättchen wurden relativ dazu in Prozent wiedergegeben.

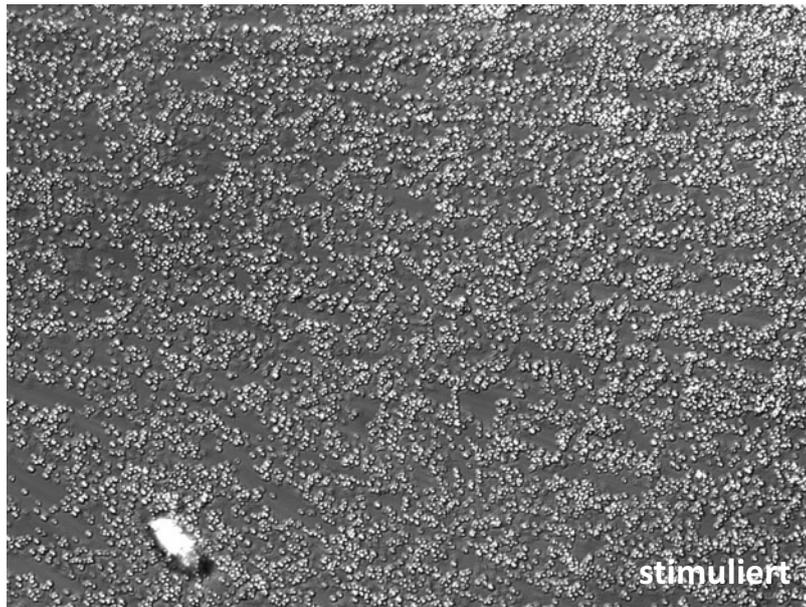


Abb. 20: Detailaufnahme von Adhärenzversuchen in der Flusskammer: mit Kollagen [10 μ g/ml] vorstimulierte Thrombozyten; Vergrößerung 20x

3.4.2 Mfg-e8 stimulierte Thrombozyten

In den Vorversuchen hatte sich die Flusskammer als geeignete Methode erwiesen, die Aktivierung der gewaschenen Plättchen durch bekannte Agonisten nachzuweisen. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Western blot Versuche wurde als nächster Schritt die Untersuchung der mfg-e8 Wirkung am Thrombozyten im arteriellen Gefäß gewählt. Verglichen wurde die Anzahl adhärenter Thrombozyten der mit mfg-e8 stimulierten Proben („mfg-e8“) mit denen ohne Zugabe von mfg-e8 („unstimuliert“).

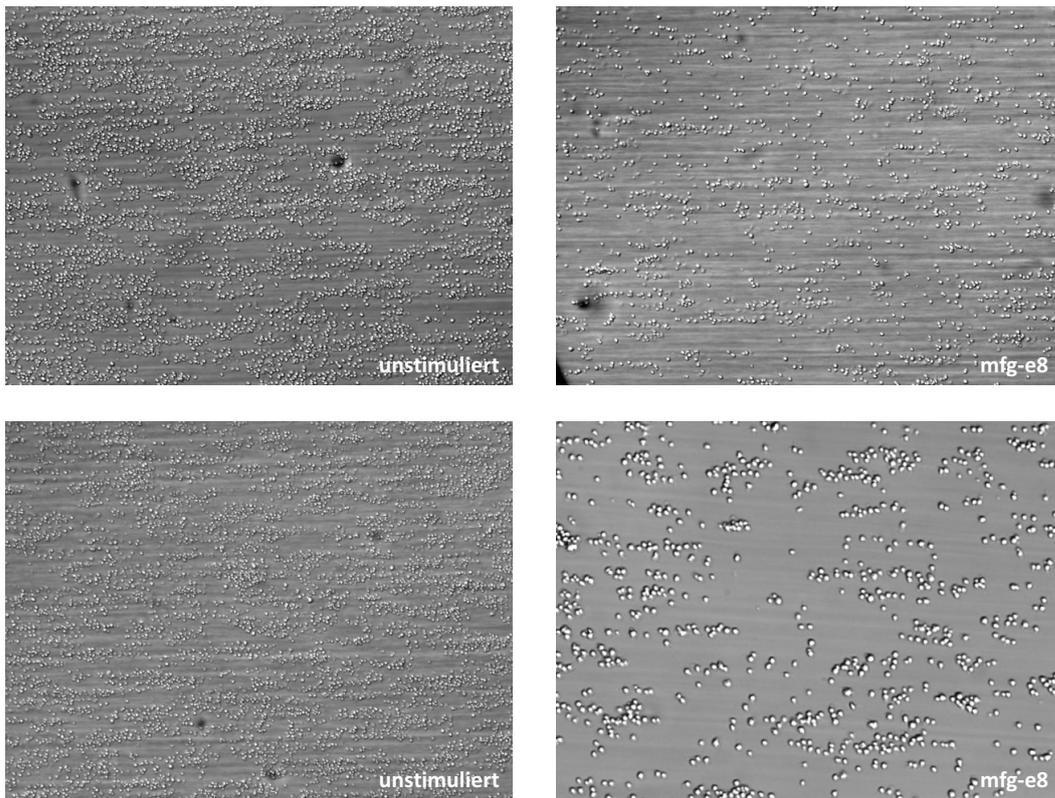


Abb. 21: Originalabbildungen aus Flusskammerversuchen mit arterieller Flussrate; linke Seite unstimulierte Proben mit adhärenen Thrombozyten, rechte Seite mit mfg-e8 stimulierte Proben; Vergrößerung 20x

Es zeigte sich unerwartet, dass signifikant weniger der mit mfg-e8 versetzten Thrombozyten unter arteriellen Flussparametern auf der Fibrinogen-beschichteten Oberfläche adhären (p=0.01). Der prozentuale Mittelwert für die unstimulierten Plättchen wurde als Referenz gesetzt und betrug 100% (mean \pm SEM = 100.0 \pm 0.2108), der prozentuale Mittelwert der adhärenen Thrombozyten aus den mfg-e8 Proben war 70,5% (mean \pm SEM = 70.52 \pm 10.24).

