

**Biochemische und Molekularbiologische Charakterisierung
der Wechselwirkungen zwischen Humanen Thrombozyten
und Endothelzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Ulrike Schwarz

aus

Siegen

Würzburg 2001

Eingereicht am: 23.02.2001

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Goebel

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Walter

Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums: 09.05.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 22. Februar 2001

Publikationen

Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind bereits veröffentlicht worden:

Schwarz, U. R., Geiger, J., Walter, U. und Eigenthaler, M. (1999). Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb. Haemost.* **82**: 1145-1152.

Schwarz, U. R., Kobsar, A. L., Kokschi, M., Walter, U. und Eigenthaler, M. (2000). Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* **60**(9): 1399-1407.

Schwarz, U. R., Walter U. und Eigenthaler M. (2001). Taming Platelets with Cyclic Nucleotides. (Review). *Biochem. Pharmacol.*: in press.

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Walter durchgeführt, dem ich sehr herzlich für seine hilfreiche und freundschaftliche Unterstützung sowie für seine zahlreichen Anregungen danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Martin Eigenthaler, der das Thema dieser Arbeit gestellt und meine Arbeit in hervorragender Weise und mit großem persönlichen Einsatz betreut hat. Ich danke ihm besonders für den Freiraum und die Eigenständigkeit, die er mir bei der Gestaltung meiner Arbeit gelassen hat, und daß er gleichzeitig jederzeit für fachliche Fragen, Gespräche und Diskussionen offen war und mir immer die notwendige Unterstützung gegeben hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Benz bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Anna Kobsar und Birgitta Schinke für die kompetente und hilfreiche Zusammenarbeit und Unterstützung. Dr. Jörg Geiger, Jochen Brich und Petra Hönig-Liedl danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Ticlopidin- und Clopidogrel-Studien.

Bei Martin, Birgitta, Anna, Katharina, Anna F., Stepan, Nina und Elke möchte ich mich für die nette und freundschaftliche Atmosphäre im Labor bedanken. Allen Mitarbeitern aus Bau 4 und besonders auch Elfi danke ich für ihre freundschaftliche und konstruktive Unterstützung. Auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts, die mich auf die ein oder andere Weise unterstützt haben, sei gedankt.

Außerdem möchte ich den Hebammen der Rotkreuzklinik und der Theresienklinik in Würzburg für die Versorgung mit Nabelschnüren danken.

Der Ernst und Hedda Wollheim-Stiftung sowie Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb danke ich für die Gewährung eines Stipendiums bzw. einer Projektförderung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGEN UND MABEINHEITEN	1
2	ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY	4
2.1	Zusammenfassung – Deutsch	4
2.2	Summary – English	5
3	EINLEITUNG	7
3.1	Einführung	7
3.2	Thrombozyten	8
3.2.1	<i>Aktivierung</i>	8
3.2.2	<i>Hemmung</i>	14
3.3	Endothelzellen	18
3.3.1	<i>Funktion</i>	18
3.3.2	<i>Dysfunktion</i>	19
3.4	Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten	20
3.4.1	<i>Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch endotheliale Faktoren</i>	20
3.4.2	<i>Induktion inflammatorischer Prozesse in Endothelzellen durch aktivierte Thrombozyten</i>	20
3.5	Zielsetzung	22
4	MATERIALIEN	23
4.1	Antikörper	23
4.2	Größenstandards	24
4.3	Enzyme	24
4.4	Nukleotide, Oligonukleotide, DNA	24
4.5	Kulturmedien und -zusätze	24
4.6	Chemikalien und Lösungen	25
4.7	Kits	26
4.8	Verbrauchsmaterialien	26
4.9	Geräte, Software	26
5	METHODEN	28
5.1	Präparation humaner Thrombozyten	28

5.2	Inkubationsversuche mit Thrombozyten	29
5.3	In vivo-Studien mit Ticlopidin und Clopidogrel	29
5.4	Durchflußzytometrie	29
5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	32
5.6	Isolierung und Kultivierung humaner Endothelzellen	34
5.7	Präparation der Thrombozytenproben für Koinkubationsversuche mit humanen Endothelzellen	36
5.8	Koinkubation von Endothelzellen und Thrombozyten	37
5.9	Isolierung von RNA aus Endothelzellen	37
5.10	Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array	38
5.11	Northern Blot	39
6	ERGEBNISSE	42
6.1	Durchflußzytometrische Analyse der VASP-Phosphorylierung	42
6.1.1	<i>Etablierung der Methode</i>	42
6.1.2	<i>Messung der durch Endothelzelloktoren induzierten VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten</i>	48
6.1.3	<i>Funktionelle Analyse von G_i- und G_s-gekoppelten Membranrezeptoren</i>	49
6.1.4	<i>Wirksamkeitsnachweis der thrombozytenhemmenden Medikamente Ticlopidin und Clopidogrel in vivo</i>	51
6.1.5	<i>Anwendung der Durchflußzytometrie für die Messung der Phosphorylierung der p42 MAPK in humanen Thrombozyten</i>	54
6.2	Aktivierung und Hemmung der thrombozytären MAPK-Signalwege	55
6.2.1	<i>Aktivierung der p42 MAPK und p38 MAPK durch Thrombozyten-aktivatoren</i>	55
6.2.2	<i>Hemmung der Phosphorylierung der p42 MAPK und p38 MAPK durch Vasodilatoren</i>	57
6.3	Aktivierung und Hemmung der thrombozytären CD40L- und CD62P-Expression	61
6.4	Auswirkungen aktivierter Thrombozyten auf Signalwege in humanen Endothelzellen	64
6.4.1	<i>Identifizierung der Endothelzellen</i>	64
6.4.2	<i>Aktivierung der Thrombozyten</i>	65
6.4.3	<i>Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Endothelzellen</i>	67
6.4.4	<i>Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array</i>	68

7	DISKUSSION	74
7.1	Durchflußzytometrische Analyse der VASP-Phosphorylierung	74
7.2	Aktivierung und Hemmung der thrombozytären MAPK-Signalwege	77
7.3	Aktivierung und Hemmung der thrombozytären CD40L- und CD62P-Expression	79
7.4	Beeinflussung von humanen Endothelzellen durch aktivierte Thrombozyten	81
8	LITERATUR	85

1 ABKÜRZUNGEN UND MAßEINHEITEN

Abkürzungen

ABP	<i>actin-binding protein</i>
AC	<i>adenylyl cyclase</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP-1	<i>activating protein-1</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i>
cAMP-PK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cBIMPS:	<i>5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol-3',5'-cyclic monophosphorothioate, Sp-isomer</i>
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine-3',5'-monophosphate</i>
cGMP-PK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cPLA ₂	<i>cytosolic phospholipase A₂</i>
CREB2	<i>cAMP response element-binding protein 2</i>
DAG	1,2-Diacylglycerol
dATP	desoxy-ATP
Dil	1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
Egr1	<i>early growth response protein 1</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	<i>guanylyl cyclase</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GP	Glycoprotein
G-Proteine	GTP-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp27	<i>heat shock protein 27</i>

Huvecs	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MLC	<i>myosin light chains</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
8-pCPT-cGMP	<i>8-(4-Chlorophenylthio)guanosine-3',5'-cyclic monophosphate</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PG-E ₁	Prostaglandin E ₁
PG-I ₂	Prostaglandin I ₂ (Prostazyklin)
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRP	plättchenreiches Plasma
PVDF	Polyvinylidendiflorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RPE	R-Phycoerythrin
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNP	<i>sodium nitroprusside</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
vWF	von Willebrand Faktor

Maßeinheiten

A	Ampere
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = $37 \cdot 10^9$ Bq)
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Meter
M	molar (Mol/Liter)
min	Minute
s	Sekunde
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit, Umsatz von $1 \mu\text{mol}$ Substrat / min)
V	Volt

Dezimale Teile und Vielfache

n	nano (10^{-9})
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
k	kilo (10^3)

2 ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY

2.1 Zusammenfassung – Deutsch

Der Blutkreislauf ist als wichtigstes Transportsystem im menschlichen Körper essentiell für die Versorgung der Gewebe und Organe mit Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen etc. Zwei Zelltypen, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines funktionell intakten Blutgefäßsystems spielen, sind Thrombozyten, die zentralen Mediatoren der Blutgerinnung, und Endothelzellen, welche die luminale Seite der Gefäßwände auskleiden. Diese beiden Zellen sind aber auch wesentlich an der Pathologie der Atherosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt. Durch direkte und indirekte Interaktionen beeinflussen sich diese beiden Zelltypen gegenseitig und regulieren ihre Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analysenmethode entwickelt, welche den Funktionszustand der Thrombozyten quantitativ erfaßt. Sowohl die Aktivierung als auch die Hemmung humaner Thrombozyten wird durch die Phosphorylierung spezifischer Signalproteine reguliert. Basierend auf der Verwendung phosphorylierungsspezifischer Antikörper und der Durchflußzytometrie wurde eine Methode etabliert, welche die Proteinphosphorylierung auf Einzelzellebene erfaßt, schnell quantifizierbare Ergebnisse liefert und für die Analyse im Vollblut geeignet ist. Da die Sekretion von Endothelfaktoren den Phosphorylierungszustand dieser Proteine in den Thrombozyten beeinflußt, kann die Methode auch dazu verwendet werden, indirekt Rückschlüsse auf den Funktionszustand der Endothelzellen zu gewinnen. In einer ersten klinischen Anwendung wurde die Methode eingesetzt, um den Therapieverlauf der antithrombotischen Medikamente Ticlopidin und Clopidogrel, welche gezielt die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung hemmen, zu verfolgen und das Antwortverhalten von Patienten auf diese Medikamente zu messen. Mehrere Personen, bei denen Ticlopidin und Clopidogrel keine Wirkung zeigten, wurden gefunden, ein Hinweis darauf, daß eine Resistenz gegen Thienopyridine vorkommt.

Es ist bekannt, daß Endothelfaktoren bestimmte Aspekte der Thrombozytenaktivierung hemmen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der p38 und p42 Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die im Verlauf der Thrombozytenaktivierung von zahlreichen Agonisten induziert wird, ebenfalls durch die endothelialen Vasodilatoren NO (Stickstoffmonoxid) und Prostaglandin gehemmt wurde. Außerdem hemmten diese

Substanzen die Translokation der inflammatorischen Moleküle P-Selektin und CD40 Ligand (CD40L) aus intrazellulären Speicherorganellen auf die Thrombozytenoberfläche. P-Selektin und CD40L werden auf aktivierten Thrombozyten exprimiert und sind direkt an der Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen beteiligt.

Um die Auswirkung von CD40L, P-Selektin und weiteren Faktoren aktivierter Thrombozyten auf humane Endothelzellen zu untersuchen, wurde mit Hilfe von cDNA-Arrays die differentielle Genexpression in Endothelzellen nach Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten analysiert. Neben einer bereits bekannten Hochregulierung von Faktoren, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wurde eine verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren (c-Jun, Egr1, CREB2), Wachstumsfaktoren (PDGF) sowie von Adhäsionsrezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine (Integrin α_v , Integrin β_1) gefunden. Diese Faktoren weisen darauf hin, daß aktivierte Thrombozyten die Migration und Proliferation der Endothelzellen anregen und damit die Wundheilung, aber auch pathophysiologische Prozesse wie die Ausbildung atherosklerotischer Plaques induzieren könnten.

2.2 Summary – English

The blood circulation is the human body's main transport system and is essential for supplying tissues and organs with oxygen, nutrients, hormones, etc. Blood platelets, the central mediators of coagulation, and endothelial cells which line the inner wall of blood vessels, play important roles in the maintenance of functionally intact blood vessels. On the other hand, these cells also participate in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular diseases. These two cell types mutually influence each other and regulate their activity via direct and indirect interactions. In this work, a method which allows quantitative analysis of platelet function was developed. Platelet activation and inhibition is regulated by phosphorylation of specific signaling proteins. Based on the use of phosphorylation-specific antibodies and flow cytometry, a method was established which measures protein phosphorylation in single cells, gives fast and quantitative results, and is also suitable for analysis of whole blood samples. Since secretion of endothelial cell factors influences the phosphorylation state of these proteins, the method may also be used to get indirect information about the functional integrity of endothelial cells. In a first clinical application, this method was used to monitor

the progression of a therapy with the anti-thrombotic drugs ticlopidine and clopidogrel which selectively inhibit ADP-induced platelet activation, and to determine the patients' responsiveness to these drugs. Several non-responders were identified, indicating the existence of a thienopyridine resistance.

Endothelial cell factors are known to inhibit different aspects of platelet activation. In this work, phosphorylation of platelet p38 and p42 mitogen-activated protein kinases, which is induced by various platelet activators, was found to be inhibited by the endothelium-derived vasodilators nitric oxide (NO) and prostacyclin. Furthermore, these endothelial cell factors inhibited translocation of the inflammatory molecules P-selectin and CD40 ligand (CD40L) from intracellular granules to the platelet surface membrane. P-selectin and CD40L are expressed on activated platelets and are directly involved in the interaction of platelets with leukocytes and endothelial cells.

To study effects of P-selectin, CD40L, and other parameters of activated platelets on human endothelial cells, cDNA Arrays were used to analyze differential gene expression in endothelial cells after coincubation with activated platelets. Besides the already known up-regulation of certain inflammatory factors, a number of additional genes which belong mainly to the group of transcription factors (c-Jun, Egr1, CREB2) and growth factors (PDGF) and of adhesion receptors for extracellular matrix proteins (integrin α_v , integrin β_1) was found to be up-regulated by activated platelets. Expression of these genes indicates that activated platelets may induce migration and proliferation of endothelial cells and thereby initiate wound healing, but may also have pathophysiological effects like the development of atherosclerotic plaques.

3 EINLEITUNG

3.1 Einführung

Der Blutkreislauf erfüllt wichtige funktionelle Aufgaben im menschlichen Körper. Er gewährleistet die Versorgung aller Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen, den Abtransport von Kohlendioxid oder anderen Stoffwechselprodukten und dient als Transportsystem beispielsweise für Hormone und Komponenten des immunologischen Abwehrsystems. Der Aufrechterhaltung eines intakten Blutgefäßsystems kommt daher eine entscheidende Bedeutung zu. Zwei Zelltypen, die hierbei eine wichtige Rolle spielen, sind Thrombozyten (Blutplättchen), die zentralen Mediatoren der Blutgerinnung, und Endothelzellen, welche die luminale Seite (Innenseite) der Gefäßwände auskleiden. Durch direkte und indirekte Interaktionen beeinflussen sich diese beiden Zelltypen gegenseitig und regulieren ihre Signalwege. Kommt es infolge einer Verletzung der Gefäßwand zur Blutung, adhären die Thrombozyten an die subendotheliale Matrix der geschädigten Gefäßwand, bilden ein Gerinnsel und führen so die Stillung der Blutung herbei. Hierbei werden die Thrombozyten von ihrem Ruhezustand in einen aktivierten Zustand überführt. Der physiologische Zustand der Thrombozyten im gesunden Organismus ist einer fein abgestimmten Regulation zwischen ruhender und aktivierter Form unterworfen. Diese Regulation ist durch die Interaktion der Thrombozyten mit der Gefäßwand gegeben. Endothelzellen sezernieren Substanzen, welche die Thrombozytenaktivierung hemmen, und bilden so eine antiadhäsive Oberfläche, die übermäßige Thrombozytenaktivierung und die Bildung von Thrombosen (Gefäßverschlüssen) verhindert. Ist dieses Gleichgewicht gestört, z.B. bei einer Endotheldysfunktion, kommt es zu pathophysiologischen Prozessen wie der Ausbildung atherosklerotischer Plaques und Thrombosen, die zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führen können. Atherosklerotische Lipideinlagerungen in der Gefäßwand bewirken eine verminderte Bildung von antithrombotischen Faktoren. Dadurch werden vermehrt Thrombozyten aktiviert, die an das Endothel adhären und im Gegenzug die Endothelzellen aktivieren und zur Expression inflammatorischer Faktoren anregen.

3.2 Thrombozyten

3.2.1 Aktivierung

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von zwei bis vier μm die kleinsten Zellen des Blutkreislaufes. Aufgrund ihrer typischen diskoiden Form, die sie im nichtaktivierten Zustand einnehmen, werden sie auch als Blutplättchen bezeichnet. Die physiologische Thrombozytenkonzentration beträgt 150000 bis 300000 pro μl Blut, mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit der Thrombozyten von etwa sieben bis zehn Tagen. Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus den Megakaryozyten im Knochenmark und werden in der Leber und der Milz abgebaut (Gawaz, 1999). Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und sind somit nicht zur Gentranskription fähig. RNA ist in geringen Mengen vorhanden, inwieweit physiologisch bedeutsame Translationsvorgänge ablaufen, ist jedoch nicht geklärt. Die Funktion der Thrombozyten liegt in der Blutgerinnung (Hämostase). Sie sorgen in einem gesunden Organismus dafür, daß Blutungen zum Stillstand kommen und Wunden verschlossen werden. Zahlreiche Krankheitsbilder mit abnormalem Blutungsverhalten sind auf Thrombozytenfunktionsstörungen oder unphysiologische Thrombozytenzahlen zurückzuführen. Um ein Blutgerinnsel zu bilden, müssen die Thrombozyten von ihrem ruhenden in einen aktivierten Zustand übergehen. Diesen Prozeß bezeichnet man als Thrombozytenaktivierung.

Die Thrombozytenaktivierung ist ein komplexer Vorgang, der zahlreiche Prozesse wie Aktivierung oder Hemmung biochemischer Signalwege, Neuorganisation des Zytoskeletts, Formveränderung, Ausschüttung intrazellulärer Speicherorganellen und Aktivierung von Oberflächenrezeptoren umfaßt. Diese führen zur Bindung von Fibrinogen an den aktivierten Fibrinogenrezeptor, Quervernetzung mit weiteren Thrombozyten über Fibrinogenbrücken und Bildung von Thrombozytenaggregaten. Thrombozyten werden durch Adhäsion an den von Willebrand Faktor (vWF), Collagen und andere Proteine der subendothelialen Matrix oder durch lösliche Agonisten wie Thrombin, Thromboxan A_2 (TxA_2) und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) aktiviert. Viele dieser Aktivatoren interagieren mit heptahelikalen Rezeptoren, die auf ihrer zytoplasmatischen Seite mit heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen (G-Proteinen) gekoppelt sind (Tabelle 3.1). Diese G-Proteine funktionieren als Vermittler, welche die Signale der aktivierten Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeben.

Tabelle 3.1: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Thrombozytenaktivierung (modifiziert nach (Offermanns, 2000))

Rezeptor	G-Protein
Thrombin-Rezeptor	G _i , G _q , G ₁₂ , G ₁₃
TxA ₂ -Rezeptor	G _q , G ₁₂ , G ₁₃
P2Y ₁ ADP-Rezeptor	G _q
P2Y ₁₂ (P2Y _{AC}) ADP-Rezeptor	G _i
α _{2A} Epinephrin-Rezeptor	G _i
Serotonin-Rezeptor	G _q

G-Proteine bestehen aus einer α-Untereinheit, die Guanin-Nukleotide bindet und hydrolisiert, sowie einer β- und einer γ-Untereinheit, die zusammen einen Komplex bilden. Im inaktiven Zustand bindet die α-Untereinheit GDP. Die Aktivierung des Rezeptors führt dazu, daß GDP durch GTP ersetzt wird, die α-Untereinheit eine Konformationsänderung erfährt und vom βγ-Komplex dissoziiert. Die α-Untereinheit und der βγ-Komplex können nun Effektormoleküle regulieren. Durch die GTPase-Aktivität der α-Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolisiert, die α-Untereinheit bindet wieder an den βγ-Komplex und bringt so das G-Protein zurück in den inaktiven Basalzustand (Offermanns, 2000).

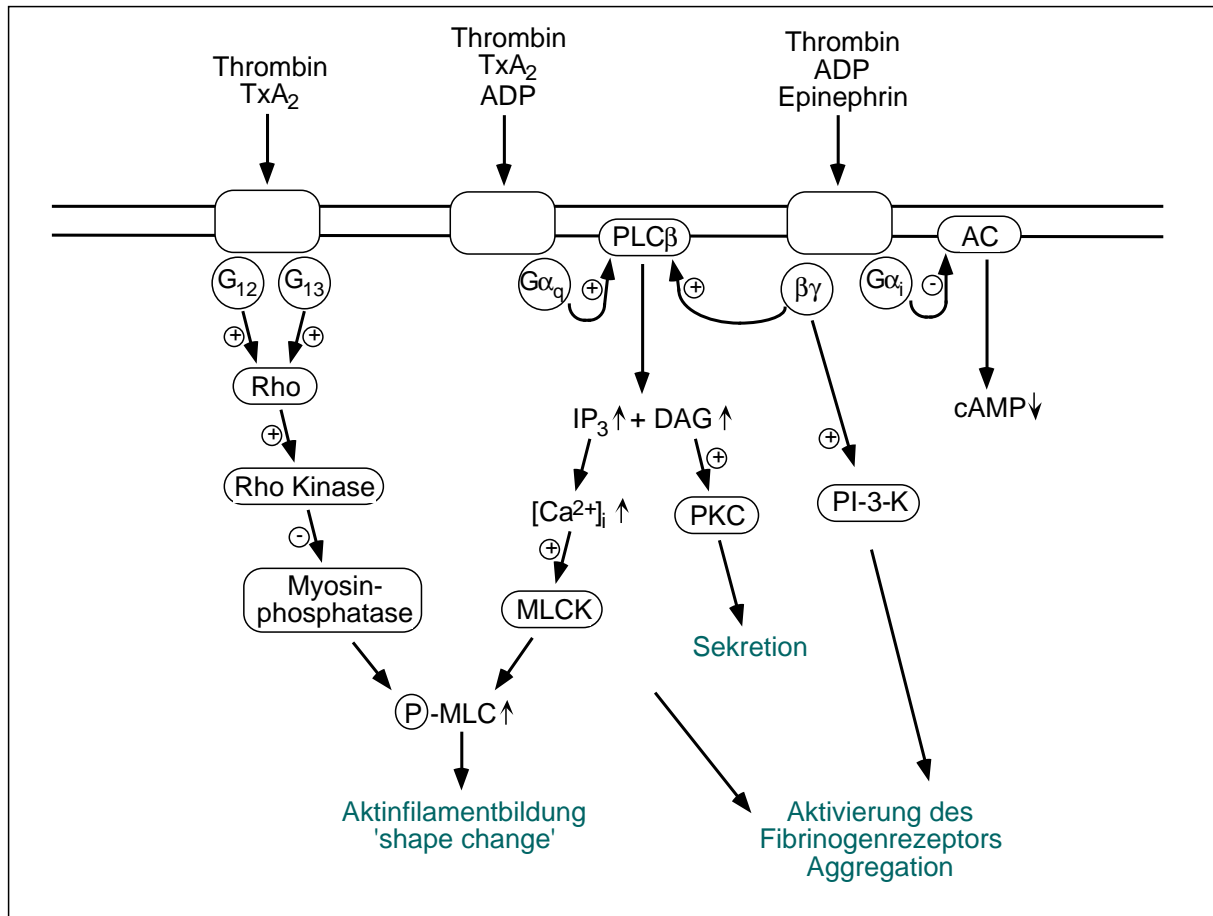


Abbildung 3.1: Die Rolle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Thrombozytenaktivierung.