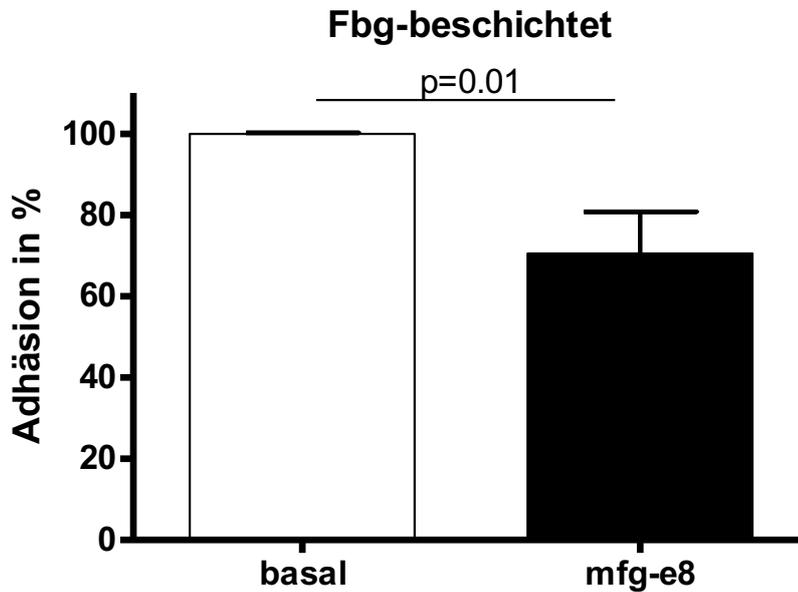


Abb. 22: Signifikante Abnahme der Adhäsion gewaschener Thrombozyten auf einer Fibrinogenbeschichteten Oberfläche [10mg/ml]; Zugabe von mfg-e8 gegenüber unstimulierten Thrombozyten; Adhäsion basal entspricht 100%; n=10; p=0.01

3.5 Effekte von mfg-e8 auf die GPIIb/IIIa Aktivierung

3.5.1 Aktivierung nicht vorstimulierter Thrombozyten

Auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten können vorhandene Bindungsstellen für den Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa mittels FACS®-Analyse dargestellt werden. Der Rezeptor erfährt durch Aktivierung des Thrombozyten eine Konformationsänderung und geht damit in seinen aktivierten Zustand über. Vorzugsweise wird zur Detektion dieser Zustandsänderung ein PAC-1 Antikörper eingesetzt, der an das Integrin GPIIb/IIIa erst bindet, wenn dieses im aktivierten Zustand vorliegt. Je stärker die Thrombozyten aktiviert werden, desto mehr aktivierte Bindestellen stehen zur Verfügung. Mittels Durchflusszytometrie wurden diese sichtbar gemacht.

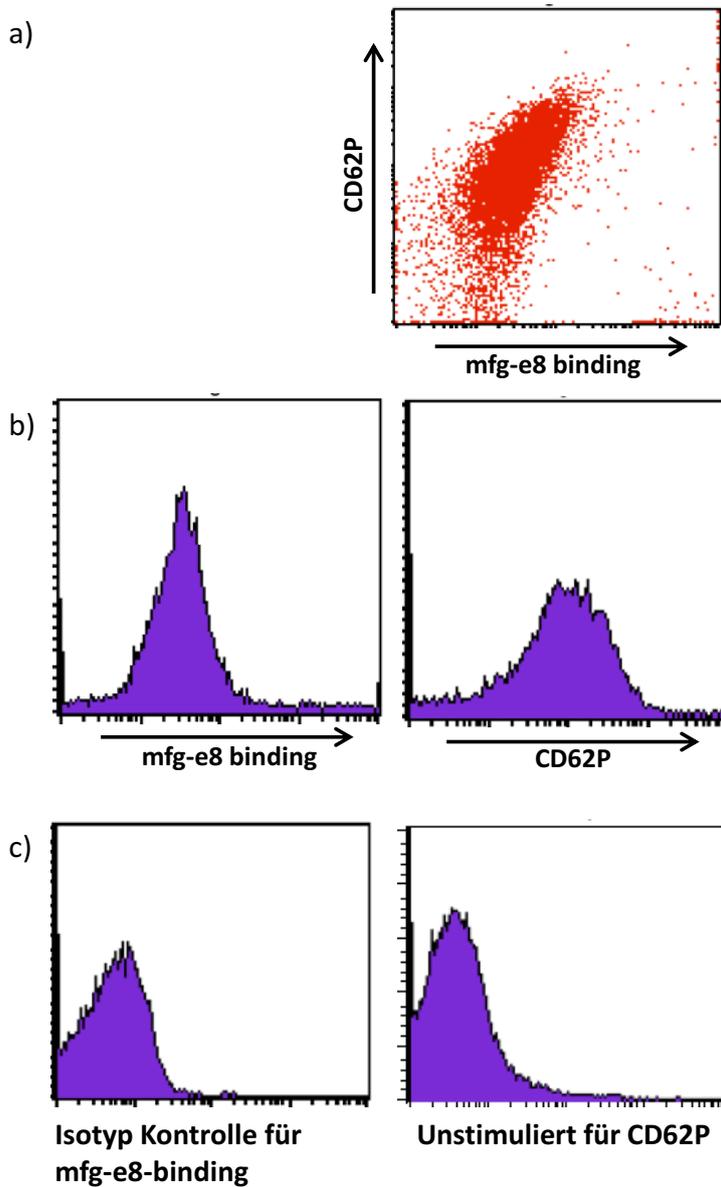


Abb. 23: Originalabbildungen der FACS®-Analysen von mit mfg-e8 [10µg/ml] stimulierten Thrombozytenproben a) Darstellung der Interaktion von mfg mit Thrombozyten: Detektion von mfg, welches mit einem His-Tag zur Bindung des Antikörpers versehen ist und damit verbundene gesteigerte Thrombozytenaktivierung, sichtbar durch eine gesteigerte P-Selectin-Expression; b) linkes Bild stellt die mfg-e8 Bindung dar, rechtes Bild die Fluoreszenzintensität der aktivierten Thrombozyten c) links Isotypenkontrolle zur Darstellung der Hintergrundbindung, rechts unstimulierte Thrombozyten zum Vergleich der P-Selectin-Bindung gegenüber stimulierten Plättchen.

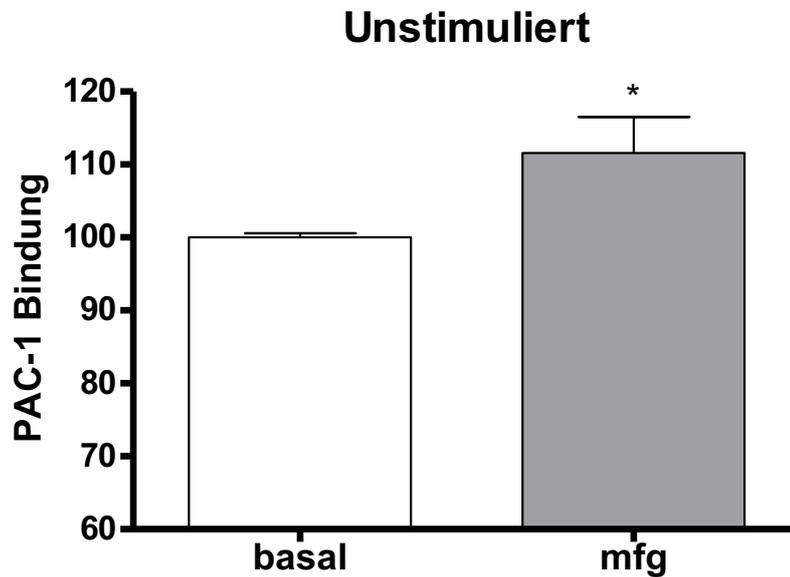


Abb. 24: PAC-1 Bindung an primär unstimulierten Thrombozyten, PAC-1 Bindung basal = 100%; nach Zugabe von mfg-e8 signifikanter Anstieg der PAC-1 Bindung * $p < 0.05$ vs. ohne mfg-e8

An den primär nicht stimulierten Thrombozyten zeigt sich eine Zunahme der PAC-1-Bindung von 100% (100.0 ± 0.577 SEM) auf 111% (111.6 ± 4.93 SEM) nach Stimulation mit mfg-e8 ($p < 0.05$).

3.5.2 Aktivierung ADP-vorstimulierter Thrombozyten

Für die folgenden Versuche wurden die Bindungsstellen nicht nur der unstimulierten Thrombozyten gemessen, sondern auch im Vergleich mit ADP vorstimulierten Plättchen. Der Zusatz von mfg-e8 zu den Proben bewirkte eine Abnahme von 100% (100.0 ± 0.577 SEM) auf 84% (84.06 ± 2.88 SEM) PAC-1-Bindung ($p < 0.001$).

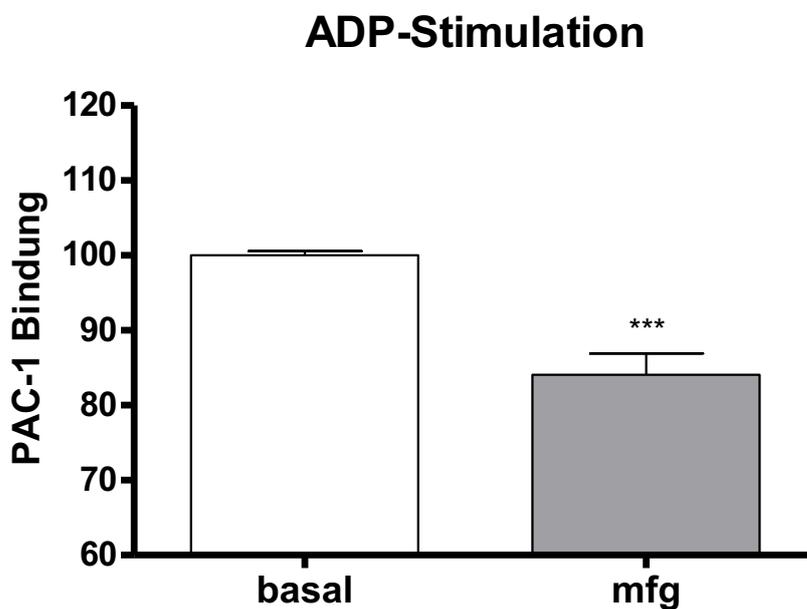


Abb. 25: Abnahme der PAC-1-Bindung nach ADP Stimulation und zusätzlicher Inkubation mit mfg-e8; *** $p < 0.001$ vs. ohne mfg-e8

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den intrazellulären Signalweg des Chemokins Fractalkin an humanen Thrombozyten. Aufbauend darauf sollte aufgezeigt werden, ob der thrombozytäre ADP-Rezeptor P2Y₁₂ und der Rezeptor für Fractalkin, CX₃CR1, eine ähnliche intrazelluläre G-Protein-Kopplung und Signalkaskade aufweisen. Um eine proaktivierende Wirkung des Chemokins nachzuweisen, wurde mittels Western blot insbesondere untersucht, ob es zu einer Aktivierung der PI3K kommt. Des Weiteren beschäftigt sich die Arbeit mit der Interaktion von mfg-e8 und Thrombozyten. Nach Zugabe des Proteins zu gewaschenen Thrombozyten wurden Western blots angefertigt. Die Aktivierung des GPIIb/IIIa durch mfg-e8 wurde in der Durchflusszytometrie untersucht. Inwiefern mfg-e8 das Verhalten der Blutplättchen unter arteriellen Flussbedingungen beeinflusst, wurde in der Flusskammer studiert.

Das Chemokin Fractalkin bindet an einen einzelnen, für CX₃CL1 spezifischen Rezeptor, CX₃CR1. Es handelt sich hierbei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit einer inhibitorischen Untereinheit (G_i)^[40]. Die Bindung des Liganden Fractalkin an CX₃CR1 führt zur Aktivierung des Rezeptors und auf der zytoplasmatischen Seite kommt es zur Abspaltung des βγ-Komplexes von der α_i-Untereinheit. Die Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen bereits zeigen, dass die Fractalkin-induzierte Aktivierung der α_i-Untereinheit zur Hemmung der Adenylatzyklase im Thrombozyten führt^[42]. Die zytosolische cAMP-Konzentration fällt ab, wodurch eine geringere Aktivierung der PKA resultiert. Folge ist eine verminderte Phosphorylierung von VASP (*Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein*). Die phosphorylierte Form dieses Proteins bewirkt eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung^[65]. Fractalkin induziert über diese Signalkaskade eine Inhibition der Thrombozytenhemmung, was zu einer gesteigerten Aggregabilität und Sekretion von weiteren Agonisten führt (siehe auch Abb. 26). Die Vorgänge, die am Thrombozyten zur Aktivierung und Aggregation

führen, sind komplex. Eine wichtige Rolle spielen die ADP-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ auf der Oberfläche der Thrombozyten, wobei letzterem eine Schlüsselrolle zukommt^[66]. Der Rezeptor für Fractalkin, CX₃CR1, gleicht dem ADP-Rezeptor in Struktur und intrazellulärer Kopplung. Neben der anti-inhibitorischen ist jedoch auch eine pro-aktivierende Wirkungsweise für die Signalübertragung durch den P2Y₁₂-Rezeptor beschrieben: Vermittelt über die βγ-Untereinheit des G-Proteins kommt es zur PI3-Kinase Aktivierung und zur Akt-Phosphorylierung^[67]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fractalkin über den Fractalkinrezeptor an humanen Thrombozyten die PI3K aktiviert. Nach Zugabe von Fractalkin zu gewaschenen Thrombozyten wurde gegenüber unstimulierten Proben eine signifikante Akt-Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ im Western blot beobachtet. Dieser Effekt war überdies unabhängig von einer ADP-Zugabe. Die G_{βγ}-Untereinheit ist demnach wie beim ADP-induzierten Signaling an der Signalübertragung durch Fractalkin beteiligt.