Die verschiedenen G-Proteine regulieren unterschiedliche Signalwege in den Thrombozyten (Abbildung 3.1) (Offermanns, 2000; Brass *et al.*, 1997). $G\alpha_q$ aktiviert die β -Isoform der Phospholipase C ($PLC\beta$), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 induziert einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels (Rink und Sage, 1990), wodurch zahlreiche Ca^{2+} -abhängige Enzyme reguliert werden. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird beispielsweise die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige *myosin light chain kinase* (MLCK) aktiviert, die durch Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) eine Reorganisation des Zytoskeletts einleitet (Daniel *et al.*, 1984; Nachmias *et al.*, 1985). Diese führt zur Formveränderung (*shape change*) des Thrombozyten, d.h. das Blutplättchen nimmt eine mehr kugelige Gestalt an und bildet Pseudopodien. Aktivierung von G_{12} und G_{13} , die über den Rho/Rho-Kinase-Weg die Myosinphosphatase hemmen und so Ca^{2+} -unabhängig die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins verstärken, führt ebenfalls zur Formveränderung (Klages *et al.*, 1999). DAG, das zweite Produkt der PLC-Reaktion, aktiviert

die Proteinkinase C (PKC), die über Phosphorylierung der Substrate Pleckstrin und MARCKS zur Sekretion von intrazellulären Speicherorganellen (Granula) beiträgt (Rotondo *et al.*, 1997; Sloan und Haslam, 1997; Elzagallaai *et al.*, 2000). Bei der Granulasekretion werden vasoaktive und prokoagulatorische Substanzen wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), Ca^{2+} , ADP, Serotonin und Fibrinogen freigesetzt. Über die thrombozyteneigenen Rezeptoren verstärken diese den Aktivierungsprozeß und aktivieren außerdem benachbarte Thrombozyten und wirken auf die Endothelzellen. Durch die Sekretion kommt es außerdem zu einer Translokation der Transmembranproteine P-Selektin (CD62P) und CD40 Ligand (CD40L) sowie von zusätzlichen Fibrinogenrezeptoren auf die Zytoplasmamembran. Über P-Selektin und CD40L interagieren Thrombozyten direkt mit Membranrezeptoren auf Leukozyten und Endothelzellen und lösen dort inflammatorische Signale aus, so daß die Rolle der Thrombozyten nicht auf die Gerinnung beschränkt bleibt, sondern auch wesentlich zu inflammatorischen Prozessen beiträgt (Henn *et al.*, 1998).

Die Bindung von Fibrinogen an den Fibrinogenrezeptor, Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, ist von zentraler Bedeutung für die Thrombozytenaggregation (Egenthaler und Shattil, 1996). Sie ist abhängig vom Aktivierungszustand des Integrins, das während der Thrombozytenaktivierung durch Konformationsänderung und Bündelung mehrerer Integrine (*clustering*) in eine aktivierte Form überführt wird. Die Signale, die zur Aktivierung des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ führen, werden als *inside-out signaling* bezeichnet (Shattil, 1999). Wichtige Bestandteile sind die Aktinfilamentbildung und Umbildung des Zytoskeletts (Bennett *et al.*, 1999; Calderwood *et al.*, 2000), im Detail sind sie jedoch noch nicht geklärt. Die Aktivierung der $\text{G}\alpha_q$ -gesteuerten Signalwege ist notwendig für die Aktivierung des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und die Thrombozytenaggregation (Offermanns *et al.*, 1997), alleine jedoch nicht ausreichend. Erst die zusätzliche Aktivierung von G_i -gekoppelten Rezeptoren führt zur Aggregation (Jin und Kunapuli, 1998; Savi *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 1999). $\text{G}\alpha_i$ hemmt die Adenylylzyklase und reduziert so die intrazelluläre Konzentration des aggregationshemmenden Signalmoleküls cAMP. Dieser Effekt scheint jedoch nicht für die Aggregation notwendig zu sein, da ein Inhibitor der Adenylylzyklase in Thrombozyten, bei denen der G_q -Signalweg selektiv aktiviert war, keine Aggregation auslöste (Savi *et al.*, 1996b; Daniel *et al.*, 1999). Außerdem führte die gleichzeitige Aktivierung von PKC und eines G_i -gekoppelten Rezeptors auch in Gegenwart eines erhöhten cAMP-Spiegels zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (Riondino *et al.*, 2001). Es sind vermutlich die $\beta\gamma$ -Komplexe der G_i -Proteine, die über

Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) an der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors beteiligt sind (Zhang *et al.*, 1996; Dangelmaier *et al.*, 2001).

Die Tatsache, daß die Aktivierung von sowohl G_q - als auch G_i -vermittelten Signalwegen für die Aggregation notwendig sind, erklärt die starke aggregatorische Wirkung von Thrombin, dessen Rezeptoren mit beiden G-Proteinen verbunden sind. Thromboxan hingegen aktiviert nur G_q und G_{12}/G_{13} und ist für die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors auf die Sekretion von ADP aus den dichten Granula angewiesen (Paul *et al.*, 1999). Für ADP existieren auf humanen Thrombozyten drei verschiedene Rezeptoren (Abbildung 3.2): P2X, ein ligandengesteuerter Kationenkanal, der zum sofortigen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum führt, P2Y₁, der G_q aktiviert, sowie der G_i -gekoppelte P2Y₁₂ (P2Y_{AC}) ADP-Rezeptor (Daniel *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1998; Hollopeter *et al.*, 2001). Die Aktivierung beider G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist essentiell für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (Jin und Kunapuli, 1998). Ticlopidin und Clopidogrel, zwei Thienopyridinderivate, die in der antithrombotischen Therapie eingesetzt werden, hemmen die durch ADP ausgelöste Aggregation, indem sie selektiv den P2Y_{AC} ADP-Rezeptor hemmen (Defreyn *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1992; Geiger *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1999).

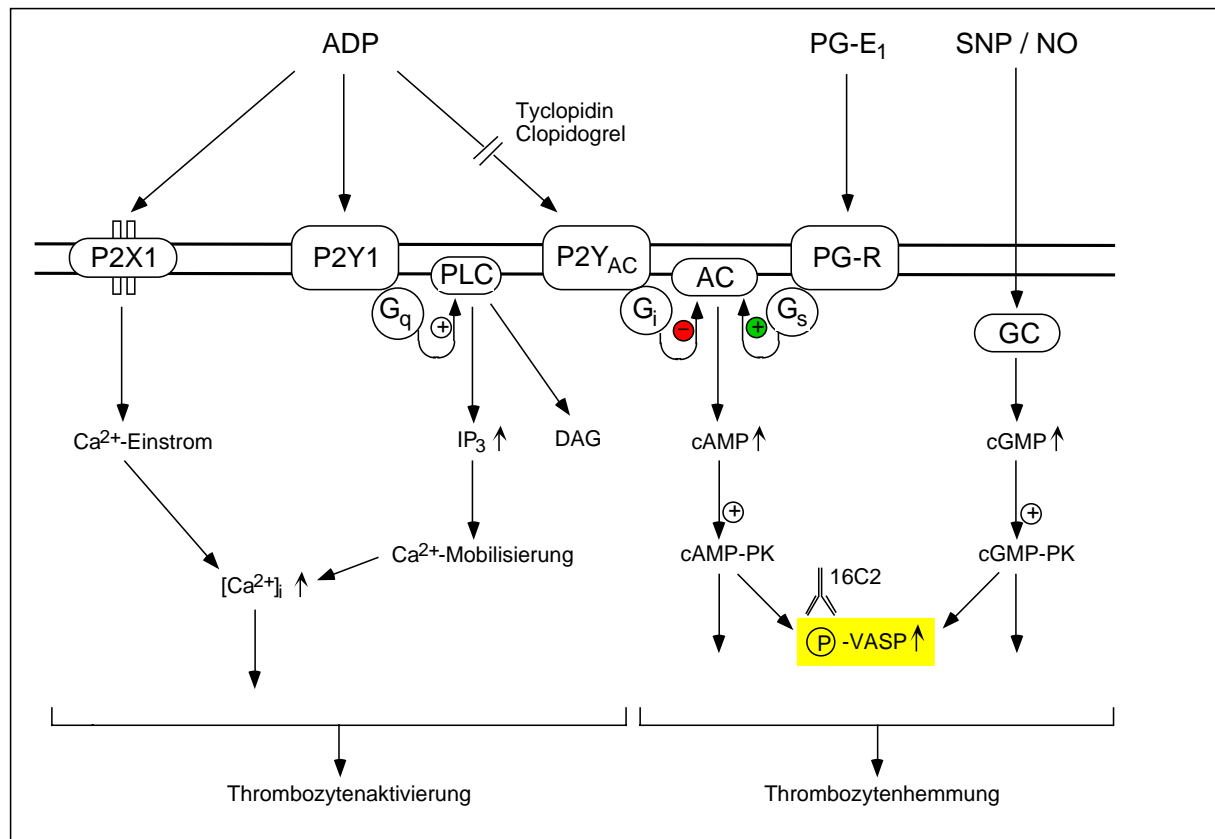


Abbildung 3.2: ADP-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten. Der P2Y_{AC} ADP-Rezeptor hemmt über G_i-Proteine die Adenylzyklase (AC) und reduziert dadurch den durch den Prostaglandin-Rezeptor vermittelten Anstieg der cAMP-Konzentration. Die antithrombotischen Medikamente Ticlopidin und Clopidogrel wirken gezielt auf den P2Y_{AC} ADP-Rezeptor.

Die Funktion der $\beta\gamma$ -Komplexe in Thrombozyten ist noch nicht sehr gut untersucht. Teilweise tragen sie auch zur Aktivierung der Phospholipase C β bei (Brass *et al.*, 1986). Parallelen zu anderen Zelltypen lassen vermuten, daß die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G_i-Proteine über die PI-3-Kinase die Ras/Raf-vermittelte Aktivierung der p42 mitogenaktivierten Proteinkinase (p42 MAPK) einleiten (Brass *et al.*, 1997). Während der Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer raschen und starken Aktivierung der p42 MAPK und auch der p38 MAPK (Papkoff *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1995). Die Signalwege, die zur Aktivierung der p38 MAPK in Thrombozyten führen, sind noch nicht geklärt. MAP-Kinasen kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und sind wichtiger Bestandteil von komplexen Signalwegen, die zu Zellproliferation oder Differenzierung führen. Ihre Substrate und Funktionen in Thrombozyten sind jedoch noch recht unklar. Die p38 MAPK phosphoryliert die Ca²⁺-abhängige zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) und trägt damit zur Aktivierung der cPLA₂

und zur Freisetzung von Arachidonsäure, einem Schritt des TxA_2 -Syntheseweges, bei (Kramer *et al.*, 1996; Börsch-Haubold *et al.*, 1997). Ein weiteres Substrat der p38 MAPK ist die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK-2). Diese phosphoryliert das kleine Hitzeschockprotein Hsp27, welches *in vitro* die Aktinpolymerisation verstärkt und so zu den Umbauvorgängen des Zytoskeletts während der Thrombozytenaktivierung beitragen könnte (Saklatvala *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 2000). Als Substrat der p42 MAPK wurde in Thrombozyten die ribosomale S6 Kinase (p90^{rsk}) gefunden, die in anderen Zelltypen an mitotischen und proliferativen Prozessen beteiligt ist, deren Funktion in Thrombozyten jedoch noch unklar ist (Papkoff *et al.*, 1994). Studien mit Inhibitoren der p38 MAPK (SB203580) und der MAPK-Kinase (PD98059), welche die p42 MAPK aktiviert, wiesen auf eine Funktion der p38 MAPK und p42 MAPK bei der Thrombozytenaktivierung durch geringe Dosen der Agonisten Collagen, TxA_2 und Arachidonsäure hin (Saklatvala *et al.*, 1996; McNicol *et al.*, 1998). Da die genannten Inhibitoren jedoch nicht spezifisch für diese Kinasen sind, sondern auch Zyklooxygenasen hemmen (Börsch-Haubold *et al.*, 1998), die in Thrombozyten bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Thromboxan beteiligt sind, können diese Effekte nicht eindeutig den MAPK zugewiesen werden.

3.2.2 Hemmung

Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sind unter physiologischen Bedingungen strengen Regulationen unterworfen. So sezernieren Endothelzellen beispielsweise blutdrucksenkende Substanzen (Vasodilatoren) wie Prostaglandin I_2 (Prostazyklin, PG-I_2) und EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*), die neben ihrer Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand auch eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung bewirken (Vane *et al.*, 1990). Diese Thrombozytenantagonisten hemmen die Thrombozytenfunktion, indem sie die intrazellulären Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP anheben. EDRF, der identisch mit Stickstoffmonoxid (NO) ist (Furchgott und Vanhoutte, 1989), und NO-freisetzende Substanzen wie Natriumnitroprussid (SNP) erhöhen über eine Aktivierung der Guanylylzyklase die intrathrombozytäre cGMP-Konzentration. PG-I_2 und andere Prostaglandine, z.B. das in der vaskulären Therapie häufig eingesetzte Prostaglandin E_1 (PG-E_1), aktivieren den Prostaglandinrezeptor, der über die α -Untereinheit von G_s -Proteinen die Adenylylzyklase aktiviert und zur Bildung von cAMP führt. Die Rezeptoren für Adenosin

und β -adrenerge Substanzen sind ebenfalls an stimulierende G_s -Proteine gekoppelt und aktivieren die Adenylylzyklase (Abbildung 3.3).

Die zyklischen Nukleotide entfalten ihre antiaggregatorische Wirkung hauptsächlich über die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAMP-PK und cGMP-PK) (Sandberg *et al.*, 1991; Butt *et al.*, 1992; Geiger *et al.*, 1992; Eigenthaler *et al.*, 1993). Weitere wichtige Effektormoleküle sind Phosphodiesterasen, die cAMP und cGMP wieder abbauen und von diesen in positiven oder negativen Feedback-Schleifen gehemmt oder aktiviert werden (Abbildung 3.3) (Eigenthaler und Walter, 1994).

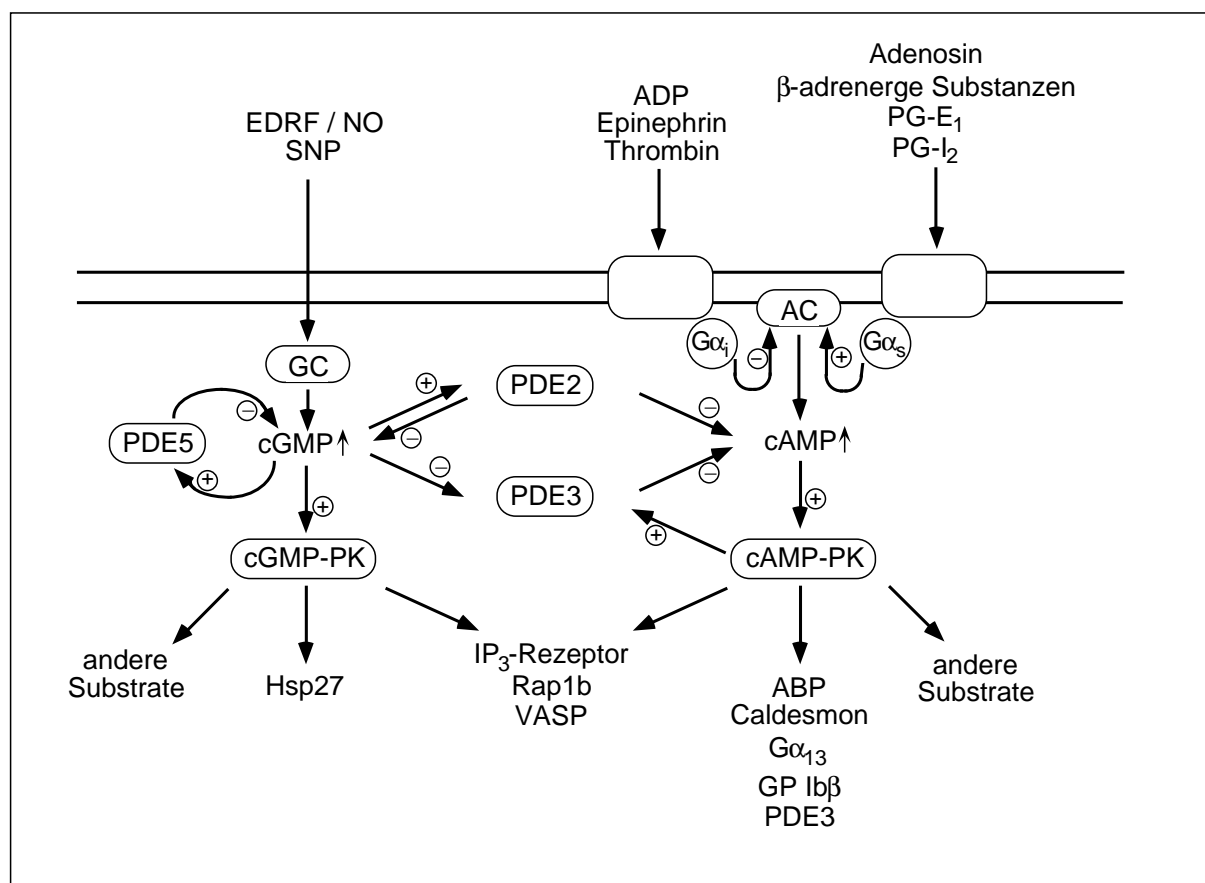


Abbildung 3.3: cAMP- und cGMP-vermittelte Hemmung der Thrombozytenfunktion

Die cAMP-PK und cGMP-PK phosphorylieren in Thrombozyten zahlreiche Substrate, von denen einige bereits identifiziert wurden, darunter das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) (Waldmann *et al.*, 1987; Halbrügge *et al.*, 1990), die kleine GTPase Rap1b (Kawata *et al.*, 1989; Siess *et al.*, 1990) und der IP₃-Rezeptor (Cavallini *et al.*, 1996)

als gemeinsame Zielmoleküle beider Kinasen. Außerdem wurden das Aktin-bindende Protein (ABP), Caldesmon (Hettasch und Sellers, 1991), die *myosin light chain kinase* (MLCK) (Hathaway *et al.*, 1981), die cGMP-inhibierte Phosphodiesterase (PDE3) (Macphee *et al.*, 1988), das Glykoprotein Ib β (GPIb β) (Fox und Berndt, 1989; Wardell *et al.*, 1989) und G α_{13} (Manganello *et al.*, 1999) als Substrate der cAMP-PK identifiziert, sowie Hsp27 (Butt *et al.*, 2000) für die cGMP-PK (Abbildung 3.3).

VASP, ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, ist das am besten charakterisierte Substrat beider Kinasen. Es liegt in Thrombozyten in sehr hoher Konzentration vor (Eigenthaler *et al.*, 1992). In den verschiedenen Zelltypen findet man VASP hauptsächlich in fokalen Kontakten, Streßfasern und Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Reinhard *et al.*, 1992). Es interagiert mit zahlreichen Zytoskelettproteinen wie Profilin, Zyxin, Vinculin und Aktin, sowie mit dem Oberflächenprotein ActA des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Reinhard *et al.*, 1995b; Reinhard *et al.*, 1995a; Reinhard *et al.*, 1996; Chakraborty *et al.*, 1995). VASP besitzt drei Phosphorylierungsstellen – Serin-157, Serin-239 und Threonin-278 – die mit verschiedenen Affinitäten von der cAMP-PK und cGMP-PK phosphoryliert werden (Butt *et al.*, 1994; Smolenski *et al.*, 1998). VASP verstärkt die Aktinpolymerisation und die Bündelung von Aktinfilamenten (Bachmann *et al.*, 1999). Zusammen mit anderen Faktoren beeinflusst es vermutlich die Umbildungen des Aktinzytoskeletts, die zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors führen. Die Phosphorylierung des Serin-157, die man aufgrund einer Verschiebung des Molekulargewichts von VASP von 46 kDa nach 50 kDa in SDS-Polyacrylamidgelen detektieren kann (Halbrügge und Walter, 1989), korreliert eng mit der Hemmung des Fibrinogenrezeptors (Horstrup *et al.*, 1994). Außerdem zeigen Versuche mit Thrombozyten von VASP-*knock-out*-Mäusen, daß deren durch niedrige Konzentrationen zyklischer Nukleotide ausgelöste Hemmung der Aggregation gestört ist. Außerdem reagieren diese Thrombozyten mit verkürzter Aggregationszeit nach Stimulation mit Collagen und mit verstärkter Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und P-Selektin-Expression nach Stimulation mit Thrombin (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Phosphorylierung von VASP zumindest einen Teil der hemmenden Effekte der zyklischen Nukleotide auf die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt. Die genaue Rolle, die VASP und die Phosphorylierung von VASP bei der Reorganisation des Zytoskeletts und der Integrinaktivierung spielen, ist jedoch noch unklar. In humanen Endothelzellen reduziert die Phosphorylierung die Lokalisation von VASP in den fokalen Kontakten und leitet eine

Auflösung des Aktinfilamentsystems ein. Mit VASP-Mutanten transfizierte Zellen, bei denen alle drei Phosphorylierungsstellen in Alanin mutiert sind, zeigen diese Effekte nicht (Smolenski *et al.*, 2000). *In vitro*-Experimente zeigen, daß durch die Phosphorylierung die Bindung von VASP an F-Aktin reduziert und die Aktinpolymerisation und Bündelung der Filamente unterdrückt werden (Harbeck *et al.*, 2000). Demnach könnte die VASP-Phosphorylierung die verstärkende Wirkung von VASP auf die Aktinpolymerisation herunterregulieren. VASP ist jedoch nur eines der Substrate der cAMP-PK und cGMP-PK, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Die Phosphorylierung von ABP, Caldesmon, GPIIb/IIIa, MLCK und Rap1b tragen wahrscheinlich ebenso zur Hemmung der Umstrukturierung des Zytoskeletts bei.

Ein weiterer wichtiger Effekt der Thrombozyteninhibierung über zyklische Nukleotide ist die Hemmung des intrazellulären Kalziumanstiegs (Geiger *et al.*, 1992; Geiger *et al.*, 1994). Auch hier sind mehrere Mechanismen beteiligt. Zum einen verhindert eine Hemmung des PLC-Signalweges die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Dies geschieht wahrscheinlich einerseits durch eine Reduzierung des Substrates (PIP_2) der PLC, (Ryningen *et al.*, 1998) und andererseits auf der Rezeptor- oder G-Protein-Ebene. Der Thromboxanrezeptor beispielsweise wird in HeLa-Zellen und *in vitro* von der cAMP-PK oder der cGMP-PK phosphoryliert, und in Thrombozyten werden die mit dem Thromboxanrezeptor assoziierte GTPase-Aktivität und die nachfolgende Kalziumfreisetzung durch cGMP oder cAMP gehemmt (Wang *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2000). Zusätzlich wird die Kalziumfreisetzung durch Hemmung des IP_3 -Rezeptors, der auch ein Substrat der cAMP-PK und cGMP-PK ist, gehemmt (Cavallini *et al.*, 1996; El-Daher *et al.*, 2000).

Neben der Neuorganisation des Zytoskeletts, der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und dem intrazellulären Kalziumanstieg wird durch cAMP und cGMP auch die Sekretion der intrazellulären Granula gehemmt (Michelson *et al.*, 1996). Die Mechanismen der Granulasekretion sind im Detail noch nicht verstanden, jedoch sind sowohl ein hoher zytosolischer Kalziumspiegel als auch die Aktivierung der PKC essentiell für die Degranulierung (Knight *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1996; Sloan und Haslam, 1997). Durch die Hemmung der PLC werden beide Effekte gehemmt. Es ist aber wahrscheinlich, daß die cAMP-PK und cGMP-PK noch an weiteren Punkten des sekretorischen Prozesses eingreifen, besonders da Veränderungen des Zytoskeletts involviert sind.

3.3 Endothelzellen

3.3.1 Funktion

Endothelzellen kleiden die Innenwände der Blutgefäße aus und bilden eine dynamische Grenzschicht zwischen dem Blutstrom und dem Gefäßwandgewebe. Das Endothel erfüllt wichtige Aufgaben bei der Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes. Es reguliert den Blutdruck und die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Es beeinflusst thrombotische und fibrinolytische Prozesse und die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an seine Oberfläche. Es löst inflammatorische Prozesse aus und reguliert die Durchlässigkeit der Gefäßwand. Das gesunde, intakte Endothel sezerniert konstitutiv geringe Mengen EDRF (NO), das von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin gewonnen wird (Palmer *et al.*, 1988), und besitzt damit eine vasodilatierende (gefäßerweiternde) und antikoagulierende Aktivität (de Graaf *et al.*, 1992). Zahlreiche Faktoren wie Scherkräfte, Acetylcholin und Bradykinin, aber auch ADP, ATP, Serotonin und andere Signale verstärken in den Endothelzellen die Bildung und Freisetzung von NO und Prostazyklin (PG-I₂). Prostazyklin entsteht in mehreren enzymatischen Schritten aus der Umwandlung von Arachidonsäure. Diese beiden Vasodilatoren werden von den Endothelzellen sowohl in den subendothelialen Raum als auch in den Blutstrom sezerniert und stimulieren in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand sowie in den Thrombozyten die cGMP- und cAMP-abhängigen Signalwege und bewirken eine Hemmung der Kontraktion und Proliferation der glatten Muskelzellen und der Thrombozytenaggregation (Vane *et al.*, 1990; Radomski *et al.*, 1987). Neben den Thrombozytenantagonisten EDRF und PG-I₂ bilden Endothelzellen weitere antithrombotische Faktoren, die in die Gerinnungskaskade eingreifen und z.B. die Produktion von Thrombin reduzieren, sowie fibrinolytische Faktoren (Pearson, 1999). Neben den Wirkungen auf glatte Muskelzellen und Thrombozyten zeigt NO auch antiinflammatorische Effekte, indem es die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen hemmt. NO wirkt dabei auf die Endothelzellen selbst, aktiviert dort über die Guanylylzyklase die cGMP-abhängige Proteinkinase und hemmt auf diesem Wege die Expression von Zelladhäsionsmolekülen sowie die Produktion des Vasokonstriktors Endothelin. Das gesunde Endothel weist diese inhibitorischen Funktionen auf und hemmt die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, die Aggregation und Thrombosebildung sowie die Kontraktion und die Proliferation der glatten Muskelzellen.