Zur vollen Enzymaktivierung der Proteinkinase B wird eine Aktivierung an Thr³⁰⁸ und an Ser⁴⁷³ postuliert^[67]. Demgegenüber konnte in den Versuchsreihen für diese Arbeit eine signifikante Akt-Phosphorylierung nur an Ser⁴⁷³ nachvollzogen werden. Somit scheint die Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ die wichtigere für die Fractalkin-induzierte Akt-Aktivierung darzustellen. Ähnlich wurde dies durch O`Toole et al. für die durch Tumornekrosefaktor α (TNF-α) induzierte PI3K-Aktivierung an einer Fibrosarkom-Zelllinie beschrieben^[68]. Am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom hingegen geht die Akt-Phosphorylierung mit einer reinen Thr³⁰⁸-Phosphorylierung einher^[69].

Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten bekräftigen die vorliegenden Befunde, jedoch wurde bislang die Aktivierung des oben beschriebenen Signalweges an anderen Zelllinien beschrieben. So zeigte Lyons et. al *in vivo* und *in vitro* die zeitabhängige Phosphorylierung der Proteinkinase B nach Zugabe von Fractalkin zu Gliazellen^[70]. In einer anderen Studie konnte Hao et. al zeigen, dass Fractalkin über den PI3K/Akt-Signalweg Überaktivierung und Apoptose, ausgelöst durch hohe ATP-

Konzentrationen, abschwächt und so neuroprotektiv in Microglia wirkt^[71]. Auch in CX₃CR1-exprimierenden Zelllinien des humanen klarzelligen Nierenzellkarzinoms bewirkt die Stimulation mit Fractalkin eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs, letztlich führt dies zur Akt-Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸^[72]. Shulby et. al konnte auf humanen Prostatakarzinomzellen den Fractalkinrezeptor CX₃CR1 und die Induktion des PI3K/Akt-Signalwegs durch Fractalkin nachweisen^[73].

Der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ und der Fractalkinrezeptor CX₃CR1 weisen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Homologien auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine ähnliche intrathrombozytäre Kopplung der Signalwege besteht. Dies ist insbesondere von Interesse, wenn der P2Y₁₂-Rezeptor pharmakologisch blockiert sein soll. In diesem Fall könnte Fractalkin die Rezeptorblockade durch eine Aktivierung des G_{i1}-abhängigen Signalwegs umgehen und zu einer Thrombozytenaktivierung führen. Tatsächlich zeigt sich bei KHK-Patienten unter Clopidogreleinnahme, dass erhöhte Fractalkinspiegel im Plasma mit einem erhöhten Thrombozytenaggregationsindex (PRI) verbunden sind^[74]. Der PRI wird als Messinstrument zum klinischen Monitoring der Wirksamkeit von Thrombozytenaggregationshemmern eingesetzt^[65], ein erhöhter PRI korreliert mit einer weniger starken Plättchenhemmung.

Patienten mit KHK erhalten ADP-Rezeptorblocker wie Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor zumeist nach einer Koronarintervention bzw. zur Sekundärprophylaxe^[75]. Eine suffiziente Thrombozyteninhibition ist hier essentiell und eine abgeschwächte Clopidogrelwirkung kritisch, da sie das Risiko von Restenosen nach Koronarstentimplantation erhöht. Ein Viertel bis ein Drittel der Patienten, die Clopidogrel einnehmen, gelten als „*poor-responder*“. Sie haben ein erhöhtes Risiko für ein erneutes kardiales Ereignis oder Stentthrombosen^[76-78]. Dabei sind bislang nicht alle Ursachen für die abgeschwächte Clopidogrelwirkung bekannt^[76]. Davon betroffen sind insbesondere Patienten, die auch an typischen Begleiterkrankungen der koronaren Herzkrankheit, wie z.B. Diabetes mellitus, Herz-

oder Niereninsuffizienz leiden. Sowohl in experimentellen (Tier-)Modellen als auch im Serum von Patienten mit diesen Erkrankungen waren erhöhte Fractalkin-spiegel nachweisbar^[20, 79-81]. Lokal erhöhte Chemokin- und Fractalkinkonzentrationen finden sich im entzündlich veränderten und geschädigten Gefäßendothel sowie in atherosklerotisch veränderten Gefäßen und Plaques^[82, 83]. Neben der Expression in humanen atherosklerotischen Plaques^[84, 85] konnte Ikejama et al. erhöhte Serumfractalkinspiegel mit einem erhöhten Risiko für eine Ruptur der Plaque in Zusammenhang bringen^[86]. Andererseits wird in Mäusen mit Fractalkin-rezeptor-Knockout (CX₃CR1^{-/-}) eine signifikant schwächere Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen beobachtet^[87, 88]. Gleiches gilt für Fractalkin-defiziente Tiere, diese sind zudem weniger anfällig für Reperfusionsschäden nach zerebraler Ischämie^[89]. Sowohl systemische als auch lokal erhöhte Fractalkinkonzentration scheinen demnach zum Fortschreiten von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit beizutragen.

Zentrale Schritte der frühen Atheroskleroseentstehung sind die Einwanderung von Monozyten und Leukozyten an Orte endothelialer Dysfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass Fractalkin und sein Rezeptor CX₃CR1 eine wichtige Rolle bei der Monozytenadhäsion und -akkumulation in atherosklerotischen Plaques spielen^[40, 90]. Darüber hinaus bewirkt Fractalkin eine erleichterte Adhäsion und Migration von Leukozyten in geschädigtes Endothel^[33, 42].

Wir untersuchten parallel in unserer Arbeitsgruppe die Wirkungen des Glykoproteins mfg-e8. Leonardi-Essmann et al. wies für mfg-e8 und Fractalkin bereits einen direkten Zusammenhang nach: Auf Fractalkinstimulation hin wird in Mikroglia verstärkt mfg-e8 exprimiert^[49]. Dies bewirkt eine vermehrte Phagozytose apoptotischer Zellen, da mfg-e8 an diese mit Hilfe seiner RGD-Domäne bindet und so „markiert“. Mit seiner PS-Domäne bildet es eine Art Brücke zu Makrophagen und erleichtert die Phagozytose^[44]. Weiterhin ist bekannt, dass thrombozytäre Mikropartikel mfg-e8-vermittelt beseitigt werden^[91].

Angesichts dieser Vorbefunde sollte nun geklärt werden, ob hohe Fractalkinkonzentrationen im Gefäßsystem ebenfalls erhöhte mfg-e8-Konzentrationen bewirken und ob mfg-e8 mit Thrombozyten interagiert.

HAECs (*human arterial endothelial cells*) wurden mit Fractalkin in verschiedenen Konzentrationen über 24h inkubiert. Es zeigte sich eine erhöhte mfg-e8-Expression der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Daten der Arbeitsgruppe, nicht gezeigt). In weiteren *in vitro* Versuchen, sogenannten „static adhesion assays“^[92], konnte eine signifikant stärkere Thrombozytenadhäsion an mfg-e8 beschichteten Oberflächen gegenüber Kontrolloberflächen nachgewiesen werden.

Welche Rezeptoren könnten für diese Interaktion verantwortlich sein? Die Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel läuft unter arteriellen Scherbedingungen in mehreren Schritten und mit Hilfe verschiedener Rezeptoren ab. Vereinfacht kann man den Vorgang in drei Schritte aufteilen. Im ersten findet die Kontaktaufnahme des thrombozytären vWF-Rezeptors GPIb-V-IX mit kollagenimmobilisiertem vWF am Endothel statt^[9]. Die Stabilisierung im nächsten Schritt wird vor allem durch GPVI vermittelt. Für die feste Adhäsion sind schließlich Integrine, vorwiegend aktiviertes GPIIb/IIIa, verantwortlich^[93]. Unsere Hypothese lautete, dass mfg-e8 potentiell als Mediator zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen fungieren könnte: Thrombozyten besitzen RGD-Domänen in den Integrinen $\alpha_{IIb}\beta_3$ (*GPIIb/IIIa*) und $\alpha_v\beta_3$ (*Vitronektin-Rezeptor*). Eine weitere Bindungsmöglichkeit an die C-Domäne von mfg-e8 ist Phosphatidylserin, das auf diverse Stimuli hin, z.B. Thrombin oder Kollagen auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert wird^[94]. Shi et al. beschreibt über diese Domäne in Mäusen *in vivo* eine kompetitive Blockade der PS-Bindestellen an Thrombozyten, die die FXa- und Thrombinproduktion und somit die Hämostase hemmen^[95, 96].

Ob darüber hinaus über die RGD-Domäne von mfg-e8 eine Interaktion zu einer Thrombozytenstimulation führen kann, wurde unter anderem in Western blot und

durchflusszytometrischen Versuchen untersucht. Tatsächlich zeigte sich eine mfg-e8 induzierte Aktivierung (Akt-Phosphorylierung an Ser⁴⁷³, PAC-1-Bindung). Jinushi et al. wiesen bereits darauf hin, dass an Melanomzelllinien durch Zugabe eines mfg-e8 Antikörpers Integrin-vermittelt die Akt-Aktivierung abgeschwächt wird.

Jedoch bewirkte die Zugabe von mfg-e8 bei bereits vorstimulierten Thrombozyten eine Abnahme der PAC-1-Bindung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine kompetitive Inhibition der Ligandenbindungsstelle durch mfg-e8 am aktivierten GPIIb/IIIa sein. Dass von mfg-e8 eine Wirkung auf intrazelluläre Signalwege ausgehen kann, wurde auch in anderen Studien beschrieben^[43, 56]. Eine Wirkung auf Thrombozyten in einer ähnlichen Form kommt demnach, insbesondere in Hinblick auf ein mögliches Outside-in-signaling über GPIIb/IIIa^[97], durchaus in Betracht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Versuche in einer Flusskammer zur Simulation einer Situation im Gefäßendothel durchgeführt. Die Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen-beschichtete Oberflächen nahm dabei nach Stimulation mit mfg-e8 signifikant ab. Unter der Annahme einer RGD-vermittelten Interaktion zwischen Blutplättchen und dem Glykoprotein wäre der Befund mit einer Konkurrenzsituation an der Fibrinogenbindungsstelle vereinbar.

Letztendlich ist die Rolle von mfg-e8 am Gefäß bislang nur unzureichend erforscht. Brisette et. al. beschreibt eine Schlüsselrolle des Glykoproteins in der Freisetzung durch apoptotische Endothelzellen unter anderem bei Atherosklerose. Makrophagen werden demzufolge in anti-inflammatorische Zellen umprogrammiert und tragen so zur Zellhomöostase bei^[98]. Weiterhin scheint sich ein lokaler mfg-e8-Mangel im Rahmen der Atheroskleroseentstehung negativ auszuwirken. Ait-Oufella et. al. zeigten im Tiermodell, dass dies zu einer systemischen als auch Plaque-lokalisierten Akkumulation von Zelldebris führt^[99]. Die Arbeit von Dai et. al. bestätigt diese Ergebnisse, mfg-e8^{-/-}-Mäuse fielen durch vermehrte nekrotische

Plaques und eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen auf^[100]. Inwiefern diese Ergebnisse auf Menschen übertragbar sind – welche Bedeutung hat z.B. mfg-e8 im akuten Myokardinfarkt? – ist bislang unklar. Weiterhin stellt sich aufgrund der aktuellen Ergebnisse die Frage, welche Rolle mfg-e8 als Adhäsionsprotein in der frühen Atheroskleroseentstehung einnimmt.

Besteht *in vivo* tatsächlich eine vermehrte mfg-e8-Expression an Orten hoher Fractalkinkonzentration und wirkt sich diese in der Tat verstärkend auf die Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel aus?

Mit Fractalkin und mfg-e8 stehen zwei vermeintlich unscheinbare Substanzen im Fokus dieser Arbeit, die sowohl unabhängig voneinander, als auch in Interaktion miteinander interessante Ansatzpunkte zur weiteren Erforschung der frühen Atheroskleroseentwicklung bieten.