3.3.2 Dysfunktion

Wird das Endothel in seinen Funktionen gestört, fördert dies die Vasokonstriktion (Gefäßverengung), die Thrombozytenaktivierung und Gerinnung, die Proliferation der glatten Muskulatur der Gefäßwand sowie die Leukozytenadhäsion (Meredith *et al.*, 1993). Der wesentliche Faktor ist hierbei die Beeinträchtigung der endothelialen Produktion und/oder Bioaktivität von NO. Diese scheint ein frühes Ereignis in der Krankheitsentwicklung der Atherosklerose zu sein, da sie nicht nur in offensichtlich atherosklerotischen Gefäßsegmenten, sondern bereits in Blutgefäßen bei Patienten im Frühstadium atherosklerotischer Erkrankungen auftritt (Zeiger *et al.*, 1991). Neben der Reduktion der NO-Produktion tragen Endothelzellen auch aktiv zur Vasokonstriktion bei, indem sie gefäßverengend wirkende Substanzen wie Endothelin, Angiotensin II und TxA₂ bilden. Außerdem sezernieren sie Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation der glatten Muskelzellen anregen. Durch die Expression von MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) und Oberflächenmolekülen wie P-Selektin, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) regulieren Endothelzellen außerdem auch inflammatorische Prozesse und vermitteln die Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten. Die Expression dieser Proteine wird durch NO gehemmt und beispielsweise durch Zytokine, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Thrombin, aktivierte Thrombozyten etc. ausgelöst. Diese prothrombotischen, proinflammatorischen und proliferationsfördernden Eigenschaften des Endothels sind wichtige Bestandteile des physiologischen Reparatursystems, das bei Verletzungen der Gefäßwand zur Blutstillung führt. Ist die Regulation dieser Prozesse jedoch durch dauerhafte Schädigungen des Endothels gestört, kommt es zur pathologischen Endotheldysfunktion. Zahlreiche Faktoren wie oxidativer Streß, freie Radikale, Einlagerung von oxidiertem LDL (*low density lipoprotein*) etc. tragen zur Endotheldysfunktion bei (Selwyn *et al.*, 1997). Sie ist häufig die Folge von ungesunder Ernährung, Rauchen, Bewegungsmangel etc. und kann außerdem durch genetische Prädispositionen begünstigt werden.

Die Endotheldysfunktion ist als Ursache und/oder Folge mit zahlreichen Krankheitsbildern wie Atherosklerose, Bluthochdruck, Thrombosen, Herzversagen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus etc. verbunden. Sie führt zur Entstehung von Endothelläsionen und zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Die Plaques entstehen durch Thrombozytenadhäsion, Proliferation von glatten Muskelzellen und Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten, hauptsächlich Makrophagen. Die inflammatorischen Prozesse sind wesentlicher Bestandteil

der Plaquebildung. Sie begünstigen bei fortgeschrittener Atherosklerose das Aufbrechen der Plaques, so daß durch Thrombozytenadhäsion und Aggregation an der Plaqueruptur ein Thrombus entstehen kann, der einen Gefäßverschluß herbeiführen kann (Fuster *et al.*, 1992b; Fuster *et al.*, 1992a; Fuster *et al.*, 1997).

3.4 Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten

3.4.1 Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch endotheliale Faktoren

Endothelzellen hemmen die Thrombozyten direkt durch die beiden Vasodilatoren EDRF (NO) und Prostazyklin, die sie in den Blutstrom sezernieren. EDRF hat eine sehr kurze Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden (Cocks *et al.*, 1985). Da NO durch Hämoglobin inaktiviert wird, wirkt es vermutlich nur in unmittelbarer Nähe der Endothelschicht. Neuere Erkenntnisse, hauptsächlich aus *in vitro*-Studien, weisen darauf hin, daß NO außerdem in Reaktionen der enzymatischen und nichtenzymatischen Oxidation von Lipiden verbraucht wird (O'Donnell und Freeman, 2001). Die biochemische Halbwertszeit von Prostazyklin *in vivo* beträgt etwa 3 min (Dusting *et al.*, 1979). Trotz der kurzen Halbwertszeiten scheinen NO und PG-I₂ *in vivo* eine hemmende Wirkung auf die Thrombozyten auszuüben. So zeigen Mäuse, denen das Gen für die eNOS fehlt, verkürzte Blutungszeiten (Freedman *et al.*, 1999). Und eine Familie mit einer Nonsense-Mutation im Gen für die Prostazyklinsynthese zeigt ebenfalls einen prothrombotischen Phänotyp (Nakayama *et al.*, 1997). Die Wirkmechanismen von EDRF und PG-I₂ auf Thrombozyten wurden in Kapitel 3.2.2 ausführlich beschrieben.

Neben EDRF und PGI₂ exprimieren Endothelzellen weitere Faktoren, wie Ectonukleotidasen, vWF, Thrombomodulin, *tissue factor* (TF) und *tissue factor pathway inhibitor*, die direkt oder indirekt das Aggregationsverhalten der Thrombozyten beeinflussen (Pearson, 1999).

3.4.2 Induktion inflammatorischer Prozesse in Endothelzellen durch aktivierte Thrombozyten

Zwischen Endothelzellen und Thrombozyten besteht eine wechselseitige Beziehung, d.h. auch die Thrombozyten beeinflussen den Stoffwechsel der Endothelzellen. Bisher ist bekannt, daß die aktivierten Thrombozyten in den Endothelzellen hauptsächlich inflammatorische Prozesse

auslösen. Sie aktivieren die Expression von Endothelin, E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, Interleukin-8 (IL-8), TF, Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Vitronectinrezeptor) und wahrscheinlich weiteren Faktoren (Ohlstein *et al.*, 1991; Henn *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 1998; Slupsky *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000). Die meisten dieser exprimierten Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle sind an der Rekrutierung, Bindung und Aktivierung von Leukozyten beteiligt, welche eine wesentliche Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Prozesse spielen. Durch die Induktion der Endothelinexpression vermitteln aktivierte Thrombozyten außerdem die Gefäßkontraktion. Die Transkription vieler dieser Proteine wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ B'*) gesteuert (Collins, 1993; Collins *et al.*, 1995; Thanos und Maniatis, 1995). Es wurde gezeigt, daß aktivierte Thrombozyten NF- κ B in humanen Endothelzellen aktivieren und die NF- κ B-abhängige Gentranskription induzieren (Gawaz *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000). Die durch aktivierte Thrombozyten ausgelöste Transkription von MCP-1 wird außer durch NF- κ B auch durch Aktivierung der p38 MAPK reguliert (Dickfeld *et al.*, 2001). Die Expression von E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, IL-8, MCP-1 und TF wird durch Hemmung der Interaktion von CD40L auf den Thrombozyten mit CD40 auf den Endothelzellen deutlich reduziert (Henn *et al.*, 1998; Slupsky *et al.*, 1998). CD40 gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und war ursprünglich nur auf B-Lymphozyten bekannt. Es interagiert mit seinem Liganden CD40L, das strukturell mit TNF- α verwandt ist. CD40L wurde ursprünglich auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen identifiziert, und seine Interaktion mit CD40 auf B-Lymphozyten ist von großer Bedeutung für die Entwicklung und das Funktionieren des humoralen Immunsystems (Kroczeck *et al.*, 1994). Der Nachweis von CD40L auf aktivierten Thrombozyten, der durch Interaktion mit CD40 auf Endothelzellen inflammatorische Prozesse auslöst, hat das Verständnis der Thrombozyten um eine bedeutende physiologische Funktion erweitert. Die Aktivierung des endothelialen CD40 scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung der atherosklerotischen Plaques zu spielen. Die atherosklerotischen Plaques bei Mäusen, bei denen das Gen für CD40L ausgeschaltet wurde, sowie bei Mäusen, bei denen die CD40L-CD40-Interaktion durch Antikörperbehandlung blockiert wurde, wiesen einen deutlich geringeren Gehalt an Leukozyten und damit eine erhöhte Stabilität auf. Dadurch traten weniger Plaquerupturen auf, die zu Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung führen (Lutgens *et al.*, 1999; Lutgens *et al.*, 2000). Die endotheliale Expression von Endothelin, MCP-1 und ICAM-1 wird zumindest teilweise auch durch von aktivierten Thrombozyten freigesetzte, lösliche Faktoren ausgelöst (Ohlstein *et al.*, 1991; Gawaz *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000). Insgesamt sind also sowohl

lösliche Faktoren als auch CD40L und eventuell weitere Membranproteine an der Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen beteiligt.

3.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Analysemethoden, welche den *in vivo*-Funktionszustand humaner Thrombozyten und Endothelzellen quantitativ erfassen können. Da sowohl die Aktivierung als auch die Hemmung humaner Thrombozyten durch die Phosphorylierung spezifischer Signalproteine reguliert wird, sollte eine Methode basierend auf der Verwendung phosphorylierungsspezifischer Antikörper und der Durchflußzytometrie etabliert werden. Da die Sekretion von Endothelfaktoren den Phosphorylierungszustand dieser Proteine in den Thrombozyten beeinflusst, kann die Methode auch dazu verwendet werden, indirekt Rückschlüsse auf den Funktionszustand von Endothelzellen zu gewinnen.

Die Regulation der MAPK-Wege während der Thrombozytenaktivierung und deren Hemmung durch Endothelfaktoren sollte näher untersucht werden, sowie der Einfluß von Endothelfaktoren auf die Oberflächenexpression von P-Selektin und CD40L, die direkt an der Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen beteiligt sind.

Um ein besseres Verständnis der Rolle der Thrombozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen in den frühen atherogenen Prozessen zu erlangen, sollten als dritte Fragestellung die Signalwege in Endothelzellen untersucht werden, welche durch aktivierte Thrombozyten reguliert werden. Insbesondere sollten mit Hilfe von cDNA-Arrays Gene identifiziert werden, deren Transkription in Endothelzellen durch die Wechselwirkung mit aktivierten Thrombozyten ausgelöst wird.

4 MATERIALIEN

4.1 Antikörper

Tabelle 4.1: Antikörper und Antisera

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Endkonzentration / Verdünnung	
					Blot	FACS
M4	VASP	--	Kaninchen, polyklonal	immunoGlobe	1:3000	--
16C2	Phospho-Ser239-VASP	--	Maus IgG1 κ	nanoTools / Vasopharm Biotech	0,5 μ g/ml	2,4 μ g/ml
MOPC 21	unspezifische Isotypkontrolle	--	Maus IgG1 κ	Sigma	--	2,4 μ g/ml
Anti-phospho-p38 MAPK	Phospho-Thr180/Tyr182-p38 MAPK	--	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs	1:500	--
Anti-phospho-p42/44 MAPK (12D4)	Phospho-Thr202/Tyr204-p42/44 MAPK	--	Maus IgG	nanoTools	0,4 μ g/ml	10 μ g/ml
Anti-p38 MAPK	p38 MAPK	--	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs	1:1000	--
Anti-ERK2	p42 MAPK	--	Maus IgG	nanoTools	0,1 μ g/ml	--
Anti-ERK1	p44 MAPK	--	Maus IgG	Pharmingen	0,5 μ g/ml	--
Anti-CD62P-RPE	CD62P	RPE	Maus IgG	DAKO	--	10 μ g/ml
Anti-CD40L	CD154 (CD40L)	--	Maus IgG	Pharmingen	--	10 μ g/ml
Anti-Fibrinogen-FITC	Fibrinogen	FITC	Hühnchen IgG	WAK Chemie	--	90 μ g/ml
Anti-CD41	GPIIb	--	Maus IgG1	Cymbus Biotechnology	--	5 μ g/ml
Anti-AP-1/c-Jun	AP-1/c-Jun	--	Kaninchen, polyklonal	Sigma	1:400	--
Ziege-anti-Maus-FITC	Maus IgG	FITC	Ziege	Sigma	--	25 μ g/ml
Ziege-anti-Maus-HRP	Maus IgG	HRP	Ziege	BioRad	1:3000	--
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	BioRad	1:3000	--

4.2 Größenstandards

Größenstandard Proteine:	Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad)
Größenstandard DNA:	100 bp DNA ladder (Life Technologies) 1 kb DNA ladder (Life Technologies)
Größenstandard RNA:	RNA ladder 0,24 - 9,5 kb (Life Technologies)

4.3 Enzyme

Reverse Transkriptase *Superscript II* (Life Technologies)
Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas)
Restriktionsenzyme + Restriktionspuffer (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics)

4.4 Nukleotide, Oligonukleotide, DNA

[α -³²P]dATP, 3000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech)
dNTPs, 2mM, für PCR (MBI Fermentas)
Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech)
Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics)

4.5 Kulturmedien und -zusätze

Ampicillin (Sigma)
LB-Agar Medium (Bio 101)
LB-Medium (Bio 101)
L-Glutamin, 200 mM (Sigma)
M199 Earle, mit 20 mM HEPES, ohne L-Glutamin, ohne NaHCO₃ (Biochrom)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) (Clontech)

4.6 Chemikalien und Lösungen

Agarose: SeaKem GTG Agarose, NuSieve GTG Agarose (FMC Bioproducts)

cBIMPS (BioLog)

Clopidogrel (Sanofi)

Denhardt's Solution, 50x (Sigma)

Dil-Ac-LDL (Paesel und Lorei)

Epinephrin: Suprarenin (Hoechst/Aventis)

Ethanol (J.T. Baker)

Formaldehyd, 10%, methanolfrei (Polysciences)

Heparin: Liquemin N 25000 (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics)

Kollagenase A (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics)

Methanol (J.T. Baker)

MgCl₂, 25 mM, für PCR (MBI Fermentas)

Milchpulver (BioRad)

MOPS-Puffer, 10x (Sigma)

PBS Dulbecco's, ohne Kalzium, ohne Natriumbicarbonat (Life Technologies)

8-pCPT-cGMP (BioLog)

PCR-Puffer: 10x MBI, pH 8,8 / 200 mM (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas)

PD 98059 (Alexis Biochemicals)

RGDS-Peptid (Sigma)

RNAlater (Ambion)

Rotiphorese Gel30, 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Carl Roth GmbH)

SB 203580 (Alexis Biochemicals)

Silikonisierlösung: Sigmacote (Sigma)

SSC-Puffer, 20x (Life Technologies)

TAE-Puffer, 10x (Life Technologies)

Ticlopidin (Sanofi)

Trizol-Reagenz (Life Technologies)

Wasser: Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn), Ampuwa (Fresenius)

Zitratlösung: ACD-Formula A (Biotrans GmbH)

Alle übrigen Reagenzien wurden im jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von der Firma Sigma bezogen.

4.7 Kits

Atlas Human 1.2 Array (Clontech)
DNA-free Kit (Ambion)
ECL Kit (Amersham Pharmacia Biotech)
Plasmid Midi Kit (QIAGEN)
QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
Prime It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene)
QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
TA-Cloning Kit (Invitrogen)

4.8 Verbrauchsmaterialien

Hybond N⁺-Membran (Amersham Pharmacia Biotech)
Nitrozellulose Transfermembran: Protran, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell)
PVDF-Transfermembran: Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm (Millipore)
Röntgenfilme: Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech), Medical Film (Konica)
Sephadex Quick Spin Columns G50 (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics)
S-Monovette, 5 ml, Zitrat (Sarstedt)
Zellkulturflaschen und -schalen (Greiner)

4.9 Geräte, Software

Durchflußzytometer: FACSScan (Becton Dickinson)
FACSCalibur (Becton Dickinson)

Elektrophoresekammern

- für Polyacrylamid-Minigele: Mini Protean II (BioRad)
- für RNA-Gele: Agagel Maxi (Biometra)
- für DNA-Gele: Hybritech Gel Box (C.B.S. Scientific Co.)

Inkubatoren

- für humane Endothelzellen: Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator (Forma Scientific)
- Bakterienschüttler: Certomat R + Certomat H (B. Braun Biotech Internat.)
- für Hybridisierungen: Hybaid Maxi 14 (MWG Biotech)

Mikroskop: Axiovert 25 (Zeiss)

PCR-Maschine:	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
Photometer:	Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)
Scanner:	Studiostar (Agfa)
Software:	CellQuest (Version 1.0, 1994, Becton Dickinson). NIH Image (Version 1.61) PhotoLook (1996, Agfa-Gevaert N.V.)
Spannungsgerät:	Power Pac 200 (BioRad)
Szintillationszähler:	Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (Packard)
Transferkammer für Western Blots:	Trans-Blot Cell (BioRad)
UV-Crosslinker:	UV Stratalinker 1800 (Stratagene)
Zellzählgerät für Thrombozyten:	Technicon H-1 System, Technicon H-3 RTC (Bayer)
Zentrifugen:	Roto Silenta/K (Hettich) Rotanta/S (Hettich) Eppendorf Zentrifuge 5415 C (Eppendorf) Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf) Sorvall RC 5B, Rotor SS34 (Sorvall)

5 METHODEN

5.1 Präparation humaner Thrombozyten

Alle Versuchsschritte mit Thrombozyten wurden bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 37°C und unter ausschließlichem Einsatz von Kunststoffpipetten und -gefäßen durchgeführt. Große Scherkräfte, etwa durch Vortexen oder rasches Pipettieren, wurden vermieden.

Die Thrombozyten wurden aus Blutspenden gesunder, nichtrauchender, freiwilliger Spender, die nicht unter dem Einfluß von Medikamenten standen, isoliert. Das Blut wurde aus der Armvene entweder mit einer Dialysekanüle abgenommen und direkt mit vorgelegter Zitratlösung (ACD-Formula A) im Verhältnis 6:1 vermischt, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern, oder es wurde das Blutentnahmesystem S-Monovette mit Zitrat-Lösung der Firma Sarstedt verwendet. Mit Zitrat stabilisiertes Blut wurde in dieser Form für Versuche mit Vollblut eingesetzt.

Zur Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (PRP) wurde Vollblut für 5 bis 15 min (abhängig vom Volumen) bei 330 g zentrifugiert. Durch Zentrifugation von Vollblut entstehen eine erythrozytenreiche untere Phase, eine leukozytenreiche Zwischenphase und als obere Phase das PRP, welches neben Blutplasmabestandteilen nahezu ausschließlich Thrombozyten enthält. Das PRP wurde mit einer Pipette sorgfältig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

Zur Herstellung gewaschener Thrombozyten, wurde das PRP für 5 bis 10 min bei 400 g erneut zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert, die Thrombozytenzahl mit einem Zellzählgerät bestimmt und die Zellzahl auf eine Endkonzentration von $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml eingestellt.

PRP und gewaschene Thrombozyten wurden vor Versuchsbeginn für 15 min bei 37°C im Wasserbad ruhig stehengelassen.

5.2 Inkubationsversuche mit Thrombozyten

Die Stimulierung der Thrombozyten fand in Vollblut, PRP oder gewaschenen Thrombozyten in PBS mit 5,5 mM D-Glucose und 1 mM EDTA statt. Sie wurden mit den Antagonisten PG-E₁, SNP, cBIMPS oder 8-pCPT-cGMP und/oder den Agonisten Thrombin, ADP, Epinephrin oder dem TxA₂-Analog U46619 für verschiedene Zeiträume inkubiert. Um die Effekte der von Endothelzellen sezernierten Faktoren auf Thrombozyten zu messen, wurden Koinkubationsversuche mit Vollblut und Endothelzellen durchgeführt. Je 1 ml PBS und 2 ml Vollblut wurden auf eine mit Huvecs der 3. Passage konfluent bewachsene T75-Zellkulturflasche, bei der das Zellkulturmedium zuvor entfernt worden war, gegeben und bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. In einigen Versuchen wurden die Endothelzellen vor Versuchsbeginn für 1 h bei 37°C mit 10 µM Indomethacin, das in das Zellkulturmedium gegeben wurde, vorinkubiert. In diesen Versuchen war auch während der Koinkubation dem Vollblut 10 µM Indomethacin zugesetzt.

Bei allen Versuchen wurden jeweils vor Beginn der Inkubation (0 min) und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation Proben entnommen und wie in den Kapiteln 5.4 und 5.5 beschrieben für die Durchflußzytometrie oder die Analyse im Western Blot aufbereitet.

5.3 In vivo-Studien mit Ticlopidin und Clopidogrel

Freiwillige, gesunde Probanden (Alter 23 bis 49 Jahre) nahmen für 7 Tage entweder 500 mg Ticlopidin oder 75 mg Clopidogrel pro Tag ein. Blutproben wurden vorher, während und bis zu 4 Wochen nach Beendigung der Medikamenteneinnahme entnommen. PRP wurde präpariert wie in Kapitel 4.1 beschrieben und mit Puffer, 30 nM PG-E₁, 5 µM ADP oder 30 nM PG-E₁ + 5 µM ADP inkubiert. Die Analyse der VASP-Phosphorylierung erfolgte wie in Kapitel 5.4 beschrieben.

5.4 Durchflußzytometrie

Prinzip

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die automatisierte Analyse von Fluoreszenzintensitäten und Lichtstreuung bzw. Lichtbrechung einzelner Zellen innerhalb von heterogenen Zellgemischen. Hierbei ist die gleichzeitige quantitative Erfassung mehrerer biochemischer

und biophysikalischer Parameter einer einzelnen Zelle - unter der Voraussetzung, daß die Zellen einzeln in Suspension vorliegen - möglich. Grundlage für die Durchflußzytometrie ist die Möglichkeit, Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch mit einem zu untersuchenden Molekül zu verknüpfen. Hierbei spielt der Einsatz von Antikörpern, die oft hochspezifisch ihre Antigene erkennen, in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern eine große Rolle. Nachgewiesen werden können auf diesem Wege Oberflächenantigene, nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen jedoch auch intrazelluläre Moleküle. Neben Antikörpern können z.B. auch nukleinsäurebindende Farbstoffe oder Farbstoffe, die ihr Fluoreszenzverhalten durch Bindung an intrazelluläre Ionen verändern, zum Einsatz kommen.

Die Durchflußzytometrie besitzt gegenüber anderen fluorimetrischen Methoden mehrere Vorteile: 1) Die computergesteuerte Quantifizierung der Fluoreszenzsignale einer sehr großen Anzahl von Zellen – bis zu mehreren tausend Zellen in der Sekunde – führt zu einer großen statistischen Aussagesicherheit. 2) Die Durchflußzytometrie liefert nicht nur einen Durchschnittswert für das zu untersuchende Zellgemisch, sondern eine Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen, die auch eine Unterscheidung von Subpopulationen ermöglicht. 3) Außerdem können durch die gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter einer einzelnen Zelle Signale eindeutig miteinander verknüpft werden.

Aufarbeitung der Thrombozytenproben zur Messung einer intrazellulären Proteinphosphorylierung

Zu jedem Analysezeitpunkt wurden 150 µl Vollblut, PRP oder gewaschene Thrombozyten sofort mit 70 µl 10% Formaldehyd für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. PRP und gewaschene Thrombozyten wurden anschließend 1 min bei 2700 g zentrifugiert, Vollblut erst für 20 s bei 2900 g und der hieraus entstandene PRP-Überstand nochmals 10 s bei 8000 g. Die fixierten Zellen wurden in 400 µl PBS/BSA (0,5% BSA in PBS, pH 7,4) resuspendiert, nach Zugabe von 40 µl 2% Triton X-100 für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend für 1 min bei 2700 g zentrifugiert. Die permeabilisierten Zellen wurden in 300 µl Primärantikörperlösung (2,4 µg/ml 16C2 bzw. 12D4 in PBS/BSA) aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden Versuch wurde zusätzlich eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper oder mit einem unspezifischen Primärantikörper des gleichen Isotyps (Maus IgG1κ) durchgeführt, um die unspezifische Hintergrundfärbung

korrigieren zu können. Für die Sekundärantikörperinkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 300 µl Sekundärantikörperlösung (25 µg/ml Ziege-anti-Maus-FITC in PBS/BSA) resuspendiert und 20 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Analyse im Durchflußzytometer wurden die Zellen noch einmal zentrifugiert, in 300 µl PBS/BSA resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde nach der Probenaufbereitung.

Aufarbeitung der Thrombozytenproben zur Bestimmung von Oberflächenmarkern

Zu jedem Analysezeitpunkt wurden 50 µl PRP oder gewaschene Thrombozyten für 10 min mit 5 µl 10% Formaldehyd fixiert und anschließend für 1 min bei 2700 g zentrifugiert. Die fixierten Zellen wurden in 50 µl Primärantikörperlösung (10 µg/ml Anti-CD62P-RPE, 90 µg/ml Anti-Fibrinogen-FITC oder 10 µg/ml Anti-CD40L in PBS/BSA) aufgenommen und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Proben mit dem Anti-CD40L-Antikörper wurden anschließend für weitere 20 min mit 100 µl Sekundärantikörperlösung (25 µg/ml Ziege-anti-Maus-FITC in PBS/BSA) gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit PBS/BSA verdünnt und bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Messungen am Durchflußzytometer

Für die durchflußzytometrischen Messungen wurde anfangs ein FACSScan, später ein FACSCalibur Durchflußzytometer von Becton Dickinson mit einem Argon-Laser (Anregungswellenlänge 488 nm) sowie einem Diodenlaser (Anregungswellenlänge 630 nm) eingesetzt.

Die Messungen erfolgten bei niedriger Durchflußrate, und die Proben wurden so verdünnt, daß eine maximale Zählrate von 2000 Ereignissen pro Sekunde nicht überschritten wurde.

Alle Photodetektoren wurden auf logarithmische Verstärkung eingestellt. Die Verstärkungen der Signale von Forward Scatter und Side Scatter wurden so eingestellt, daß die Meßwerte der Thrombozyten für beide Parameter im Mittelfeld der logarithmischen Skalen lagen (FSC: E00, SSC: 337 V). Die Thrombozytenpopulation wurde anfangs durch eine Färbung gegen das Glycoprotein IIb/IIIa als spezifischen Thrombozytenmarker identifiziert.

In der FSC-SSC-Auftragung wurde die Thrombozytenpopulation durch das Setzen eines Analysefensters eingegrenzt. Das Fenster wurde eng um die unstimulierte Population gesetzt und auch bei der Analyse aktivierter Thrombozyten unverändert beibehalten. Bei allen Messungen wurden nur Signale innerhalb dieser Grenzen ausgewertet. Dadurch wurde verhindert, daß Mikropartikel und Mikroaggregate, die sich in aktivierten Thrombozytenproben bilden können, zu verfälschten Signalen führen. Mikropartikel, die sich im FSC-SSC-Diagramm links unterhalb des Thrombozytenfensters befinden, weisen aufgrund ihrer geringeren Größe kleinere Fluoreszenzwerte auf, kleine Thrombozytenaggregate hingegen, die sich rechts oberhalb des Thrombozytenfensters befinden, führen zu überhöhten Fluoreszenzsignalen, da hier die Fluoreszenzintensität mehrerer Zellen gleichzeitig überlagert wird.

Die Verstärkung der Fluoreszenzsignale in den einzelnen Fluoreszenzkanälen wurde für jede Färbemethode so gewählt, daß das Signal der unstimulierten Thrombozytenprobe bei logarithmischer Verstärkung einen mittleren Fluoreszenzwert zwischen 10 und 20 erhielt. Alle Proben einer Meßreihe wurden bei identischen Geräteeinstellungen gemessen.

Für jede Messung wurden 20000 Zellen analysiert. Messung und Auswertung der Daten erfolgten mit dem Programm CellQuest. Ausgewertet wurden die Fluoreszenzmessungen in Form von Histogrammen, in denen die Fluoreszenzintensität als Abszisse und die Anzahl der Zellen als Ordinate aufgetragen wurden. Aus den Histogrammen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Thrombozyten einer Probe berechnet. Diese Mittelwerte dienen als Maß für die Menge der gebundenen Antikörper.

5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Lösungen

SDS-Stopplösung:

Trizma-Base, pH 6,7	200 mM
Glycerin	15%
SDS	6%
Bromphenolblau	0,03%
2-Mercaptoethanol	10% → wird erst kurz vor der Verwendung zugesetzt

2 Trenngele (9% / 10%):

H ₂ O	11,3 ml	
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	6 ml	
3 M Trizma-Base, pH 8,9	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10% APS	0,2 ml	0,2 ml

2 Sammelgele (3%):

H ₂ O	7,25 ml
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	1,0 ml
0,5 M Trizma-Base, pH 6,7	1,25 ml
10% SDS	0,1 ml
TEMED	5 µl
10% APS	0,2 ml

Elektrophoresepuffer:

Trizma-Base	50 mM
Glycin	191 mM
SDS	0,1%

Transferpuffer:

Trizma-Base	25 mM
Glycin	193 mM
Methanol	20%

Waschpuffer:

Trizma-Base	55 mM
NaCl	167 mM
Triton X-100	0,22%

Blockmedium:

6% Milchpulver in Waschpuffer

Durchführung

Für Western Blot-Proben wurden 50 µl gewaschene Thrombozyten mit 25 µl SDS-Stopplösung gemischt und sofort für 5 min auf 95°C erhitzt. PRP-Proben wurden zuvor für 10 s bei 8000 g

zentrifugiert und das Thrombozytenpellet in 50 µl PBS aufgenommen. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) wie in (Schwarz *et al.*, 1999) beschrieben durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit 9%igen oder 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen.

Die Proben wurden vor der Auftragung auf das Gel für 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt. Für die Fokussierung der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Die anschließende Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 120 V.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.*, 1979) auf Nitrozellulose oder PVDF-Membranen transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstanter Stromstärke von 1 A.

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden während 30 min mit 6%iger Milchpulverlösung abgesättigt. Danach wurden die Blots mindestens 60 min oder über Nacht mit Primärantikörper in 3% Milchpulver inkubiert. Die Konzentrationen der Antikörper sind Tabelle 4.1 zu entnehmen. Überschüssige Antikörper wurden anschließend in drei Waschschritten à 5 min mit Waschpuffer entfernt. Die Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte für 45 min. Nach fünf Waschschritten von jeweils etwa 5 min wurden die Blots mit ECL-Lösung entwickelt. Chemilumineszierende Banden wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Zur Analyse wurden die entwickelten Filme mit dem Programm PhotoLook eingescannt und der Schwärzungsgrad der Banden mit dem Programm NIH Image analysiert.

5.6 Isolierung und Kultivierung humaner Endothelzellen

Gewinnung von humanem Serum

Die Gewinnung des humanen Serums erfolgte unter sterilen Bedingungen. Vollblut von nichtrauchenden männlichen Spendern der Blutgruppe AB wurde ohne Antikoagulantien aufgefangen und für 1 h zur Gerinnung stehengelassen. Das geronnene Blut wurde 10 min bei 3850 g zentrifugiert und das in der oberen Phase befindliche Serum in ein neues Gefäß

überführt. Das Serum wurde 10 min bei 2000 g erneut zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen, für 30 min bei 57°C hitzeinaktiviert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Das Serum mehrerer Spender wurde vereinigt, um eine größere Menge Serum gleicher Qualität zu erhalten.

Gelatinieren von Zellkulturflaschen

Der Boden der Zellkulturflaschen wurde mit steriler 0,5%iger Gelatinelösung überschichtet (0,1 ml/cm²) und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen bzw. für längere Zeiträume bei 4°C gelagert. Kurz vor Verwendung der Zellkulturflaschen wurde der Überstand abgesaugt.

Präparation von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

Die Isolierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Huvecs, *human umbilical vein endothelial cells*) erfolgte in Anlehnung an die von Jaffe (Jaffe *et al.*, 1973) beschriebene Methode mit geringfügigen Modifikationen.

Humane Nabelschnüre wurden nach der Geburt bis zur Präparation für maximal drei Tage bei 4°C in PBS gelagert. Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur. Die Nabelschnüre wurden zunächst von Blutresten gesäubert und auf Beschädigungen überprüft. An einem Ende der Nabelschnur wurde eine kurze Schlauchverbindung in die Vene eingeführt und die Vene mit Hilfe einer Perfusorspritze mit 50 ml PBS durchgespült. Anschließend wurde das PBS ausgestreift und das untere Ende der Nabelschnur mit einer Arterienklemme abgeklemmt. Durch einen Sterilfilter (0,25 µm Porengröße) wurde die Vene mit 0.1%iger, auf 37°C temperierter Kollagenaselösung prall gefüllt und das andere Ende der Nabelschnur ebenfalls mit einer Arterienklemme verschlossen. Die mit der Kollagenaselösung gefüllte Nabelschnur wurde nun in einem Besteckkasten für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur leicht massiert, damit sich die Zellen besser ablösen, und die Kollagenaselösung wurde mit knapp 30 ml PBS in 10 ml vorgewärmtes serumhaltiges Zellkulturmedium (M199, 20% humanes Serum, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin) ausgespült. Die Zellen wurden für 5 min bei 150 g zentrifugiert, in 5 ml Medium aufgenommen und in einer gelatinebeschichteten T25-Zellkulturflasche (25 cm² Fläche) ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C, 5%

CO₂ und 68% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, am nächsten Tag fünfmal mit PBS gespült und mit 5 ml frischem Kulturmedium weiter inkubiert.

Passagieren humaner Endothelzellen

Das Medium der Endothelzellen wurde alle 2 Tage gewechselt. Wenn der Zellrasen der Kultur konfluent war, wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden einmal kurz mit PBS gewaschen und dann für einige Minuten mit PBS bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich abgerundet, aber noch nicht abgelöst hatten. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 1,5 ml von 1:10 verdünnter Trypsinlösung kurz (bis zur Ablösung der Zellen) bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in vorgewärmtes Medium gegeben und auf neue gelatinisierte Gewebekulturschalen aufgeteilt. Die Zellen wurden jeweils im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet. Für die Koinkubationsversuche mit Thrombozyten wurden konfluente Endothelzellkulturen der 1. oder 2. Passage eingesetzt.

Identifizierung von Endothelzellen durch Färbung mit acetyliertem *low density lipoprotein* (LDL)

Die Identifizierung von Endothelzellen kann durch Aufnahme von acetyliertem LDL erfolgen (Voyta *et al.*, 1984). Hierzu wird acetyliertes LDL verwendet, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil (1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat) markiert ist. Das Lipoprotein wird von den Endothelzellen endozytotisch aufgenommen, durch lysosomale Enzyme degradiert und der Fluoreszenzfarbstoff in der intrazellulären Membran angehäuft. Die Zellen wurden für 4 h mit 10 µg/ml Dil-Ac-LDL in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen gemacht, die mit Phasenkontrastaufnahmen verglichen wurden.

5.7 Präparation der Thrombozytenproben für Koinkubationsversuche mit humanen Endothelzellen

Zitrat-antikoaguliertes Vollblut wurde mit 2 mM EDTA versetzt und daraus die Thrombozyten, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, aufgereinigt. Nach Resuspension der Thrombozyten in PBS mit 5,5 mM D-Glucose und 0,5% BSA wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn 1 mM MgCl₂ und 2 mM CaCl₂ zugesetzt. Die Stimulierung der

Thrombozyten wurde in silikonisierten Gefäßen durchgeführt, um zu verhindern, daß die aktivierten Thrombozyten an den Gefäßwänden haften bleiben. Um die Bildung von größeren Aggregaten zu vermeiden, wurden die Thrombozyten in Gegenwart von 1 mM RGDS stimuliert. RGDS ist ein kurzes Peptid aus dem Bindungsmotiv von Fibrinogen, das an den Fibrinogenrezeptor bindet und so die Quervernetzung und Aggregatbildung der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken verhindert. Die Thrombozyten wurden mit 0,5 U/ml Thrombin stimuliert und die Aktivierung nach 1 min mit 100 U/ml Heparin, das Thrombin inaktiviert, gestoppt. Anschließend wurden die Thrombozyten mit Zellkulturmedium mit 2% humanem Serum 1:10 auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml verdünnt. Die Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Analyse der Oberflächenexpression von P-Selektin, CD40L und der Fibrinogenbindung, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, überprüft. Für die Kontrollinkubation wurde eine Pufferkontrolle ohne Thrombozyten, die ansonsten die gleichen Inhaltsstoffe wie die Thrombozytenprobe enthielt, hergestellt.

5.8 Koinkubation von Endothelzellen und Thrombozyten

Die Koinkubation wurde mit konfluenten Endothelzellen der Passage 1 oder 2 in zwei Zellkulturschalen mit 15 cm Durchmesser, die aus einem gemeinsamen Pool von Zellen aufgeteilt worden waren, durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal kurz mit Zellkulturmedium mit 2% humanem Serum gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 15 ml der aktivierten Thrombozytenlösung oder mit 15 ml der Pufferkontrolle überschichtet und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Endothelzellen aufgereinigt.

5.9 Isolierung von RNA aus Endothelzellen

Nach Beendigung der Koinkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, um anhaftende Thrombozyten abzulösen. Dann wurden die Zellen mit RNAlater-Lösung, ein Reagenz, das RNasen inaktiviert und die Isolierung der RNA zu einem beliebigen Zeitpunkt nach dem Abstoppen erlaubt, bedeckt und für mindestens 10 min inkubiert. Vor der RNA-Isolierung wurde die Lösung entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Trizol-Reagenz (7,5 ml/15cm-Platte) auf der Platte lysiert, in ein 12ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer Spritze mit feiner Nadel (20 Gauge) homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 1/5 Volumen Chloroform und 1/10

Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,0 versetzt, gevortext, für 20 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 1 Volumen kalten Isopropanol (4°C) gemischt und 30 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der gefällten RNA mit 70% eiskaltem Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Das RNA-Pellet wurde dann in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit einem Photometer die optische Dichte bei 260 nm von einer geeigneten Verdünnung (1:100 bis 1:200) gemessen. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA / ml.

5.10 Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array

Prinzip

Bei den *Atlas Arrays* der Firma Clontech handelt es sich um auf Nylonmembranen immobilisierte cDNA-Arrays, mit deren Hilfe man die differentielle Genexpression von Gewebeproben oder von Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, analysieren kann. Der *Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array* enthält cDNAs von 1176 ausgewählten humanen Genen, die ein breites Spektrum des humanen Zellstoffwechsels abdecken, einige *Housekeeping*-Gene zur Normalisierung der Signale sowie Positiv- und Negativkontrollen. Eine vollständige Liste aller repräsentierten Gene wird mit den Arrays mitgeliefert. Jede cDNA ist in einem kreisförmigen Spot auf die Membran aufgetragen. Es wurden jeweils 10 ng cDNA pro Spot immobilisiert. Die cDNA-Fragmente sind zwischen 200 und 600 Basenpaaren (bp) lang und wurden aus Bereichen der mRNA vervielfältigt, die keine poly-A-Sequenzen, repetitive Elemente oder andere homologe Sequenzen enthalten. Der *Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array* enthält vier identische Membranen, die es ermöglichen, die differentielle Genexpression in bis zu vier verschiedenen Proben gleichzeitig zu untersuchen. Als Ausgangsmaterial wird die RNA aus den zu vergleichenden Proben aufgereinigt. Mit Hilfe eines genspezifischen Primergemisches, das speziell auf die Gene des Arrays abgestimmt ist, wird in einer reversen Transkriptionsreaktion aus jeder RNA-Probe eine radioaktiv markierte cDNA-Probe hergestellt. Jede dieser Proben wird mit einer der Membranen hybridisiert und die radioaktiven Signale anschließend mit einem

Phosphorimager oder Röntgenfilm detektiert. Durch Vergleich der Signalstärken der einzelnen Spots können Unterschiede in der Expressionsstärke der betreffenden Gene analysiert werden.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte gemäß der dem Array beiliegenden Anleitung. Die aus den Endothelzellen isolierte Gesamt-RNA (siehe Kapitel 5.9) wurde einer DNase-Behandlung mit dem *DNA-free Kit* von Ambion unterzogen, bevor sie für den Atlas Array eingesetzt wurde. Aus jeweils 4 µg Huvecs-Gesamt-RNA aus der Koinkubation mit den Thrombozyten und aus der Kontrollinkubation wurde mit 50 µCi [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol) radioaktiv markierte cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde anschließend durch Säulenchromatographie von den noch freien Nukleotiden getrennt. Die Gesamtstrahlungsintensität der cDNA-Proben lag bei 2 - 10 x 10⁶ cpm (*counts per minute*). Zwei Atlas Array-Membranen wurden mit Heringssperma-DNA vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, und dann über Nacht mit je einer der beiden radioaktiven cDNA-Proben hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mehrmals gewaschen und anschließend mit Röntgenfilmen für verschiedene Zeiträume (mehrere Stunden bis Tage) exponiert. Für die Auswertung wurden die Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Spots auf den Röntgenfilmen zwischen beiden Proben verglichen.

5.11 Northern Blot

Lösungen

1%-Agarosegel:

Agarose	1,5 g
H ₂ O	132 ml
10x MOPS	15 ml
37% Formaldehyd	2,8 ml

Elektrophoresepuffer:

1x MOPS

RNA-Ladepuffer:

Formamid	720 µl	
10x MOPS	160 µl	
37% Formaldehyd	260 µl	
H ₂ O	193 µl	
6x Ladepuffer	267 µl	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989, Vol. 1, Seite 6.12)
37% Formaldehyd (bei -20°C lagern)	2,8 ml	

Transferpuffer:

20x SSC

Hybridisierungslösung:

20x SSC	3 ml
50x Denhardt's Lösung	1 ml
10% SDS	0,5 ml
deionisiertes Formamid	5 ml
H ₂ O	0,5 ml
(frisch ansetzen)	

Waschpuffer 1:

2x SSC, 0,1% SDS

Waschpuffer 2:

0,2x SSC, 0,1% SDS

Stripping-Puffer:

0,1% SDS, 10 mM EDTA

Herstellung radioaktiver Oligonukleotidsonden

Mit geeigneten Primern wurden Oligonukleotide, die 400 bis 500 Basenpaare des Zielgens umfassen, aus humanen cDNA-Bibliotheken mittels Standard-PCR herausamplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem 2%-Agarosegel mit Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989) aufgetrennt, mit einem QIAGEN *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel eluiert und mit einem *TA-Cloning Kit* von Invitrogen in *E. coli* kloniert. Aus 50 ml Bakterienkultur wurde das Plasmid mit einem QIAGEN *Plasmid Midi Kit* isoliert und das Oligonukleotid mit Restriktionsenzymen wieder herausgeschnitten. Für alle diese Schritte wurden die Standardprotokolle entsprechend der Gebrauchsanweisungen verwendet.

Für die radioaktive Markierung der Oligonukleotidsonden wurde das *Prime It II Random Primer Labeling Kit* von Stratagene benutzt. Für eine Reaktion wurden 25 ng der Sonde und 50 μCi [α - ^{32}P]dATP eingesetzt. Die radioaktive Sonde wurde anschließend durch Gelfiltration über G-50 Sephadex-Säulen von den freien Nukleotiden getrennt. Die Proben wiesen eine Aktivität von 0,5 - $1 \cdot 10^5$ cpm auf.

Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembranen

Der Northern Blot wurde nach der Standardmethode nach Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Die RNA-Proben wurden in 1%-Agarosegelen mit 0,7% Formaldehyd aufgetrennt. Aufgetragen wurden jeweils 10 μg der Gesamt-RNA. Die Gelelektrophorese erfolgte für 3 - 4 h bei 60 V. Die RNA wurde über Nacht auf ein passendes Stück Hybond N⁺-Membran transferiert. Mit einem UV-Crosslinker wurde die RNA auf der Membran fixiert.

Hybridisierung

Die Membran mit der RNA wurde für 1 - 3 h bei 42°C mit 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringssperma-DNA in Hybridisierungslösung vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Für die Hybridisierung wurde die radioaktive Probe 5 min bei 95°C aufgekocht, zu der Prähybridisierungslösung hinzugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot mehrmals gewaschen und dann auf einem Röntgenfilm in einer Kassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

Strippen von Northern Blots

Um die radioaktive Probe von der Membran zu entfernen, wurden die Blots 30 min bei 80°C in Stripping-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Blot für eine neue Hybridisierung eingesetzt. Ein Northern Blot wurde für bis zu drei verschiedene Hybridisierungen verwendet.

6 *ERGEBNISSE*

6.1 *Durchflußzytometrische Analyse der VASP-Phosphorylierung*

6.1.1 *Etablierung der Methode*

Es wurde eine durchflußzytometrische Analysenmethode entwickelt, die eine schnelle und einfache Bestimmung der thrombozytären VASP-Phosphorylierung als Marker für die Hemmung der Thrombozytenfunktion erlaubt. Da die Durchflußzytometrie zuvor noch nicht für die Messung einer spezifischen intrazellulären Proteinphosphorylierung eingesetzt worden war, wurden die Messungen zunächst mit Ergebnissen aus der allgemein anerkannten Methode des Western Blots verglichen, um die durchflußzytometrische Methode zu etablieren. Der phosphorylierungsspezifische monoklonale Antikörper 16C2, der nur die Serin-239-phosphorylierte Form von VASP erkennt, bildete die Detektionsgrundlage für beide Methoden. Gewaschene Thrombozyten wurden mit Natriumnitroprussid (SNP) oder Prostaglandin E₁ (PG-E₁) inkubiert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten parallel für Durchflußzytometrie und Western Blot aufgearbeitet. Die Proben für die Durchflußzytometrie wurden sofort mit Formaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit dem Antikörper 16C2 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt, wie in Kapitel 5.4 beschrieben. Abbildung 6.1 zeigt exemplarisch die Primärdaten einer Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit 100 µM SNP. In Teil a. der Abbildung sind die Histogramme aus der Messung im Durchflußzytometer dargestellt. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität, auf der Ordinate die Anzahl der Zellen aufgetragen. Man erkennt mit fortschreitender Inkubationsdauer eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten hin zu höheren Werten; hierbei ist die logarithmische Skalierung der Abszisse zu beachten. Bei der Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenz der Kontrollfärbung ohne Erstantikörper von den berechneten Mittelwerten abgezogen. Abbildung 6.1b. zeigt den zugehörigen Western Blot. Die Doppelbanden bei 3 min und 5 min resultieren aus der Phosphorylierung von VASP sowohl an Serin-157 als auch an Serin-239. Die Phosphorylierung an Serin-157 führt zu einer Änderung des Laufverhaltens von VASP in SDS-Polyacrylamidgelen, die das Protein von der 46 kDa-Bande auf die 50 kDa-Bande verschiebt. Der Antikörper 16C2 bindet unabhängig von der Phosphorylierung des Serin-157. Er detektiert also an Serin-239 phosphoryliertes VASP in beiden Banden. Der untere Western Blot wurde mit dem Antikörper M4, der unabhängig

von einer Phosphorylierung an VASP bindet, gefärbt. Dieser Blot diente dem Nachweis, daß alle Proben die gleiche Menge an VASP enthielten. Die Identität der Thrombozytenpopulation im Durchflußzytometer wurde durch Färbung mit einem Antikörper gegen das thrombozytenspezifische Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kontrolliert (Abbildung 6.1c.). In weiteren Analysen wurden die Thrombozyten anhand der Koordinaten in der FSC-SSC-Auftragung identifiziert.