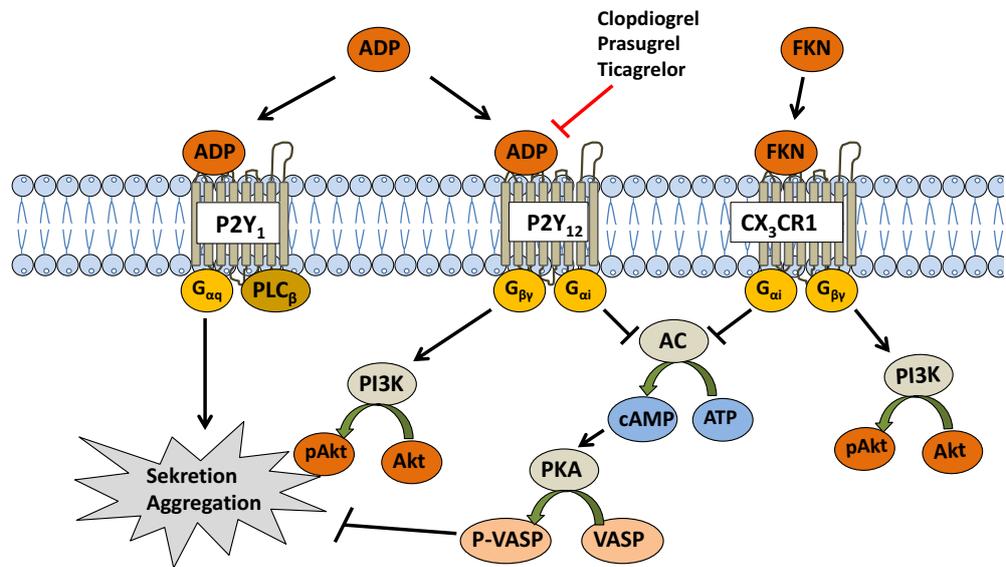


Abb. 26: Aktivierung der transmembranären G-Protein gekoppelten Rezeptoren, P2Y₁ und P2Y₁₂ durch ADP; Kopplung von P2Y₁ an G_{αq} bewirkt Sekretion und Aggregation der Plättchen über Phospholipase C (PLC_β) via Calcium-Efflux; P2Y₁₂ und CX₃CR1 hingegen sind an G_{αi} gekoppelt, dieses wirkt inhibitorisch auf die Adenylatzyklase. Die cAMP-Produktion wird abgeschwächt, die Aktivierung der Proteinkinase A unterbleibt. Weniger VASP wird phosphoryliert und bewirkt eine weniger starke Thrombozyteninhibition; die G_{βγ}-Untereinheit sorgt für eine Aktivierung der PI3K mit nachfolgender Phosphorylierung von Akt; Thienopyridine sind ADP-Rezeptorblocker und verhindern die proaktivierende und -aggregatorische Wirkung von ADP.

5. Zusammenfassung

Die genauen Mechanismen der frühen Atheroskleroseentstehung sind Thema intensiver Forschungsarbeit. Hierbei hat sich in den letzten Jahren eine zunehmend wichtige Rolle für Thrombozyten herauskristallisiert. Sie spielen nicht nur in der Hämostase, sondern auch bei immunologischen und entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Aktivierte Blutplättchen interagieren auf vielfältige Weise mit unterschiedlichen Zellen ihrer Umgebung – Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Leukozyten – wodurch es auf beiden Seiten zur Freisetzung von Botenstoffen und nachfolgend zur Aktivierung diverser Signalwege kommt. Auf der Thrombozytenoberfläche finden sich u.a. Rezeptoren für das Chemokin Fractalkin (CX3CL1). Dieses wurde bereits mit Thrombozytenaktivierung und Leukozytenadhäsion am Endothel in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der thrombozytäre ADP-Rezeptor P2Y₁₂ und der Rezeptor für Fractalkin, CX3CR1, eine ähnliche intrazelluläre G-Protein-Kopplung und Signalkaskade aufweisen, die in der Aktivierung der PI3K mündet. Der Effekt ist unabhängig von einer ADP-Zugabe und wird über G_{βγ} vermittelt, so dass hierüber eine Blockung des P2Y₁₂-Rezeptors durch z.B. Clopidogrel umgangen werden könnte. Des Weiteren ist bekannt, dass Fractalkin die Expression des Glykoproteins mfg-e8 beeinflusst. Inwiefern mfg-e8 einen Einfluss auf Thrombozyten hat, ist bislang nur unzureichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine proaktivierende Wirkung von mfg-e8 auf Thrombozyten nachgewiesen werden: Sowohl im Western blot (Aktivierung der PI3K) wie auch durchflusszytometrisch (Aktivierung des GPIIb/IIIa). Unter arteriellen Flussbedingungen schwächte mfg-e8 die Bindung von Thrombozyten an Fibrinogen-beschichtete Oberflächen ab. Welche Rezeptoren an dieser Interaktion beteiligt sind, ist derzeit nicht geklärt. Sowohl mfg-e8 als auch Fractalkin stellen interessante, thrombozytenaktivierenden Substanzen dar, deren Einfluss aufeinander und auf das Gefäßsystem weiterführender Untersuchung bedarf.

6. Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACS	Acute coronary syndrome, akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fbg	Fibrinogen
FITC	Fluoreszenz-Isothiocyanat
FKN	Fractalkin
FSC	Forward Scatter
FXa	Gerinnungsfaktor Xa
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _{βγ}	βγ-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GKR	G protein-coupled receptor kinase 2
GP	Glykoprotein
HAEC	Human Aortic Endothelial Cells
HRP	Horseradish Peroxidase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LY	LY294002
MDC	Macrophage-derived Chemokine
Mean	Mittelwert
Mfg-e8	Milk Fat Globule EGF Faktor 8, Lactadherin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

PCI	Percutaneous Coronary Intervention, Perkutane Koronarintervention
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PVDF	Polyvinyl-Difluorid
PRI	Platelet reactivity index
RCC	Renal Cell Carcinoma
RGD	Arg-Gly-Asp, Arginin-Glycin-Aspartat
SDS	Sodium-dodecylsulfate
SDF-1 α	Stroma cell-derived Factor 1 α
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes
Ser ⁴⁷³	Serin an Position 473
SMC	Smooth Muscle Cell
SSC	Side Scatter
Thr ³⁰⁸	Threonin an Position 308
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
Wm	Wortmannin

Einheiten

21G	21 Gauge, 21mm Außendurchmesser
°C	Grad Celsius
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
k	kilo
l	Liter
m	Meter
m	mili (10 ⁻³)
min	Minute
M	Molar (mol/Liter)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
U	Unit (Enzymeinheit, Umsatz von 1 μmol Substrat/min)
V	Volt