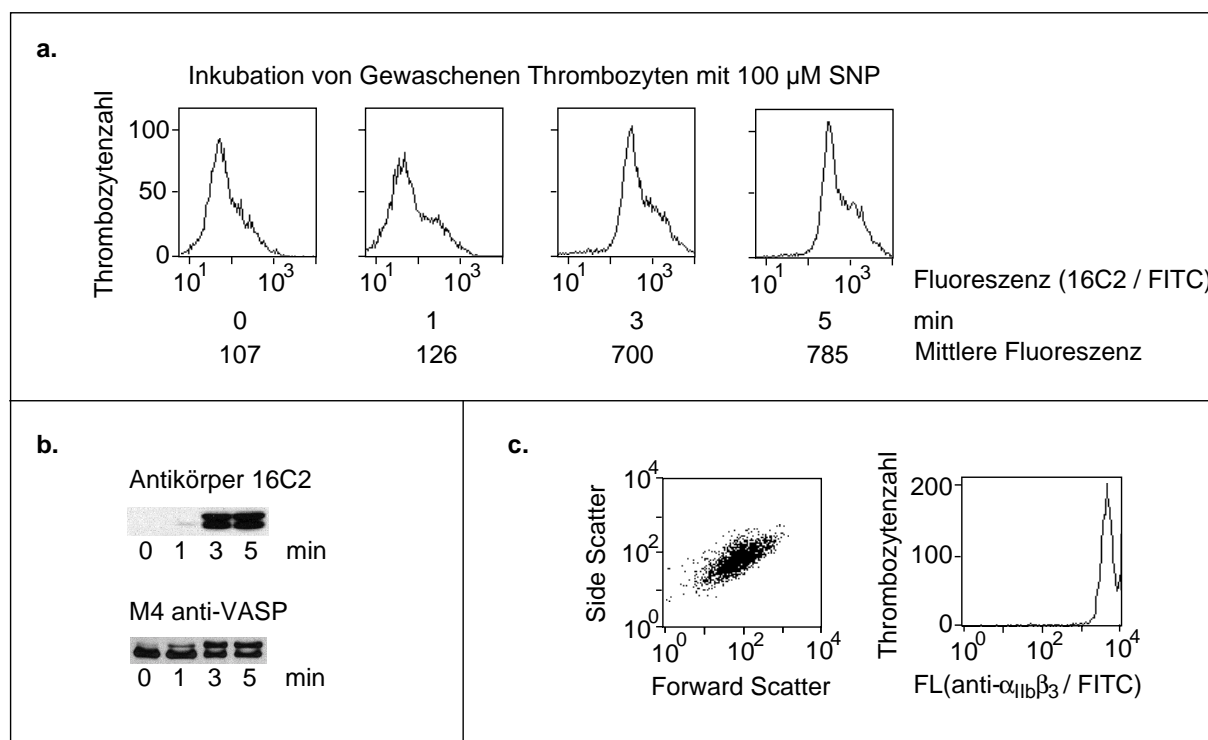


Abbildung 6.1: Primärdaten einer Messung der VASP-Phosphorylierung in gewaschenen humanen Thrombozyten nach Stimulation mit 100 μM SNP; a. Histogramme aus der Analyse im Durchflußzytometer; b. Western Blot, gefärbt mit dem phosphorylierungsspezifischen anti-VASP-Antikörper 16C2 (oben) und dem phosphorylierungsunabhängigen anti-VASP-Antikörper M4 (unten) c. Kontrollfärbung der Thrombozytenpopulation im Durchflußzytometer mit einem Antikörper gegen das thrombozytenspezifische Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Um die Spezifität der durchflußzytometrischen Analyse der VASP-Phosphorylierung zu belegen, wurde der Antikörper 16C2 mit einem von zwei Peptiden vorinkubiert, die beide der Erkennungssequenz des Antikörpers entsprechen (humanes VASP, Aminosäuren 232 bis 246) und sich nur in der Phosphorylierung des Serins-239 unterscheiden. Die Peptide wurden in 200-fachem molarem Überschuß zu dem Antikörper dazugegeben. Die Antikörper-Peptid-Gemische wurden dann in der Durchflußzytometrie eingesetzt, um die VASP-

Phosphorylierung in einer Thrombozytenprobe zu bestimmen, die für 3 min mit 10 μ M PG-E₁ inkubiert worden war. Das Serin-239-phosphorylierte Peptid blockierte die Bindung des Antikörpers vollständig und reduzierte die Fluoreszenzintensität auf einen Wert, der vergleichbar mit der Messung ohne Erstantikörper ist (vergleiche Abbildung 6.2a. und b.). Das Kontrollpeptid ohne Phosphorylierung hatte hingegen keinen Einfluß auf das Meßsignal (vergleiche Abbildung 6.2c. und d.). Messungen mit einem unspezifischen Kontrollantikörper des gleichen Isotyps wie Antikörper 16C2 (Isotypkontrolle) lieferten ebenfalls Signale der gleichen Stärke wie die Messungen ohne Erstantikörper (Daten nicht gezeigt).

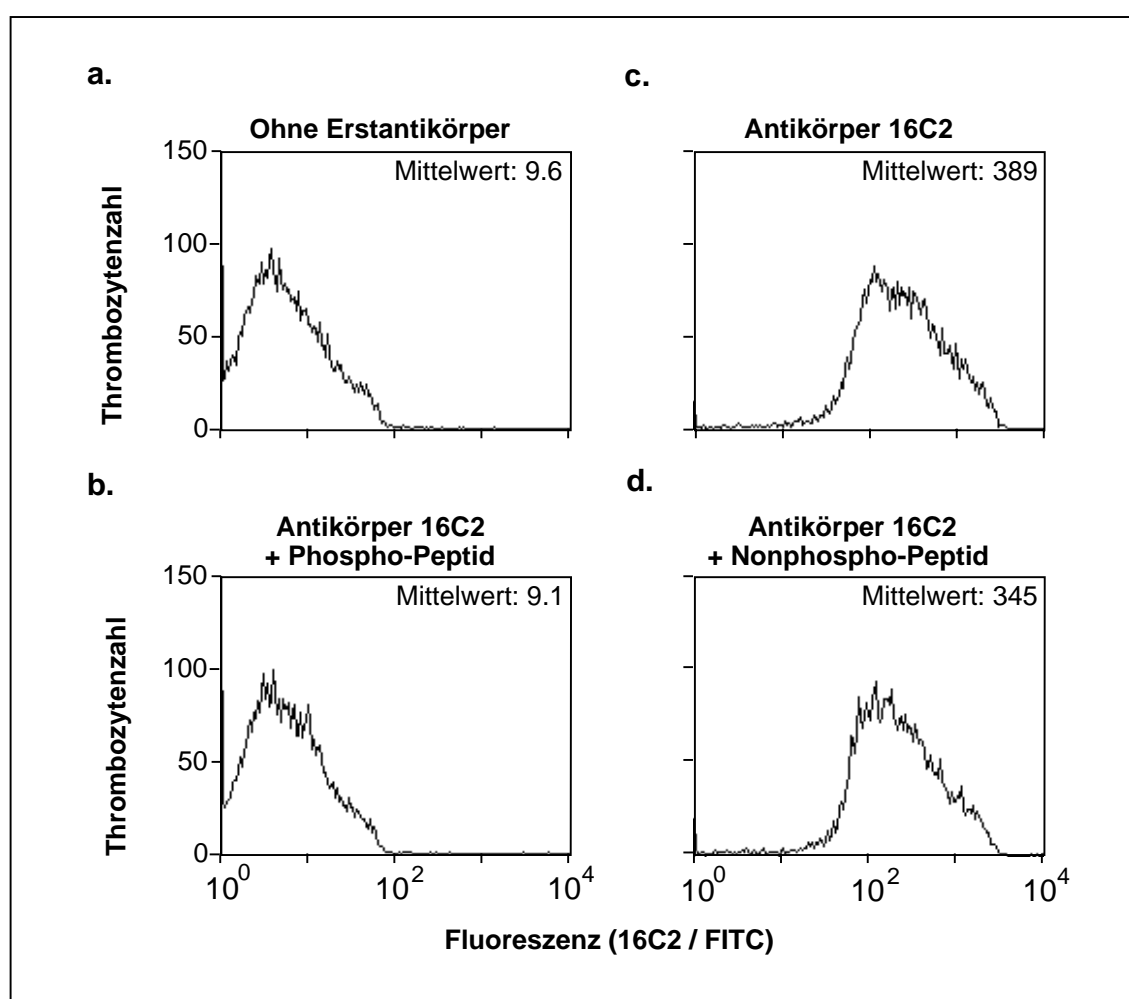


Abbildung 6.2: Spezifität der durchflußzytometrischen Analyse der Serin-239-Phosphorylierung von VASP. Gewaschene Thrombozyten wurden 3 min mit 10 μ M PG-E₁ inkubiert, fixiert und für die Durchflußzytometrie aufbereitet. Vor der Antikörperinkubation wurde die Probe in vier identische Teile aufgeteilt. a. Färbung ohne Erstantikörper, b. Färbung mit Antikörper 16C2 + Phospho-Peptid, c. Färbung mit Antikörper 16C2, d. Färbung mit Antikörper 16C2 + Nonphospho-Peptid. Es sind jeweils die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten angegeben.

Um die Ergebnisse aus der Durchflußzytometrie mit denen aus Western Blot-Analysen zu vergleichen, wurden gewaschene Thrombozyten mit 100 μM SNP oder 10 μM PG-E₁ inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Die identischen Proben wurden parallel für die Durchflußzytometrie und den Western Blot aufgearbeitet. Aus den Histogrammen der Durchflußzytometrie wurden die mittleren Fluoreszenzwerte bestimmt, und die Autoradiogramme der Western Blots wurden eingescannt und die Bandenstärke mit der Software NIH Image analysiert. Diese Ergebnisse wurden vergleichend in Abbildung 6.3 aufgetragen. Sie zeigen eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Methoden. Ähnlich gute Übereinstimmungen wurden für Versuche im PRP und für Inkubationen mit niedrigeren Konzentrationen der Vasodilatoren (1 μM SNP, 10 nM PG-E₁) sowie mit membranpermeablen cGMP- und cAMP-Analoga (1 mM 8-pCPT-cGMP, 1 mM cBIMPS) gefunden (Daten nicht gezeigt).

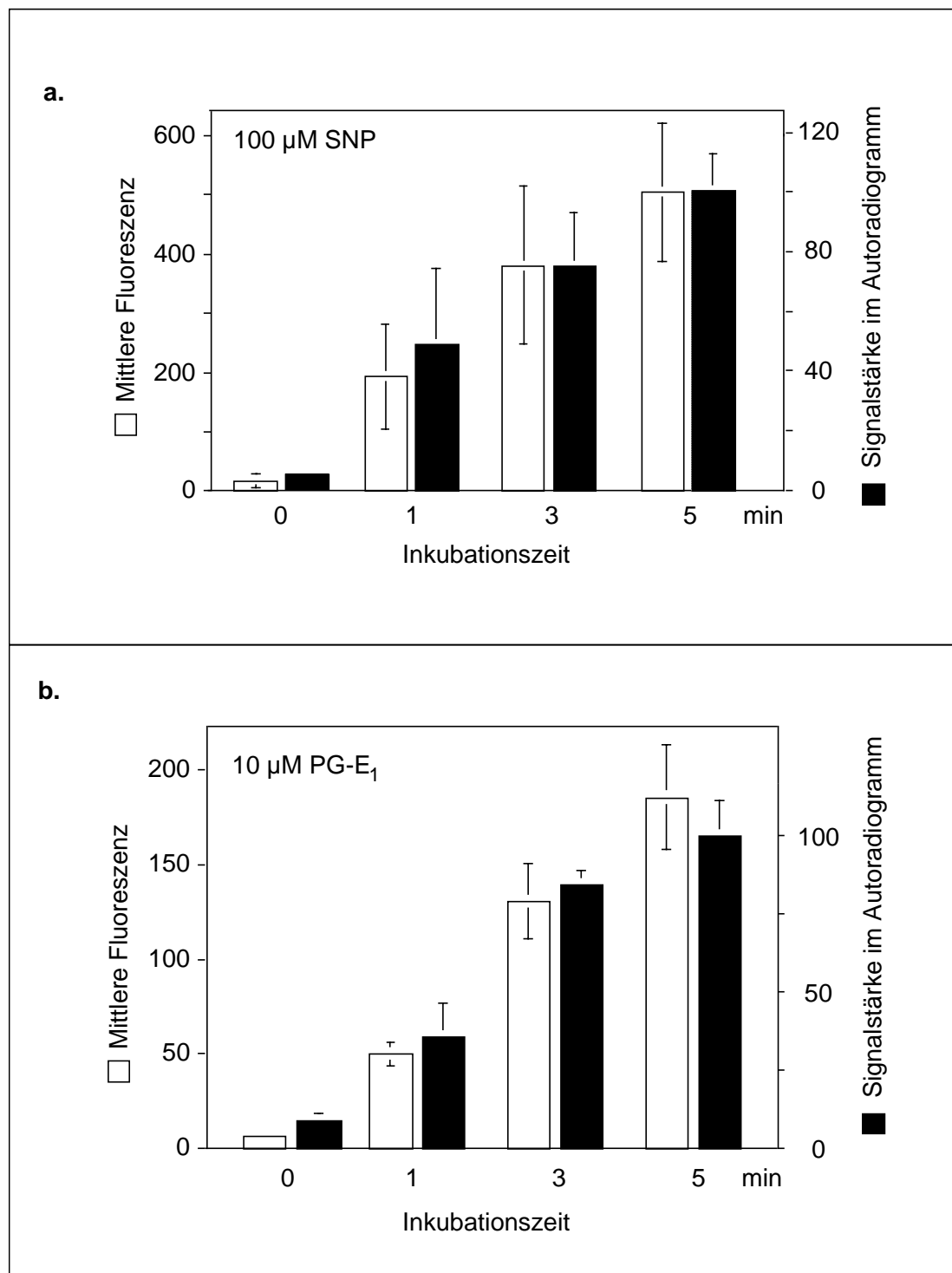


Abbildung 6.3: Durchflußzytometrie und Western Blot im Vergleich. Analysiert wurde die VASP-Phosphorylierung in gewaschenen humanen Thrombozyten zu verschiedenen Zeitpunkten a. nach Inkubation mit 100 µM SNP und b. nach Inkubation mit 10 µM PG-E₁. Die hellen Balken zeigen die Ergebnisse der Durchflußzytometrie, die dunklen Balken die der Western Blots. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Ein großer Vorteil der Durchflußzytometrie gegenüber anderen Methoden ist, daß sie problemlos im Vollblut angewendet werden kann. Um zu zeigen, daß dies auch für die Analyse der thrombozytären VASP-Phosphorylierung gilt, wurde diese Methode in Experimenten mit Vollblutproben eingesetzt. Mit Zitratlösung stabilisiertes Vollblut wurde mit 100 μM SNP, 1 mM 8-pCPT-cGMP oder 10 μM PG-E₁ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben mit Formaldehyd fixiert und wie in Kapitel 5.4 beschrieben für die Analyse im Durchflußzytometer aufbereitet. 100 μM SNP führte im Vollblut im Vergleich zu gewaschenen Thrombozyten (siehe Abbildung 6.3a.) nur zu einer recht schwachen VASP-Phosphorylierung (Abbildung 6.4). Auch die dreifache Menge an SNP im Vollblut zeigte keinen nennenswerten Anstieg der VASP-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf im Vollblut enthaltenes freies Hämoglobin zurückzuführen, welches das von SNP freigesetzte NO bindet. Die Konzentration an freiem Hämoglobin in der PRP-Fraktion der Vollblutproben wurde auf $0,53 \pm 0,04$ g/l bestimmt (Mittelwert \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Messungen). Das membranpermeable cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP sowie PG-E₁ führten hingegen zu einem vergleichbar starken Anstieg der VASP-Phosphorylierung wie in gewaschenen Thrombozyten (Abbildung 6.4). Die Ergebnisse zeigen, daß die Analysenmethode auch für Messungen im Vollblut geeignet ist.

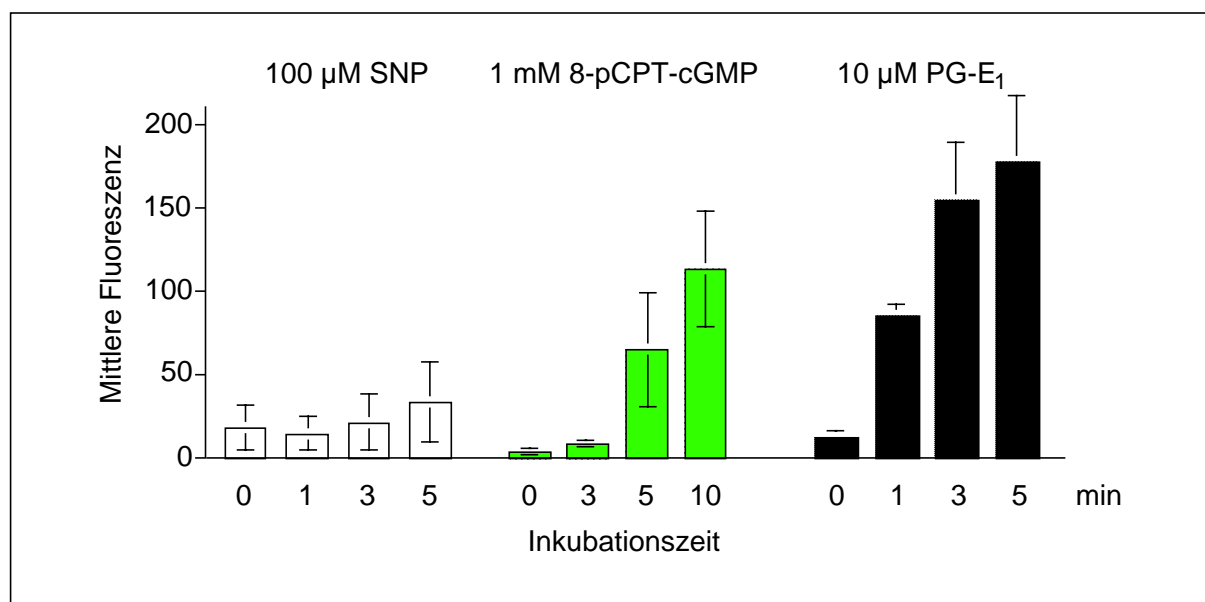


Abbildung 6.4: Analyse der VASP-Phosphorylierung im Vollblut. Zitrat-stabilisiertes Vollblut wurde mit 100 μM SNP, 1 mM 8-pCPT-cGMP oder 10 μM PG-E₁ inkubiert, und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde im Durchflußzytometer die VASP-Phosphorylierung in den Thrombozyten analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz als Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

6.1.2 Messung der durch Endothelzellefaktoren induzierten VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten

Vollblut wurde mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (Huvecs) koinkubiert, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, um die Effekte der von den Endothelzellen sezernierten Faktoren auf die Thrombozyten zu messen. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde ein Anstieg der VASP-Phosphorylierung von einem mittleren Fluoreszenzwert von $13,2 \pm 6,3$ basal auf bis zu $124,9 \pm 22,1$ nach 5 min gemessen. Durch Vorinkubation der Endothelzellen mit $10 \mu\text{M}$ Indomethacin, einem Cyclooxygenase-Inhibitor, welcher die Bildung von PG-I_2 hemmt, konnte dieser Effekt fast vollständig aufgehoben werden (Abbildung 6.5). Indomethacin allein hatte keinen Einfluß auf die VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten (Daten nicht gezeigt).

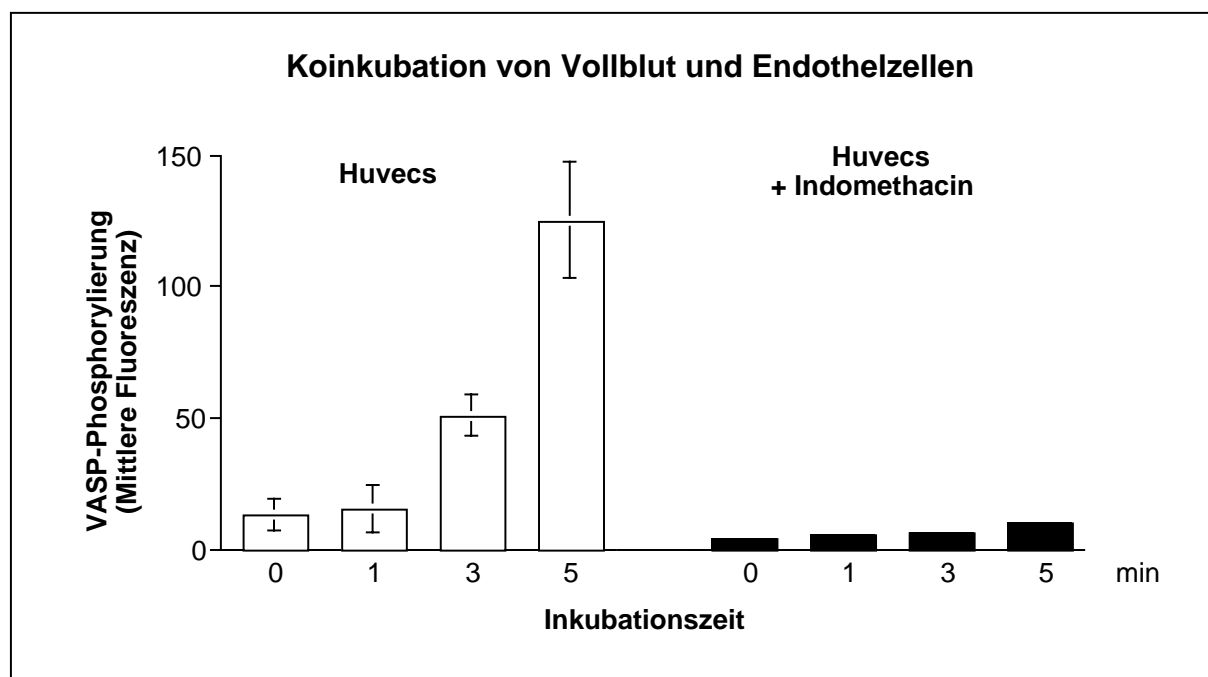


Abbildung 6.5: VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten nach Koinkubation von Vollblut mit kultivierten humanen Endothelzellen (Huvecs). Die Endothelzellen im rechten Teil der Abbildung wurden für 1 h mit $10 \mu\text{M}$ Indomethacin vorinkubiert. Die Vollblutproben wurden fixiert und für die Analyse der VASP-Phosphorylierung im Durchflußzytometer aufbereitet. Links sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen gezeigt, rechts die Daten eines repräsentativen Einzelversuches.

6.1.3 Funktionelle Analyse von G_i - und G_s -gekoppelten Membranrezeptoren

Die durchflußzytometrische Bestimmung der VASP-Phosphorylierung wurde eingesetzt, um Rezeptoren auf Thrombozyten und ihre nachgeschalteten intrazellulären Signalmechanismen zu untersuchen. Um Effekte der Aktivatoren Epinephrin, ADP und TxA_2 auf die VASP-Phosphorylierung zu messen, wurde PRP für 3 min mit Puffer, 55 μM Epinephrin, 20 μM ADP oder 1 μM des TxA_2 -Analoges U46619 in der Gegenwart oder Abwesenheit von 3 μM PG-E_1 inkubiert. Epinephrin, U46619 oder ADP allein hatten keinen Einfluß auf die VASP-Phosphorylierung (Abbildung 6.6, Western Blot Spalte 3 und weißes Histogramm). Die Inkubation mit PG-E_1 allein induzierte starke VASP-Phosphorylierung (Abbildung 6.6, Western Blot Spalte 2 und schwarzes Histogramm). Die Koinkubation mit Epinephrin oder ADP und PG-E_1 führte zu einer nahezu kompletten Hemmung der VASP-Phosphorylierung (Abbildung 6.6a. und c., Western Blot Spalte 4 und graues Histogramm). U46619 zeigte diesen Effekt nicht (Abbildung 6.6b.). Diese Effekte lassen sich mit der verschiedenen G-Protein-Kopplung der einzelnen Rezeptoren erklären. Der Epinephrin- und einer der ADP-Rezeptoren, aber nicht der TxA_2 -Rezeptor, aktivieren inhibitorische G_i -Proteine, welche die Adenylylzyklase hemmen (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.3). Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse der VASP-Phosphorylierung lassen sich außerdem, wie im folgenden Kapitel beschrieben, schnell und einfach Rezeptordefekte oder die Wirksamkeit von Medikamenten, die an diesen Rezeptoren eingreifen, untersuchen.

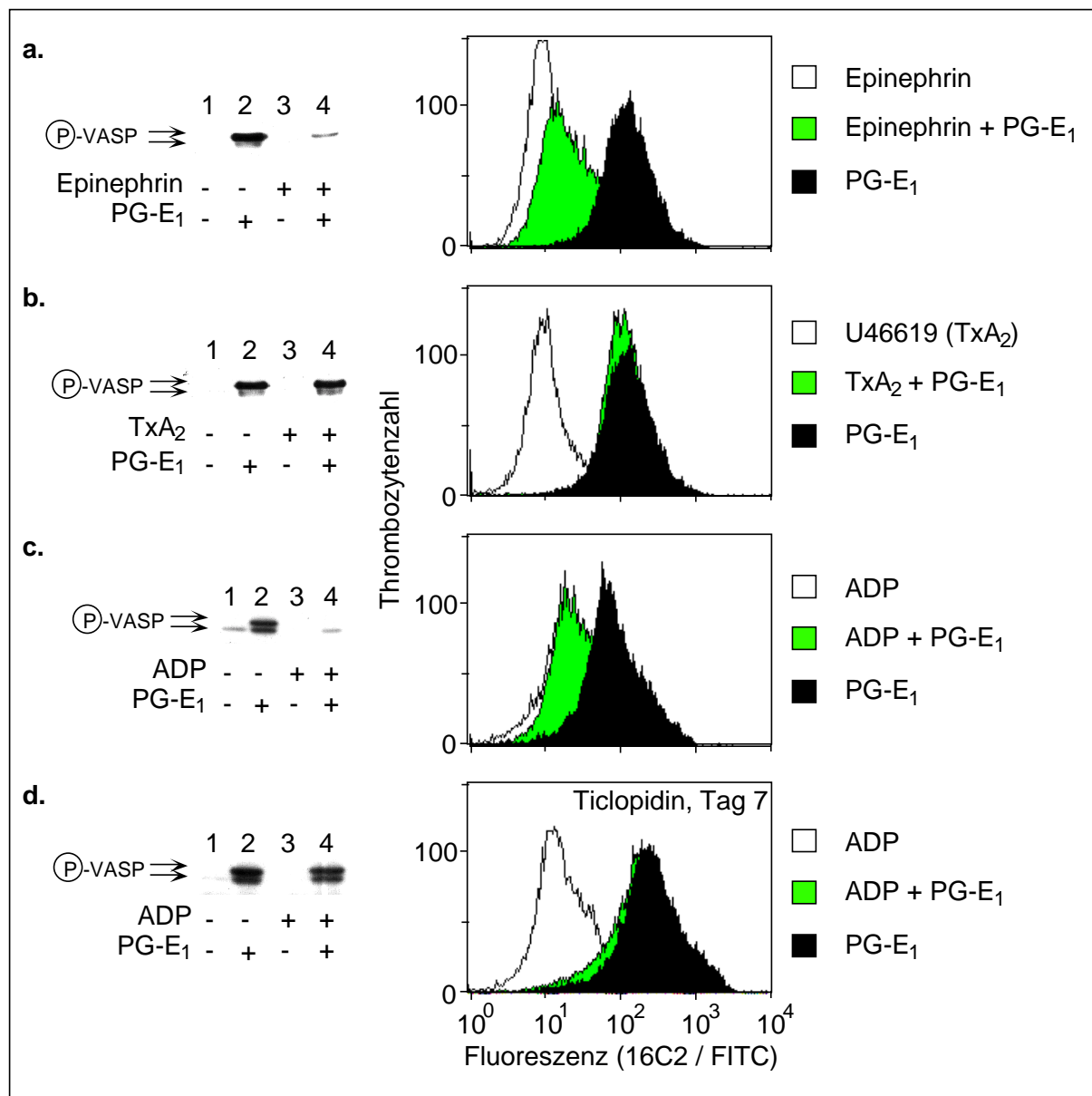


Abbildung 6.6: Analyse der Rezeptor-regulierten intrazellulären VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten. PRP wurde für 3 min mit PG-E₁ mit oder ohne 55 μM Epinephrin, 1 μM U46619 oder 20 μM ADP inkubiert (a. bis c.) und im Western Blot und in der Durchflußzytometrie auf VASP-Phosphorylierung analysiert. Abschnitt d. zeigt die Effekte einer siebentägigen Ticlopidinbehandlung (500 mg/Tag) auf die ADP-induzierte Hemmung der PG-E₁-stimulierten VASP-Phosphorylierung.

6.1.4 Wirksamkeitsnachweis der thrombozytenhemmenden Medikamente *Ticlopidin und Clopidogrel in vivo*

Ticlopidin und Clopidogrel sind Thienopyridinderivate, die in der antithrombotischen Therapie eingesetzt werden und die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation nahezu komplett hemmen. Sie wirken selektiv auf den P2Y₁₂ (P2Y_{AC}) ADP-Rezeptor, der über G_i-Proteine die Adenylzyklase hemmt (Abbildung 3.2). Die Einnahme von Ticlopidin oder Clopidogrel sollte daher den hemmenden Effekt von ADP auf die PG-E₁-induzierte VASP-Phosphorylierung aufheben. Zwei Freiwillige wurden für sieben Tage mit 500 mg Ticlopidin pro Tag behandelt. Vor Beginn der Einnahme sowie zu mehreren Zeitpunkten während und nach der Einnahme wurde den Probanden sowie einer unbehandelten Kontrollperson Blut abgenommen und das daraus gewonnene PRP für 3 min mit 5 µM ADP, 30 nM PG-E₁ oder 5 µM ADP und 30 nM PG-E₁ gleichzeitig inkubiert und die VASP-Phosphorylierung durchflußzytometrisch bestimmt. In Tabelle 6.1 sind die Ergebnisse der Ticlopidin-Studie zusammengefasst. Dargestellt ist der Quotient aus der mittleren Fluoreszenz nach Inkubation mit ADP und PG-E₁ und der mittleren Fluoreszenz nach Inkubation allein mit ADP ($F_{ADP+PG-E_1}/F_{ADP}$). Ein Wert von 1,0 und niedriger bedeutet komplette Hemmung der PG-E₁-induzierten VASP-Phosphorylierung durch ADP. Ein Wert größer 1,0 bedeutet, daß PG-E₁ trotz Gegenwart von ADP eine meßbare VASP-Phosphorylierung induziert. Nach vier Tagen Einnahme von Ticlopidin war die ADP-regulierte Hemmung der PG-E₁-induzierten VASP-Phosphorylierung bereits gehemmt und ein deutlicher Anstieg der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Beginn der Behandlung war meßbar. Der Effekt durch Ticlopidin erreichte seinen Höhepunkt je nach Proband zwischen Tag 4 und Tag 10. Die Kontrollperson zeigte während des gesamten Zeitverlaufes eine komplette Hemmung der VASP-Phosphorylierung durch ADP. In Abbildung 6.6d. sind die Originaldaten für Proband 1 an Tag 7 der Ticlopidin-Einnahme gezeigt. In den Durchflußzytometriedaten ist das Histogramm mit ADP und PG-E₁ fast deckungsgleich mit dem Histogramm für PG-E₁ allein.

Tabelle 6.1: Effekte auf die VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten bei Einnahme von Ticlopidin

	Kontrollperson	Proband 1	Proband 2
Tag 0	1,0	1,6	0,9
Tag 2	1,1	1,5	0,8
Tag 4	0,8	7,9	1,2
Tag 7	1,2	4,9	1,8
Tag 10	1,1	4,8	2,2
Tag 14	1,0	3,9	1,5
Tag 18	n. b.*	1,8	1,4
Tag 25	0,9	1,2	0,9

* n. b.: nicht bestimmt

In einer Folgestudie wurden fünf gesunde Probanden für sieben Tage mit 75 mg Clopidogrel pro Tag behandelt. Vor Beginn der Einnahme, an Tag 7 der Einnahme und vier Wochen nach Beendigung der Einnahme wurde den Probanden Blut abgenommen und die VASP-Phosphorylierung wie oben beschrieben analysiert. Abbildung 6.7 zeigt, daß vor Beginn und vier Wochen nach Beendigung der Clopidogrel-Einnahme die PG-E₁-induzierte VASP-Phosphorylierung durch ADP komplett gehemmt wurde. Während der Behandlung war dieser Hemmeffekt bei den verschiedenen Probanden in unterschiedlich großem Ausmaß beeinträchtigt. Abbildung 6.7a. zeigt die Einzeldaten der fünf Probanden, Abbildung 6.7b. die Mittelwerte mit Standardfehlern dieser Studie.

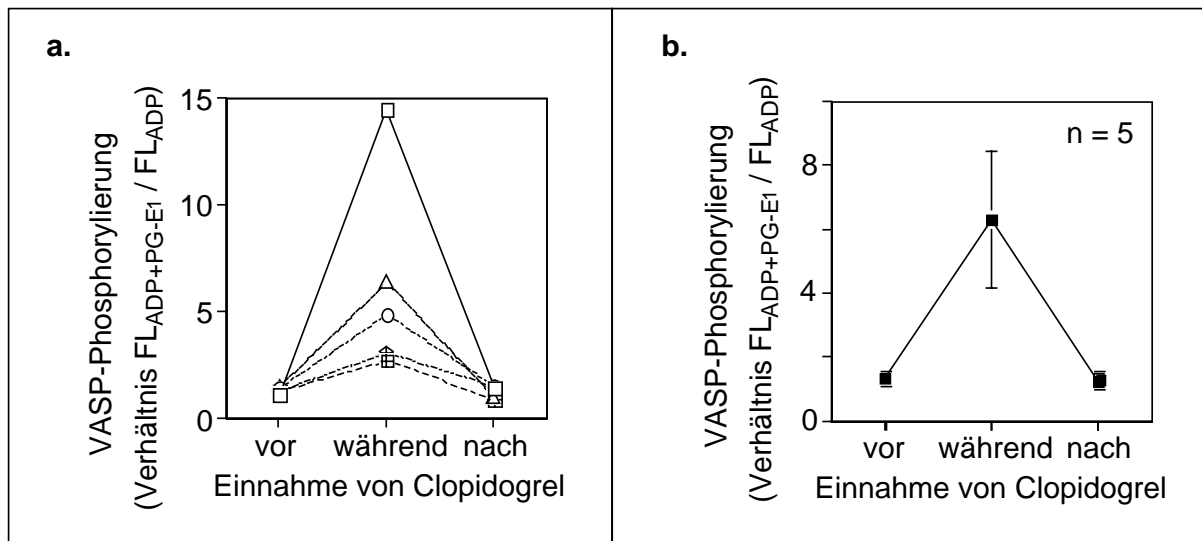


Abbildung 6.7: Effekte von Clopidogrel auf die durch ADP stimulierte Hemmung der PG-E₁-induzierten VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten. 5 Probanden wurden für 7 Tage mit 75 mg Clopidogrel pro Tag behandelt. Vor, während und 4 Wochen nach Beendigung der Einnahme wurden Blutproben entnommen und wie in Kapitel 5.3 beschrieben die Hemmeffekte von ADP auf die VASP-Phosphorylierung untersucht. Dargestellt sind die Quotienten aus der Fluoreszenz nach Stimulierung mit ADP + PG-E₁ und der Fluoreszenz nach Stimulierung mit ADP allein. Werte größer 1,0 zeigen eine Aufhebung der Hemmeffekte durch ADP an. Teil a. zeigt die Einzeldaten der 5 Probanden, Teil b. die daraus errechneten Mittelwerte mit Standardfehlern.

In den beiden Studien mit Ticlopidin und Clopidogrel wurden zwischen den Probanden starke Schwankungen im Antwortverhalten auf die beiden Medikamente gemessen (Tabelle 6.1 und Abbildung 6.7). Außerdem wurde bei zwei Personen eine Resistenz gegen diese Medikamente gefunden, d.h. der Hemmeffekt durch ADP auf die VASP-Phosphorylierung wurde durch Clopidogrel nicht aufgehoben (Abbildung 6.8b.). Diese Ergebnisse deckten sich mit Messungen der Thrombozytenaggregation nach Stimulierung mit ADP, die ebenfalls keine Hemmung aufwiesen. Bei einer Patientin unter Clopidogrel-Behandlung, bei der ein Verdacht auf Unwirksamkeit dieses Medikamentes bestand, konnte diese Vermutung durch die hier entwickelte Analysenmethode der VASP-Phosphorylierung bestätigt werden (Abbildung 6.8c.). Trotz Clopidogrel-Einnahme reduzierte ADP die PG-E₁-induzierte VASP-Phosphorylierung auf den Basalwert.

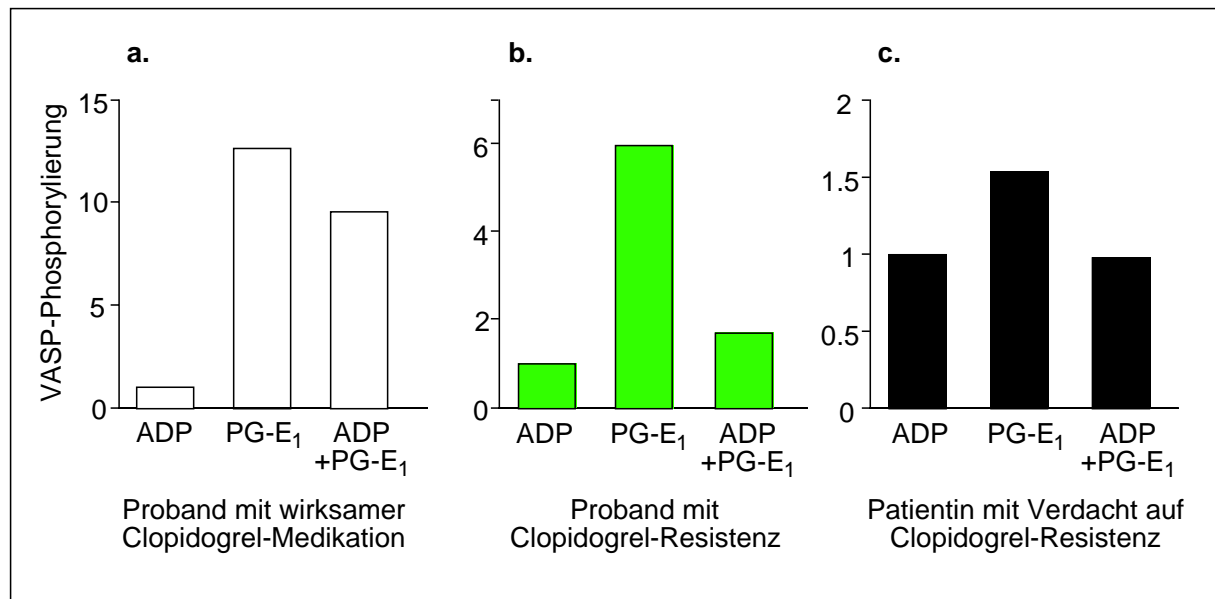


Abbildung 6.8: Wirksamkeitsnachweis von Clopidogrel anhand der durchflußzytometrischen Analyse der VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten. Die beteiligten Personen nahmen 75 mg Clopidogrel / Tag ein. Die VASP-Phosphorylierung wurde wie in Kapitel 5.3 beschrieben analysiert. Der Wert für die VASP-Phosphorylierung nach Stimulierung mit ADP allein wurde gleich 1,0 gesetzt.

6.1.5 Anwendung der Durchflußzytometrie für die Messung der Phosphorylierung der p42 MAPK in humanen Thrombozyten

Um zu zeigen, daß die Anwendung der hier entwickelten Methode nicht auf die Messung der VASP-Phosphorylierung beschränkt ist, wurde ein weiteres Protokoll für die Messung der Phosphorylierung der p42 und p44 MAPK entwickelt (Abbildung 6.9). Die Detektion beruht auf dem monoklonalen Antikörper 12D4, der das TXY-Phosphorylierungsmotiv der p42 und p44 MAPK nur in der zweifach phosphorylierten Form erkennt. Gewaschene humane Thrombozyten wurden für 30 s mit Puffer oder 20 μ M ADP stimuliert, fixiert und permeabilisiert und nach Färbung mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper 12D4 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper im Durchflußzytometer analysiert. Gemessen wurde ein Anstieg der mittleren Fluoreszenz von $17,1 \pm 1,1$ in der Kontrolle auf $39,0 \pm 6,6$ in der ADP-stimulierten Probe (Abbildung 6.9).

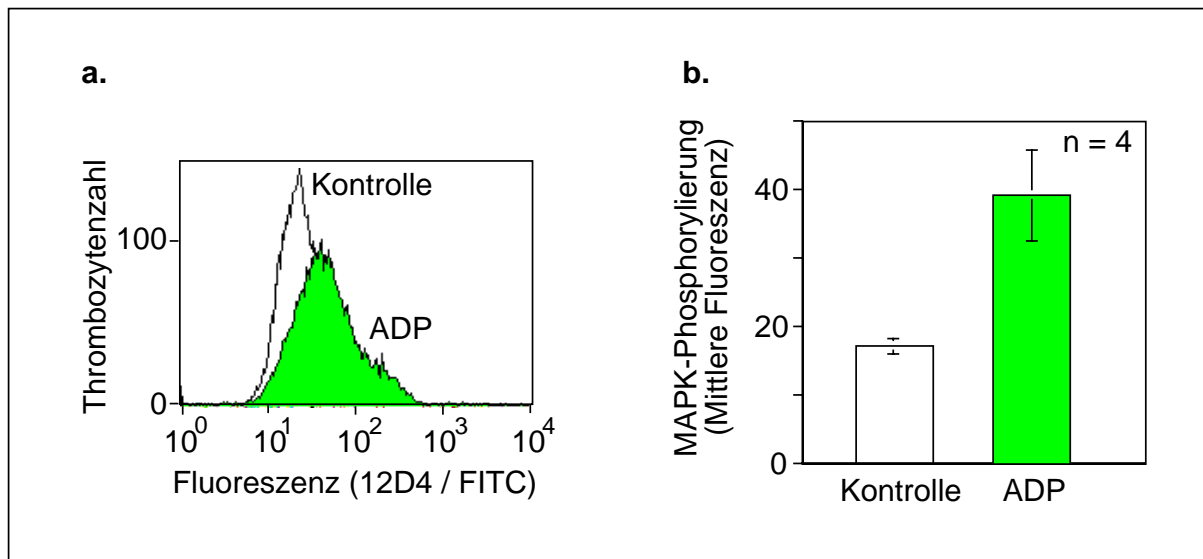


Abbildung 6.9: Durchflußzytometrische Analyse der Phosphorylierung der p42/p44 MAPK in humanen Thrombozyten. PRP wurde für 30 s mit Puffer (Kontrolle) oder 20 μ M ADP inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper 12D4 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt. a. Originalhistogramme eines Einzelversuchs. b. Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Versuchen.

6.2 Aktivierung und Hemmung der thrombozytären MAPK-Signalwege

6.2.1 Aktivierung der p42 MAPK und p38 MAPK durch Thrombozyten-aktivatoren

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen besitzen eine Sequenz mit zweifachem Phosphorylierungsmotiv (TXY-Motiv), das bei der p42 MAPK den Aminosäuren 185 bis 187, bei der p44 MAPK den Aminosäuren 202 bis 204 und bei der p38 MAPK den Aminosäuren 180 bis 182 entspricht. Für die Aktivierung der MAP Kinasen ist die gleichzeitige Phosphorylierung an beiden Stellen erforderlich (Rossomando *et al.*, 1989). Seit Antikörper, die an die MAPK nur in der zweifach phosphorylierten Form binden, kommerziell erhältlich sind, besteht die Möglichkeit, die Aktivierung der MAPK durch Messung der Phosphorylierung zu bestimmen. Der monoklonale Antikörper 12D4, der die aktivierte Form sowohl der p42 MAPK als auch der p44 MAPK erkennt, und ein polyklonaler Antikörper gegen die aktivierte Form der p38 MAPK wurden hier für Western Blot-Analysen eingesetzt, um die Rolle der MAPK in Thrombozyten näher zu untersuchen. Zunächst wurde

untersucht, wie verschiedene Thrombozytenaktivatoren die Phosphorylierung der MAPK beeinflussen. Gewaschene Thrombozyten wurden für 2 min mit Puffer, 0.5 U/ml Thrombin, 2 μ M U46619 oder 30 μ M ADP inkubiert und für die Western Blot-Analyse abgestoppt (Abbildung 6.10). Unstimulierte Thrombozyten (Kontrolle) zeigten keine signifikante Phosphorylierung der p42 MAPK und nur eine leichte Phosphorylierung der p38 MAPK. Thrombin induzierte eine starke Phosphorylierung der p42 MAPK. Die Inkubation mit 2 μ M des TxA₂-Analog U46619 erreichte etwa 45% des Thrombin-Effektes, während 30 μ M ADP nur eine schwache Phosphorylierung der p42 MAPK (18% des Thrombin-Effektes) induzierte. Bei der p44 MAPK wurde mit keinem der Aktivatoren eine Phosphorylierung detektiert (Abbildung 6.10a. oberer Western Blot). Die Phosphorylierung der p38 MAPK war ebenfalls nach Inkubation mit Thrombin maximal. Durch Stimulation mit 2 μ M U46619 und 30 μ M ADP wurden 81% bzw. 35% der Thrombin-Antwort erreicht (Abbildung 6.10b. oberer Western Blot). Die Färbung der Blots mit phosphorylierungsunabhängigen Antikörpern gegen die p42 MAPK bzw. die p38 MAPK zeigte, daß in allen Banden etwa die gleiche Menge der entsprechenden Kinase geladen war (Abbildung 6.10 untere Western Blots). Um sekundäre Effekte durch Freisetzung von Thromboxan oder ADP während der Thrombozytenaktivierung auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit Thrombozyten, die mit 100 μ M Aspirin vorinkubiert wurden, in der Gegenwart von 1 U/ml Apyrase (außer im Fall von ADP) durchgeführt. Diese Experimente zeigten für alle Aktivatoren, daß die Phosphorylierung der p42 MAPK und p38 MAPK unverändert zu den in Abbildung 6.10 gezeigten Ergebnissen war, daß also die gemessenen Effekte direkt durch die entsprechenden Aktivatoren ausgelöst wurden.

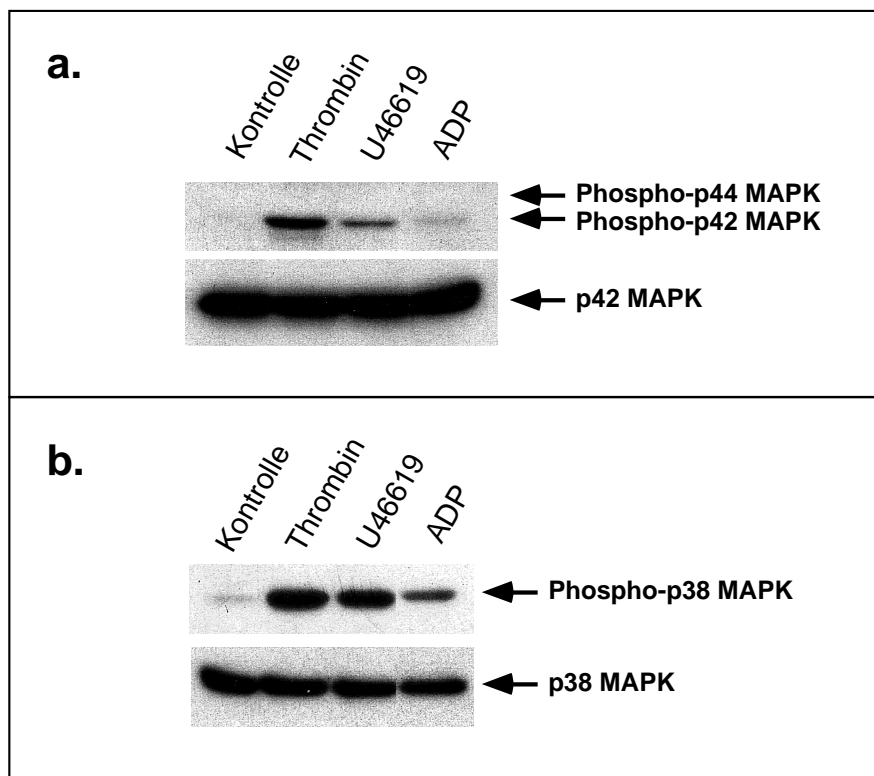


Abbildung 6.10: Aktivierung der p42 MAPK und der p38 MAPK in humanen Thrombozyten. Gewaschene Thrombozyten wurden für 2 min mit Puffer (Kontrolle), 0,5 U/ml Thrombin, 2 μ M U46619 oder 30 μ M ADP inkubiert und für die Western Blot-Analyse abgestoppt. Die Blots wurden mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen p42/p44 MAPK (a.) oder p38 MAPK (b.) gefärbt. Die unteren Blots zeigen jeweils eine Färbung mit einem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper.