7. Literatur

1. Deaton, C., et al., *The global burden of cardiovascular disease*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2011. 10 Suppl 2: p. S5-13.
2. Libby, P., *Pathogenese, Prävention und Behandlung der Atherosklerose*, in *Harrisons Innere Medizin*, M. Dietel, Suttorp N., Zeitz M., Möckel M., Editor. 2012, ABW Wissenschaftsverlag. p. 2125-2133.
3. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
4. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. The Journal of experimental medicine, 2002. 196(7): p. 887-96.
5. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. 9(1): p. 61-7.
6. Li, Z., et al., *Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis*. Thromb Res, 2011. 127(3): p. 184-8.
7. von Hundelshausen, P. and C. Weber, *Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease*. Circ Res, 2007. 100(1): p. 27-40.
8. Hartwig, J. and J. Italiano, Jr., *The birth of the platelet*. J Thromb Haemost, 2003. 1(7): p. 1580-6.
9. Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. Thrombozyten und primäre Hämostase. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
10. Nuyttens, B.P., et al., *Platelet adhesion to collagen*. Thromb Res, 2011. 127 Suppl 2: p. S26-9.
11. Moroi, M., et al., *Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion*. Blood, 1996. 88(6): p. 2081-92.
12. Ruggeri, Z.M., *Platelet adhesion under flow*. Microcirculation, 2009. 16(1): p. 58-83.
13. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. Nat Med, 2011. 17(11): p. 1423-36.

14. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circulation research, 2006. 99(12): p. 1293-304.
15. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008. 28(3): p. s5-10.
16. Stellos, K., et al., *Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells*. Circulation, 2008. 117(2): p. 206-15.
17. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. J Exp Med, 2006. 203(5): p. 1221-33.
18. Weber, C., *Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime*. Circulation research, 2005. 96(6): p. 612-6.
19. Boucher, P. and M. Gotthardt, *LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(2): p. 55-60.
20. Schafer, A. and J. Bauersachs, *Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis*. Curr Vasc Pharmacol, 2008. 6(1): p. 52-60.
21. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. 357(24): p. 2482-94.
22. Achenbach, S., Szardien, S., Zeymer, U., Gielen, S., Hamm, C.W., *Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung*. Kardiologie 2012. 6: p. 283-301.
23. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annual review of immunology, 2000. 18: p. 593-620.
24. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Advances in immunology, 1994. 55: p. 97-179.
25. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. 90(3): p. 909-28.

26. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. The New England journal of medicine, 2005. 352(16): p. 1685-95.
27. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. The New England journal of medicine, 2006. 354(6): p. 610-21.
28. Charo, I.F. and M.B. Taubman, *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circulation research, 2004. 95(9): p. 858-66.
29. Zernecke, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber, *Chemokines in atherosclerosis: an update*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008. 28(11): p. 1897-908.
30. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. 12(2): p. 121-7.
31. Kohidai, L. *Struktur der Chemokinen*. 2008 2008-05-21 [cited 2013 09-03]; Available from: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chtx-Deu8.png>.
32. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. 385(6617): p. 640-4.
33. Schulz, C., et al., *Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets*. Circulation, 2007. 116(7): p. 764-73.
34. Harrison, J.K., et al., *Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart*. Journal of leukocyte biology, 1999. 66(6): p. 937-44.
35. Damas, J.K., et al., *Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005. 25(12): p. 2567-72.
36. Jones, B.A., M. Beamer, and S. Ahmed, *Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases*. Molecular interventions, 2010. 10(5): p. 263-70.
37. Umehara, H., et al., *Fractalkine and vascular injury*. Trends in immunology, 2001. 22(11): p. 602-7.

38. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. *The Journal of experimental medicine*, 1998. 188(8): p. 1413-9.
39. Goda, S., et al., *CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms*. *Journal of immunology*, 2000. 164(8): p. 4313-20.
40. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. *Cell*, 1997. 91(4): p. 521-30.
41. Umehara, H., et al., *Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2004. 24(1): p. 34-40.
42. Schafer, A., et al., *Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion*. *Blood*, 2004. 103(2): p. 407-12.
43. Raymond, A., M.A. Ensslin, and B.D. Shur, *SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions*. *Journal of cellular biochemistry*, 2009. 106(6): p. 957-66.
44. Hanayama, R., et al., *Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes*. *Nature*, 2002. 417(6885): p. 182-7.
45. Taylor, M.R., et al., *Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion*. *DNA and cell biology*, 1997. 16(7): p. 861-9.
46. Stubbs, J.D., et al., *cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. 87(21): p. 8417-21.
47. Andersen, M.H., et al., *Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains*. *Biochemistry*, 1997. 36(18): p. 5441-6.
48. Andersen, M.H., et al., *Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin*. *Biochemistry*, 2000. 39(20): p. 6200-6.

49. Leonardi-Essmann, F., et al., *Fractalkine-upregulated milk-fat globule EGF factor-8 protein in cultured rat microglia*. Journal of neuroimmunology, 2005. 160(1-2): p. 92-101.
50. Fens, M.H., et al., *Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells*. Blood, 2008. 111(9): p. 4542-50.
51. Atabai, K., et al., *Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages*. J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3713-22.
52. Kusunoki, R., et al., *Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation*. Digestion, 2012. 85(2): p. 103-7.
53. Aoki, N., et al., *Stage specific expression of milk fat globule membrane glycoproteins in mouse mammary gland: comparison of MFG-E8, butyrophilin, and CD36 with a major milk protein, beta-casein*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1334(2-3): p. 182-90.
54. Yamaguchi, H., et al., *Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus*. Eur J Immunol, 2010. 40(6): p. 1778-85.
55. Silvestre, J.S., et al., *Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization*. Nat Med, 2005. 11(5): p. 499-506.
56. Bu, H.F., et al., *Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium*. J Clin Invest, 2007. 117(12): p. 3673-83.
57. Ensslin, M.A. and B.D. Shur, *The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis*. Proc Natl AKHK Sci U S A, 2007. 104(8): p. 2715-20.
58. Wang, M., H.H. Wang, and E.G. Lakatta, *Milk fat globule epidermal growth factor VIII signaling in arterial wall remodeling*. Curr Vasc Pharmacol, 2013. 11(5): p. 768-76.
59. Hou, J., et al., *Lactadherin functions as a probe for phosphatidylserine exposure and as an anticoagulant in the study of stored platelets*. Vox sanguinis, 2011. 100(2): p. 187-95.