6.2.2 Hemmung der Phosphorylierung der p42 MAPK und p38 MAPK durch Vasodilatoren

Um den Effekt von Vasodilatoren auf die thrombozytäre MAPK-Phosphorylierung zu messen, wurden gewaschene Thrombozyten für 1 min mit 10 μ M PG-E₁ oder 100 μ M SNP vorinkubiert und dann mit 0,5 U/ml Thrombin, 2 μ M U46619 oder 30 μ M ADP stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulierung wurden Proben für Western Blot-Analysen abgestoppt. Abbildung 6.11 zeigt die Western Blots eines repräsentativen Experimentes mit Thrombin. Thrombin induzierte einen zeitabhängigen Anstieg der Phosphorylierung der p42 MAPK und p38 MAPK, der durch Vorinkubation mit PG-E₁ oder SNP gehemmt wurde (Abbildung 6.11a. und b. jeweils oberer Blot). Kontrollfärbungen mit phosphorylierungsunabhängigen Antikörpern zeigten etwa gleiche Proteinmengen in allen Banden (Abbildung 6.11a. und b. untere Western Blots). Die Phosphorylierung von VASP

wurde als Kontrolle gemessen, um die Aktivierung der cAMP-PK und der cGMP-PK durch die Vasodilatoren nachzuweisen (Abbildung 6.11c.).

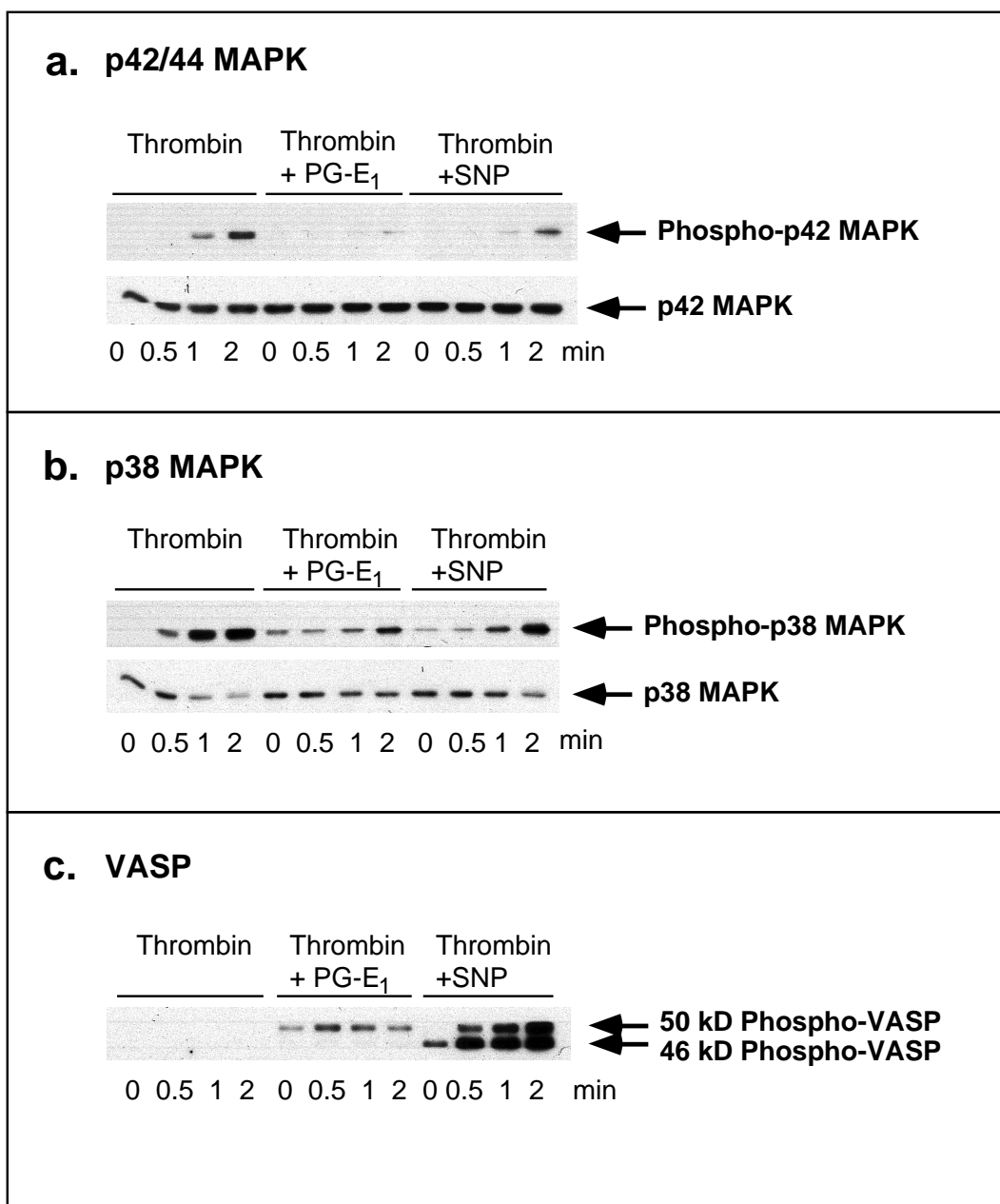


Abbildung 6.11: Hemmung der Thrombin-induzierten Phosphorylierung der p42 MAPK und p38 MAPK durch Vasodilatoren. Gewaschene Thrombozyten wurden mit 10 μ M PG-E₁ oder 100 μ M SNP vorinkubiert und anschließend mit 0,5 U/ml Thrombin inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für Western Blot-Analysen abgestoppt und auf Phosphorylierung der p42 MAPK (a.), der p38 MAPK (b.) und von VASP (c.) untersucht.

Die Western Blots wurden quantitativ ausgewertet, indem sie gescannt wurden und der Schwärzungsgrad der einzelnen Banden mit dem Programm NIH Image bestimmt wurde. Die Phosphorylierung nach 1 min Stimulierung mit dem betreffenden Aktivator ohne Vorinkubation mit Inhibitoren wurde gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte sind relativ zu diesem Wert angegeben. Die Stärke der Aktivierung durch die verschiedenen Aktivatoren war Thrombin > U46619 > ADP (siehe Abbildung 6.10). Diese Unterschiede zwischen den Aktivatoren sind in der quantitativen Auswertung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Phosphorylierung der p42 MAPK und der p38 MAPK sowie deren Hemmung durch PG-E₁ und SNP sind in Abbildung 6.12 dargestellt. Nach 0,5 min wurde die Phosphorylierung bei allen Aktivatoren nahezu komplett gehemmt. Bei Thrombin und U46619 wurde an den späteren Zeitpunkten eine abgeschwächte Phosphorylierung beobachtet, wobei die Hemmung durch PG-E₁ in den meisten Fällen stärker war als durch SNP. Die ADP-induzierte Phosphorylierung wurde während des gesamten Zeitverlaufs vollständig gehemmt.

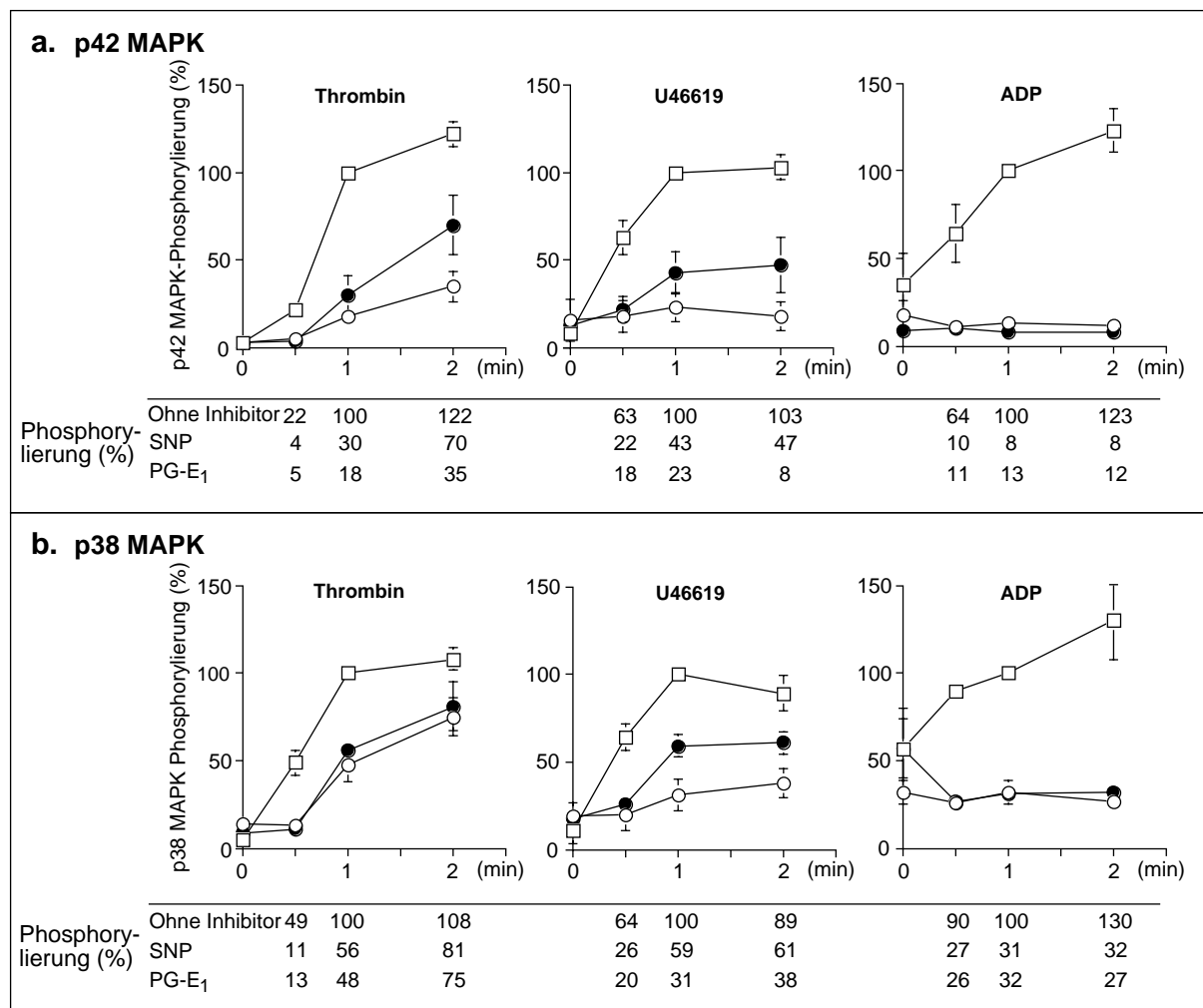


Abbildung 6.12: Aktivierung und Hemmung der p42 MAPK und p38 MAPK in humanen Thrombozyten. Gewaschene Thrombozyten wurden 1 min mit Puffer (□), 10 μ M PG-E₁ (○) oder 100 μ M SNP (●) vorinkubiert und dann mit 0,5 U/ml Thrombin, 2 μ M U46619 oder 30 μ M ADP inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben für Western Blots abgestoppt und mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern auf Phosphorylierung von p42 MAPK (a.) und p38 MAPK (b.) untersucht. Die Intensität der einzelnen Banden der Western Blots wurde mit dem Programm NIH Image quantifiziert. Die Phosphorylierung nach 1 min ohne Vorinkubation mit einem Inhibitor wurde für jeden Aktivator gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

6.3 Aktivierung und Hemmung der thrombozytären CD40L- und CD62P-Expression

Die Membranproteine CD40 Ligand und P-Selektin werden während der Thrombozytenaktivierung aus intrazellulären Speicherorganellen an die Thrombozytenoberfläche transportiert. Die Kinetik dieser Translokation, ausgelöst durch verschiedene Aktivatoren, sowie deren Hemmung durch die Vasodilatoren PG-E₁ und SNP wurden untersucht. Hierfür wurden gewaschene Thrombozyten (für die Stimulierung mit Thrombin) oder PRP (für die Stimulierung mit U46619 oder ADP) mit 100 µM Aspirin vorinkubiert, und die Versuche wurden in Gegenwart von 1 U/ml Apyrase durchgeführt, um sekundäre Effekte durch Freisetzung von TxA₂ und ADP aus intrazellulären Speichern zu vermeiden. Die gewaschenen Thrombozyten und das PRP wurden dann für 1 min mit 10 µM PG-E₁ oder 100 µM SNP vorinkubiert und anschließend mit 0,5 U/ml Thrombin, 2 µM U46619 oder 30 µM ADP stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben fixiert und für die durchflußzytometrische Analyse der CD40L- und CD62P-Expression wie in Kapitel 5.4 beschrieben aufbereitet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.13 zusammengefasst. Links sind die Originalhistogramme eines repräsentativen Experimentes nach 2 min Stimulation mit Thrombin gezeigt. Rechts sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten graphisch und tabellarisch zusammengefasst. Ein starker Anstieg der CD40L- und CD62P-Expression wurde nach Stimulation mit allen drei Aktivatoren beobachtet. Der maximale Expressionslevel des CD40L war bei allen Aktivatoren vergleichbar, bei U46619 und ADP folgte die Expression jedoch einem schnelleren Zeitverlauf als bei Thrombin (Abbildung 6.13a.). Die durch Thrombin induzierte Oberflächenexpression von CD62P war dreimal höher als nach Stimulierung mit U46619. ADP bewirkte nur eine sehr schwache Expression von CD62P (Abbildung 6.13b.). Die Expression von CD40L und CD62P folgte unterschiedlichen Kinetiken.

Die durch Thrombin oder U46619 induzierte CD40L-Expression wurde durch die Vasodilatoren PG-E₁ und SNP stark gehemmt (zwischen 56% und 98%). Die ADP-induzierte CD40L-Expression wurde hingegen deutlich weniger gehemmt (zwischen 21% und 69%) (Abbildung 6.13a.). Die Oberflächenexpression von CD62P wurde in Thrombin-stimulierten Thrombozyten zu 88% bis 100% reduziert und in mit U46619 stimulierten Thrombozyten zwischen 62% und 100%. Die ohnehin schwache CD62P-Expression nach

ADP wurde zu 29% bis 75% gehemmt (Abbildung 6.13b.). Insgesamt war die Hemmung durch PG-E₁ in den meisten Fällen deutlicher ausgeprägt als durch SNP.

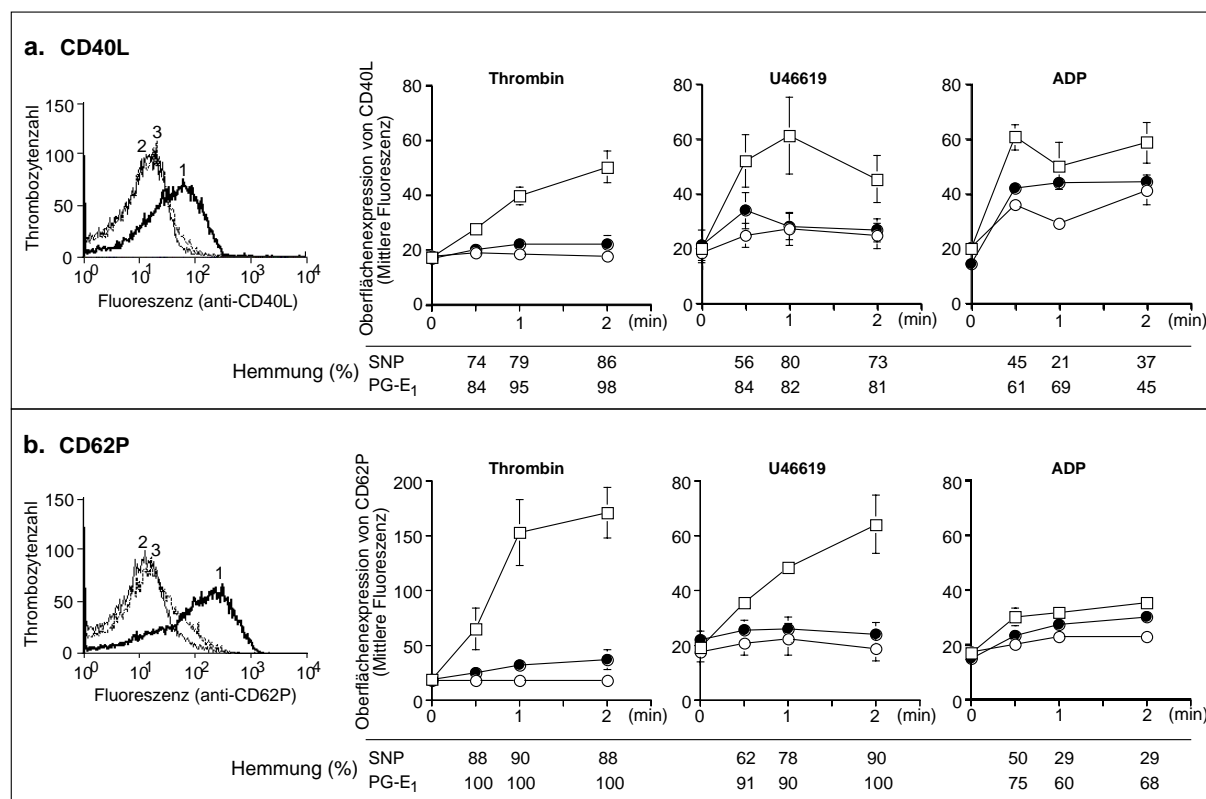


Abbildung 6.13: CD40L- und CD62P-Expression in humanen Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin, U46619 oder ADP und deren Hemmung durch PG-E₁ oder SNP. Gewaschene Thrombozyten (bei Inkubation mit Thrombin) oder PRP (bei Inkubation mit U46619 oder ADP) wurden in der Gegenwart von 100 μ M Aspirin und 1 U/ml Apyrase (außer bei ADP-Stimulation) für 1 min mit Puffer (□), 10 μ M PG-E₁ (○) oder 100 μ M SNP (●) vorinkubiert und dann mit 0,5 U/ml Thrombin, 2 μ M U46619 oder 30 μ M ADP inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben fixiert und für die Analyse der CD40L- (a.) und CD62P-Expression (b.) im Durchflußzytometer aufbereitet. Links sind die Originalhistogramme eines repräsentativen Versuches nach 2 min Stimulation mit Thrombin dargestellt. Kurve 1 zeigt die CD40L- bzw. CD62P-Expression nach Vorinkubation mit Puffer, Kurve 2 mit PG-E₁ und Kurve 3 mit SNP. Rechts sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. In der Tabelle unter den Kurven ist die prozentuale Stärke der Hemmung durch SNP bzw. PG-E₁ für die einzelnen Zeitpunkte angegeben.

Um zu testen, ob die Aktivierung der p42 MAPK oder der p38 MAPK Einfluß auf die Freisetzung von CD40L und CD62P haben, wurden Versuche mit Inhibitoren dieser beiden Kinasen durchgeführt. In früheren Versuchen wurde mit diesen Inhibitoren ein Einfluß auf die Thrombozytenaktivierung bei Stimulierung mit niedrigen Konzentrationen von TxA₂ bzw.

Collagen nachgewiesen (Saklatvala *et al.*, 1996; McNicol *et al.*, 1998). PRP mit 100 μ M Aspirin und 1 U/ml Apyrase wurde daher für 30 min mit Puffer oder mit 10 μ M PD 98059, einem Inhibitor der MAPK Kinase (MEK), welche die p42 MAPK aktiviert, und 10 μ M SB 203580, einem Inhibitor der p38 MAPK, vorinkubiert. Das PRP wurde dann für 1 min mit 2 μ M U46619 stimuliert und die Expression von CD40L und CD62P im Durchflußzytometer analysiert. Das mit den Inhibitoren vorinkubierte PRP zeigte im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitoren keine signifikante Veränderung der Expression von CD40L oder CD62P (Abbildung 6.14). Lediglich eine leichte, aber signifikante Verringerung der CD62P-Expression im unstimulierten Zustand wurde beobachtet. Um die Aktivität des Inhibitors PD 98059 zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung der p42 MAPK im Western Blot mit dem Antikörper 12D4 gemessen (Abbildung 6.15). Im Vergleich zur Pufferkontrolle war nach Inkubation mit den Inhibitoren eine deutliche Reduzierung der p42 MAPK-Phosphorylierung zu erkennen. SB 203580 beeinflusst nicht die Phosphorylierung der p38 MAPK selbst, so daß die Wirksamkeit dieses Inhibitors nicht mit einfachen Mitteln nachgewiesen werden konnte.

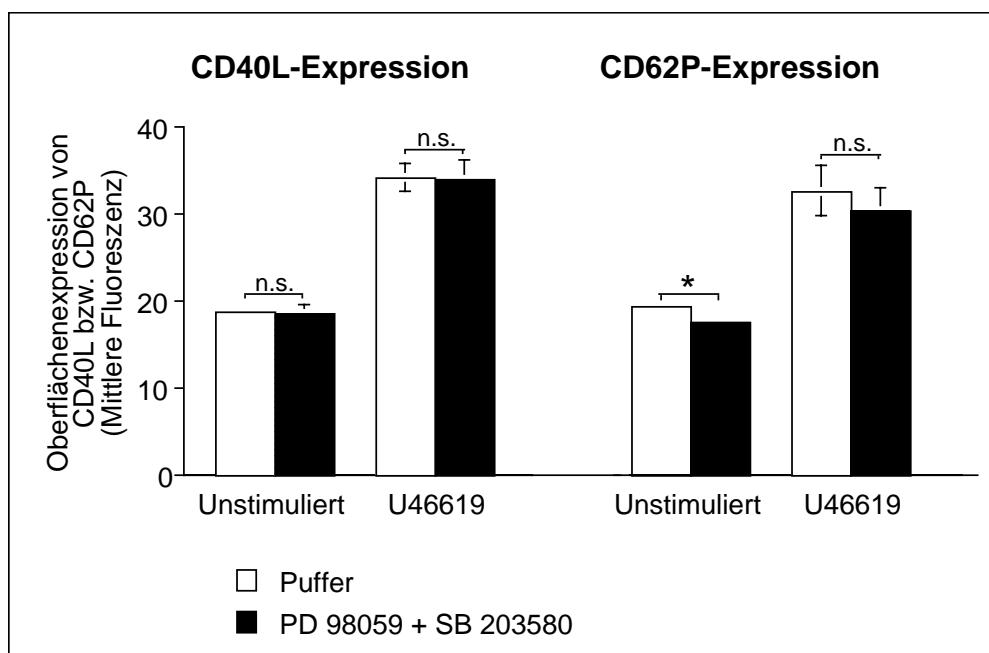


Abbildung 6.14: Effekte der MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 auf die U46619-induzierte Expression von CD40L und CD62P. PRP mit 100 μ M Aspirin und 1 U/ml Apyrase wurde für 30 min mit Puffer (□) oder 10 μ M PD 98059 und 10 μ M SB 203580 (■) vorinkubiert. Für die Bestimmung der CD40L- und CD62P-Expression wurde unstimuliertes und für 1 min mit 2 μ M U46619 stimuliertes PRP im Durchflußzytometer analysiert. Die gezeigten Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 7 unabhängigen Versuchen (n.s., nicht signifikant; *, $P < 0,001$ T-Test).

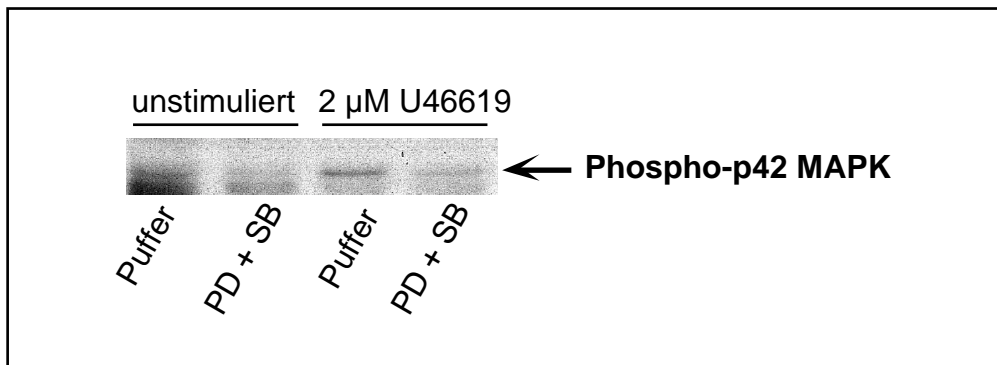


Abbildung 6.15: Wirksamkeitsnachweis des MAPK-Inhibitors PD 98059 anhand der Phosphorylierung der p42 MAPK. PRP mit 100 μM Aspirin und 1 U/ml Apyrase wurde für 30 min mit Puffer oder 10 μM PD 98059 und 10 μM SB 203580 vorinkubiert. Anschließend wurde das PRP entweder unstimuliert oder nach 1 min Stimulation mit 2 μM U46619 für Western Blot-Analysen abgestoppt. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 12D4, der phosphorylierungsspezifisch an die p42 MAPK bindet.