60. Miksa, M., et al., *Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages*. *Molecular medicine*, 2007. 13(11-12): p. 553-60.
61. Ardlie, N.G., et al., *Influence of apyrase on stability of suspensions of washed rabbit platelets*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine, 1971. 136(4): p. 1021-3.
62. Cazenave, J.P., et al., *Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood*. *Methods in molecular biology*, 2004. 272: p. 13-28.
63. Sack, U., A. Tárnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2006: Karger.
64. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007. 106: p. 19-39.
65. Geiger, J., et al., *Specific impairment of human platelet P2Y₁₂ ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999. 19(8): p. 2007-11.
66. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2006. 46: p. 277-300.
67. Kim, S., J. Jin, and S.P. Kunapuli, *Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. 279(6): p. 4186-95.
68. O'Toole, A., et al., *Tumour necrosis factor- α activation of protein kinase B in WEHI-164 cells is accompanied by increased phosphorylation of Ser473, but not Thr308*. *The Biochemical journal*, 2001. 359(Pt 1): p. 119-27.
69. Vincent, E.E., et al., *Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer*. *British journal of cancer*, 2011. 104(11): p. 1755-61.
70. Lyons, A., et al., *Fractalkine-induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attenuates microglial activation in vivo and in vitro*. *J Neurochem*, 2009. 110(5): p. 1547-56.

71. Hao, F., et al., *Chemokine Fractalkine Attenuates Overactivation and Apoptosis of BV-2 Microglial Cells Induced by Extracellular ATP*. Neurochemical Research, 2013. 38(5): p. 1002-1012.
72. Yao, X., et al., *Expression of CX3CR1 associates with cellular migration, metastasis, and prognosis in human clear cell renal cell carcinoma*. Urol Oncol, 2014. 32(2): p. 162-70.
73. Shulby, S.A., et al., *CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. 64(14): p. 4693-8.
74. Flierl, U., et al., *Fractalkine activates a signal transduction pathway similar to P2Y12 and is associated with impaired clopidogrel responsiveness*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012. 32(8): p. 1832-40.
75. StephanWindecker, et al., *2014 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2015. 68(2): p. 144.
76. Cattaneo, M., *Mechanisms of variability in antiplatelet agents response*. Thrombosis Research, 2012. 130, Supplement 1(0): p. S27-S28.
77. Gurbel, P.A., et al., *Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study*. J Am Coll Cardiol, 2005. 46(10): p. 1827-32.
78. Matetzky, S., et al., *Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2004. 109(25): p. 3171-5.
79. Andreas Schäfer, C.S., Ulrike Flierl, Christian Schulz, Meike Leutke, Steffen Massberg, *Increased Vascular Fractalkine Expression and Enhanced Platelet Reactivity to Fractalkine in Type-II Diabetic ZDF-Rats*. 2006, Atheroscl Thromb Vasc Biol. p. e-68.
80. Husberg, C., et al., *Cytokine expression profiling of the myocardium reveals a role for CX3CL1 (fractalkine) in heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2008. 45(2): p. 261-9.
81. Koziolok, M.J., et al., *The CX(3)C-chemokine fractalkine in kidney diseases*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2009. 9(10): p. 1215-28.

82. Schober, A., *Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2008. 28(11): p. 1950-9.
83. Kim, K.W., et al., *In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine*. *Blood*, 2011. 118(22): p. e156-67.
84. Lucas, A.D., et al., *Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1)*. *Circulation*, 2003. 108(20): p. 2498-504.
85. Wong, B.W., D. Wong, and B.M. McManus, *Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease*. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 2002. 11(6): p. 332-8.
86. Ikejima, H., et al., *Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris*. *Circ J*, 2010. 74(2): p. 337-45.
87. Combadiere, C., et al., *Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice*. *Circulation*, 2003. 107(7): p. 1009-16.
88. Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis*. *The Journal of clinical investigation*, 2003. 111(3): p. 333-40.
89. Soriano, S.G., et al., *Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury*. *J Neuroimmunol*, 2002. 125(1-2): p. 59-65.
90. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): p. 185-94.
91. Dasgupta, S.K., et al., *Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles*. *Blood*, 2009. 113(6): p. 1332-9.
92. Eriksson, A.C. and P.A. Whiss, *Characterization of static adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009. 20(3): p. 197-206.

93. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa*. J Exp Med, 1998. 187(3): p. 329-39.
94. Dachary-Prigent, J., et al., *Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups*. Blood, 1993. 81(10): p. 2554-65.
95. Shi, J. and G.E. Gilbert, *Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites*. Blood, 2003. 101(7): p. 2628-36.
96. Shi, J., et al., *Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2008. 6(7): p. 1167-74.
97. Shattil, S.J. and P.J. Newman, *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. Blood, 2004. 104(6): p. 1606-15.
98. Brissette, M.J., et al., *MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming*. PLoS One, 2012. 7(4): p. e36368.
99. Ait-Oufella, H., et al., *Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice*. Circulation, 2007. 115(16): p. 2168-77.
100. Dai, W., et al., *The roles of a novel anti-inflammatory factor, milk fat globule-epidermal growth factor 8, in patients with coronary atherosclerotic heart disease*. Atherosclerosis, 2014. 233(2): p. 661-5.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Kai Schuh für die Übernahme des Referats sehr herzlich bedanken, ebenso bei Fr. Prof. Dr. Stefanie Hahner für die Übernahme des Koreferats.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Schäfer für die Bereitstellung des Themas. Auf seine Unterstützung während der Arbeit und bei Fragen aller Art konnte ich stets zählen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Ulrike Flierl für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Sie stand mir ausdauernd mit Rat und Tat zur Seite, sowohl während des praktischen Teils im Labor als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung und führte mich damit in das wissenschaftliche Arbeiten ein.

Danke an das Team unserer Arbeitsgruppe: Dr. Daniela Fraccarollo und Dr. Paolo Galuppo für die fachlich stets herausragenden Gespräche und Hilfestellungen; Annette Berbner, Susanne Schraut und Gabriele Riehl für die Unterstützung während der Arbeit im Labor und für die herzliche und gute Stimmung. Der stete Erfahrungsaustausch und die gegenseitige Hilfe haben immer zur Motivation und schließlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

An dieser Stelle möchte ich meiner Mitdotorandin und Freundin Friederike Hitler danken. Die Höhen und Tiefen dieser Zeit waren zusammen einfach besser. Unsere Freundschaft kann ich nicht hoch genug einschätzen.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meiner Familie. Ihrer Unterstützung während des Studiums durfte ich mit stets sicher sein. Sie tragen daher maßgeblichen Anteil an dieser Arbeit.