6.4 Auswirkungen aktivierter Thrombozyten auf Signalwege in humanen Endothelzellen

6.4.1 Identifizierung der Endothelzellen

Humane Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen isoliert wie in Kapitel 5.6 beschrieben. Um die präparierten Zellen als Reinkulturen von Endothelzellen zu identifizieren, wurden zwei Kriterien untersucht. Als morphologisches Charakteristikum bildet der konfluente Zellrasen der Endothelzellen ein typisches 'Kopfsteinpflastermuster', das sie von glatten Muskelzellen und Fibroblasten unterscheidet. Abbildung 6.16 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme von humanen Endothelzellen der Passage 1.

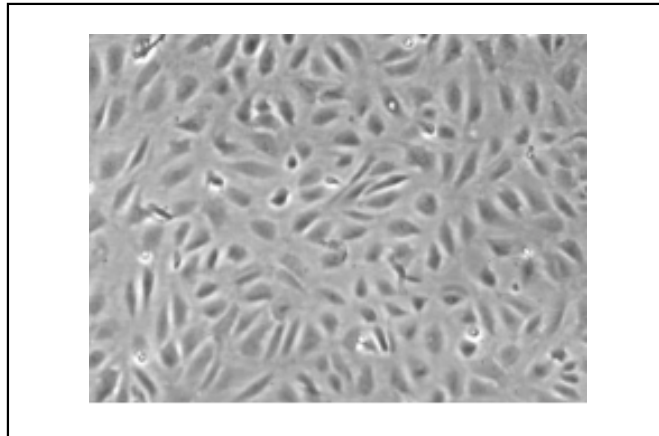


Abbildung 6.16: Phasenkontrastaufnahme humaner Endothelzellen, Passage 1.

Zur Überprüfung der Reinheit der Endothelzellkultur wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem acetyliertem LDL inkubiert, das Endothelzellen über LDL-Rezeptoren internalisieren. Durch Vergleich der Fluoreszenzaufnahme mit einer Phasenkontrastaufnahme des Zellrasens wurde nachgewiesen, daß die Kultur nicht von glatten Muskelzellen oder Fibroblasten, die keine LDL-Rezeptoren aufweisen, kontaminiert war (Abbildung 6.17).

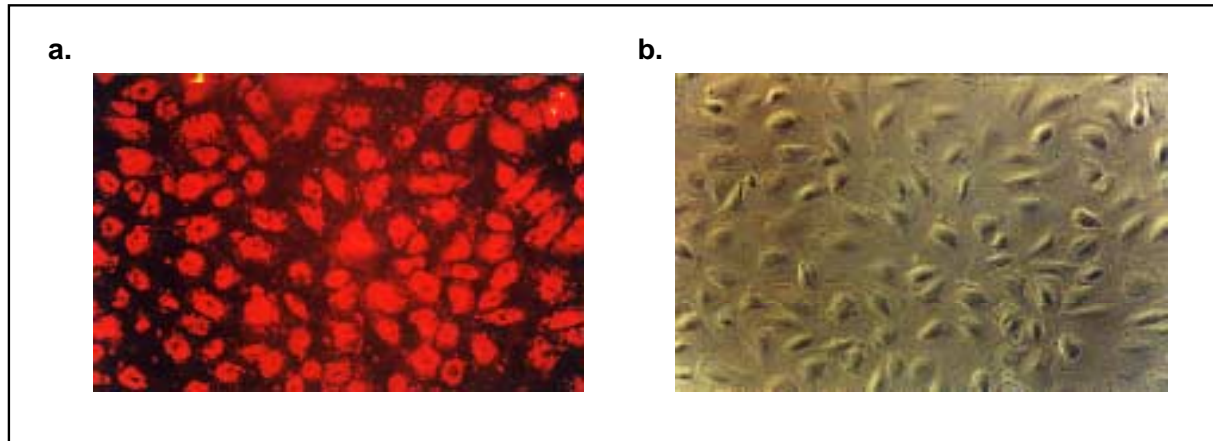


Abbildung 6.17: Fluoreszenz- (a.) und Phasenkontrastaufnahme (b.) einer mit Dil-Ac-LDL gefärbten Endothelzellkultur.

6.4.2 Aktivierung der Thrombozyten

Für die Koinkubationsversuche wurden gewaschene humane Thrombozyten mit 0,5 U/ml Thrombin aktiviert, und das Thrombin nach 1 min mit einem Überschuß von 100 U/ml Heparin inaktiviert. Um zu verhindern, daß die Thrombozyten sich zu wenigen großen Aggregaten zusammenlagern, wurde die Aktivierung in Gegenwart von 1 mM RGDS-Peptid

durchgeführt, das den Fibrinogenrezeptor blockiert und so die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten Rezeptor verhindert. Die aktivierten Thrombozyten wurden mit Zellkulturmedium, das 2% humanes Serum enthielt, 1:10 auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml verdünnt.

Die Aktivierung der Thrombozyten wurde durch durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von CD40L, CD62P und der Fibrinogenbindung überprüft. Abbildung 6.18 zeigt die Mittelwerte aus 7 unabhängigen Experimenten. Die CD62P-Expression wurde um den Faktor 9 hochreguliert, die CD40L-Expression um den Faktor 2 und die Fibrinogenbindung um den Faktor 4.

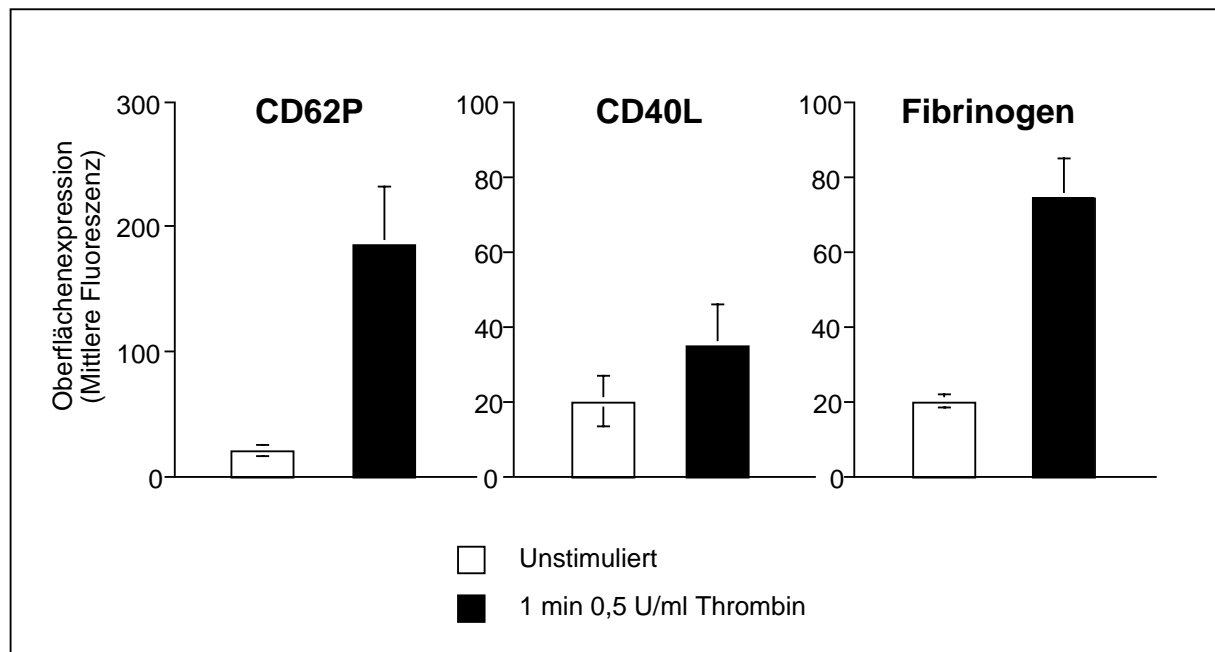


Abbildung 6.18: Oberflächenexpression von CD62P und CD40L und Fibrinogenbindung von Thrombin-aktivierten Thrombozyten, die für Koinkubationsexperimente mit humanen Endothelzellen eingesetzt wurden. Die Werte wurden durchflußzytometrisch gemessen wie in Kapitel 5.4 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von 7 unabhängigen Experimenten.

Die Thrombozytensuspension wurde auf einen zu 80% konfluenten Zellrasen von Endothelzellen der Passage 1 oder 2 gegeben. Als Kontrolle wurden Endothelzellen nur mit Puffer inkubiert, der außer den aktivierten Thrombozyten die gleichen Inhaltsstoffe wie die Thrombozytenlösung enthielt. Die exakten Versuchsbedingungen sind in Kapitel 5.7 und 5.8 beschrieben.

6.4.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Endothelzellen

Am Ende der Koinkubation wurden die Endothelzellen mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA, wie in Kapitel 5.9 beschrieben, isoliert. Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde je 1 µg in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Ein Zeichen, daß die RNA nicht degradiert ist, sind zwei charakteristische Banden, die von der 18S und 28S ribosomalen RNA gebildet werden (Abbildung 6.19).

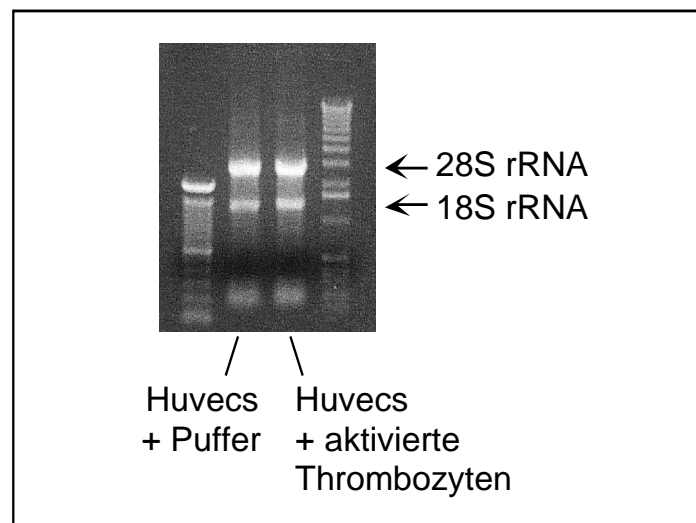


Abbildung 6.19: Gesamt-RNA aus humanen Endothelzellen. Je 1 µg RNA wurde in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. In der linken und rechten äußeren Spur wurde jeweils ein DNA-Größenstandard aufgetragen.

Es war bereits bekannt, daß aktivierte Thrombozyten in Endothelzellen die Expression von ICAM-1 hochregulieren (Henn *et al.*, 1998). Um zu überprüfen, ob unter den hier gewählten Versuchsbedingungen die Thrombozyten zur Stimulierung der Endothelzellen führten, wurde die Expression von ICAM-1 im Northern Blot untersucht. Nach einer Koinkubationszeit von 4 h war die mRNA von ICAM-1 in den Endothelzellen, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert worden waren, im Vergleich zur Kontrolle etwa achtfach höher exprimiert (Abbildung 6.20a.). Die Kontrollfärbung mit einer Sonde gegen GAPDH, einem konstitutiv exprimierten Enzym, zeigt, daß in beiden Proben die gleiche Menge RNA aufgetragen wurde (Abbildung 6.20b.).

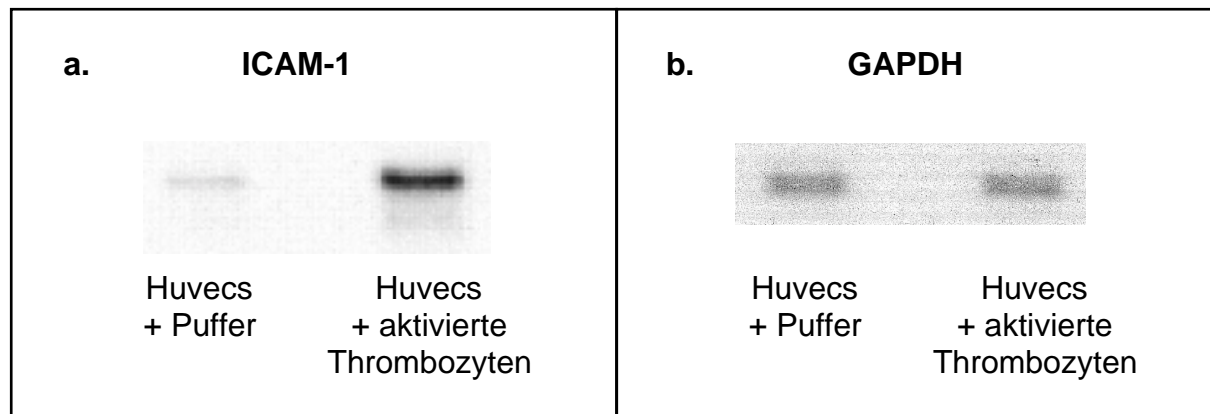


Abbildung 6.20: Northern Blot-Analyse der Expression von ICAM-1 und GAPDH. Huvecs wurden mit Puffer oder aktivierten Thrombozyten inkubiert und nach 4 h die Gesamt-RNA aus den Huvecs isoliert. Jeweils 10 µg RNA wurden im Northern Blot aufgetragen und mit einer Sonde gegen ICAM-1 (a.) oder gegen GAPDH als Ladekontrolle (b.) gefärbt. Bande 1 zeigt RNA aus der Kontrollinkubation, Bande 2 aus der Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten.

6.4.4 *Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array*

Um Gene zu identifizieren, deren Transkription durch Kontakt der Endothelzellen mit aktivierten Thrombozyten verändert wird, wurde die aus den Endothelzellen isolierte RNA mit den *Atlas Human 1.2 cDNA Expression Arrays* der Firma Clontech untersucht. Vor der Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Proben wurden eventuelle DNA-Kontaminationen der RNA durch Inkubation mit DNase entfernt. Aus jeweils 4 µg Gesamt-RNA der beiden zu vergleichenden Proben wurde mit einem Gemisch aus Primern, die spezifisch für die Sequenzen der auf dem Array immobilisierten cDNAs sind, radioaktive cDNA hergestellt. Diese Proben wurden mit je einer von zwei identischen Array-Membranen, auf denen jeweils cDNA-Fragmente von etwa 1200 Genen punktförmig aufgetragen sind, hybridisiert. Die Signale der gebundenen radioaktiven cDNAs wurden mit Phosphorimager oder Röntgenfilmen detektiert (Abbildung 6.21 und Abbildung 6.22).

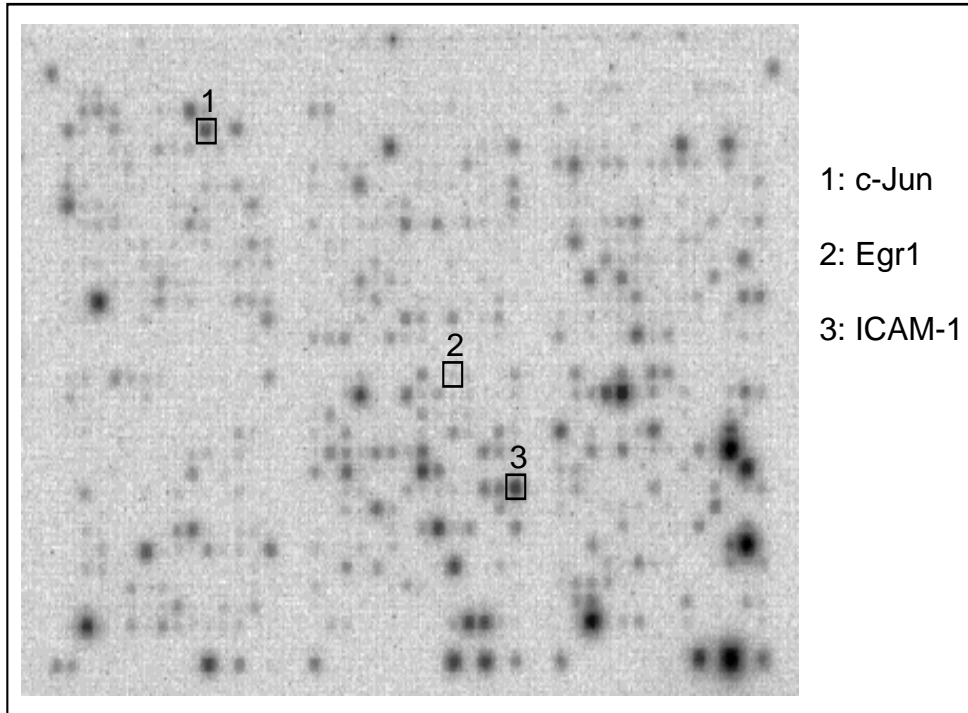


Abbildung 6.21: *Atlas Array Human 1.2* (Clontech). Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA aus Huvecs, die für 4 h mit Kontrollpuffer inkubiert worden waren.

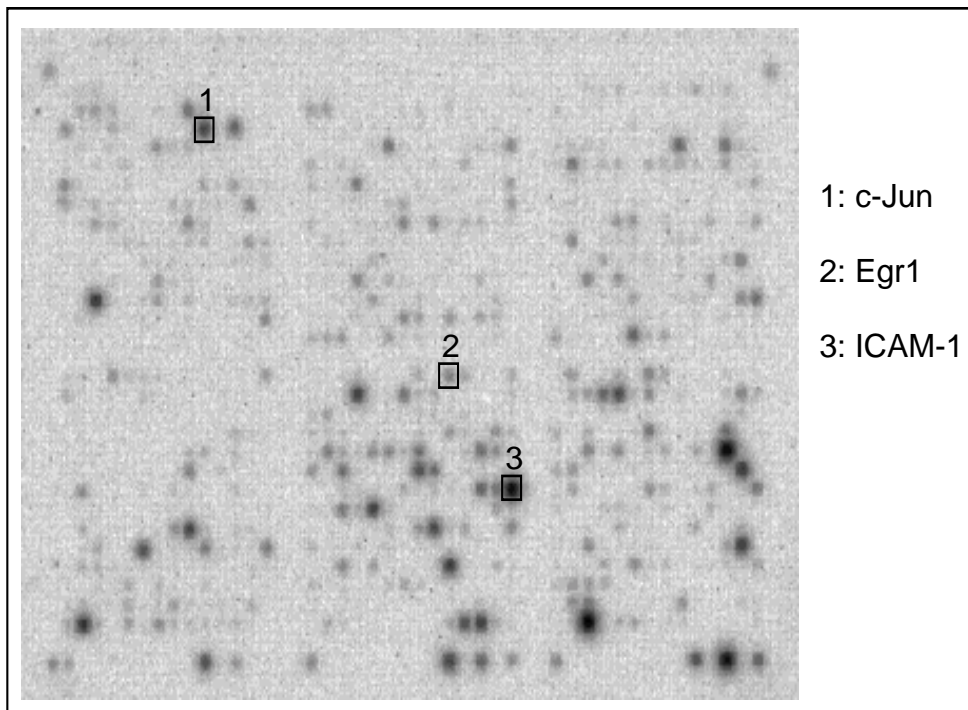


Abbildung 6.22: *Atlas Array Human 1.2* (Clontech). Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA aus Huvecs, die für 4 h mit aktivierten Thrombozyten inkubiert worden waren.

Durch Vergleich der Signalintensitäten der einander entsprechenden Spots auf den beiden Membranen wurde eine Regulierung verschiedener Gene gefunden, die sich hauptsächlich den Bereichen der Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und inflammatorischen Faktoren zuordnen lassen. Nach vierstündiger Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten wiesen die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Myc, ErgB, ATF-4, Egr1, der Replikationsfaktor C und die Wachstumsfaktoren PDGF und *glial growth factor 2* eine verstärkte Expression auf (Tabelle 6.2). Außerdem wurden der *corticotropin releasing factor receptor 1*, das Zelladhäsionsprotein SQM1 und das Integrin β_1 verstärkt exprimiert. Die Hochregulation von ICAM-1, VCAM-1, Integrin α_v , MCP-1 und Interleukin 8 ist bereits bekannt (Henn *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000) und wurde mit diesem Assaysystem bestätigt. Eine Verminderung der Expression nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten wurde für das *bone morphogenic protein* beobachtet (Tabelle 6.2). Die genannten Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten übereinstimmend gefunden.

Tabelle 6.2: Differentielle Genregulation in humanen Endothelzellen nach vierstündiger Inkubation mit aktivierten Thrombozyten. Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten mit den Atlas Human 1.2 cDNA-Arrays.

Verstärkte Expression	Referenz
<i>c-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1</i>	
<i>c-myc oncogene</i>	
<i>fli-1 oncogene; ergB transcription factor</i>	
<i>cAMP-dependent transcription factor ATF-4; DNA-binding protein TAXREB67; cAMP-response element binding protein (CREB2)</i>	
<i>early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225</i>	
<i>activator 1 37kDa subunit; replication factor C 37kDa subunit (RFC37); RFC4</i>	
<i>platelet derived growth factor B subunit (PDGFB; PDGF2)</i>	
<i>glial growth factor 2 precursor (GGFHPP2); neuregulin; heregulin-β + neu differentiation factor + heregulin-α</i>	
<i>corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1)</i>	
<i>sNADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1</i>	
<i>fibronectin receptor β subunit (FNRβ); integrin β1; CD29</i>	
<i>vitronectin receptor α subunit (VNRα); integrin α_v subunit; CD51</i>	1
<i>intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM-1); major group rhinovirus receptor; CD54</i>	1, 2, 3
<i>vascular cell adhesion molecule 1 precursor (VCAM-1); CD106</i>	2
<i>monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP-1)</i>	1, 2, 3, 4
<i>interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor; T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1)</i>	2
Verminderte Expression	
<i>bone morphogenic protein 4 (BMP4) + BMP2B</i>	

¹: (Gawaz *et al.*, 2000), ²: (Henn *et al.*, 1998), ³: (Gawaz *et al.*, 1998), ⁴: (Dickfeld *et al.*, 2001)

Um die Ergebnisse aus den cDNA-Arrays zu bestätigen wurde zunächst die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun im Northern Blot bestätigt. Man erkennt ein deutlich stärkeres Signal nach Koinkubation der Endothelzellen mit aktivierten Thrombozyten als in den Kontrollbedingungen (Abbildung 6.23).

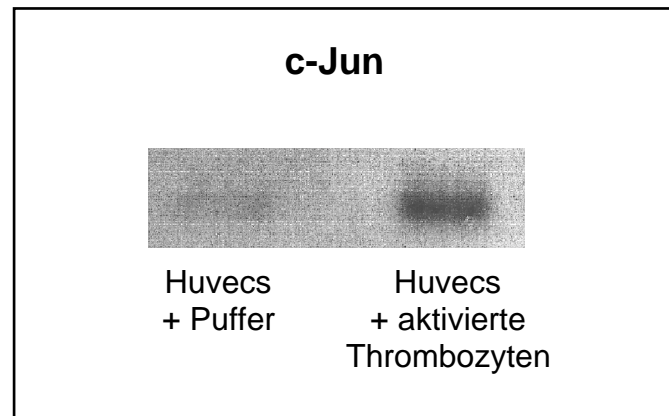


Abbildung 6.23: Northern Blot-Analyse der Expression von c-Jun. Huvecs wurden mit Puffer oder aktivierten Thrombozyten inkubiert und nach 4 h die Gesamt-RNA aus den Huvecs isoliert. Jeweils 10 µg RNA wurden im Northern Blot aufgetragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen c-Jun gefärbt.

In einem Koinkubationsexperiment mit humanen Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten wurde nach 0,5 h, 4 h und 24 h der Koinkubation jeweils ein Teil der Endothelzellen für Western Blot-Analysen abgestoppt, um die Expression der gefundenen Gene auch auf der Proteinebene nachzuweisen. Abbildung 6.24 zeigt einen Western Blot, der mit einem Antikörper gegen c-Jun entwickelt wurde. Bereits nach 0,5 h war eine verstärkte Expression von c-Jun im Vergleich zu den mit Puffer inkubierten Zellen zu beobachten. Diese wurde nach 4 h noch deutlicher. Nach 24 h war keine oder nur noch eine sehr schwache Expression von c-Jun zu erkennen. Die Auftragung von aktivierten Thrombozyten zeigte, daß diese kein c-Jun enthalten (Bande (0), Abbildung 6.24) und somit die gemessene Expression in den Endothelzellen nicht durch Kontamination der Proben mit anhaftenden Thrombozyten, die nicht vollständig gewaschen werden konnten, hervorgerufen wurde.

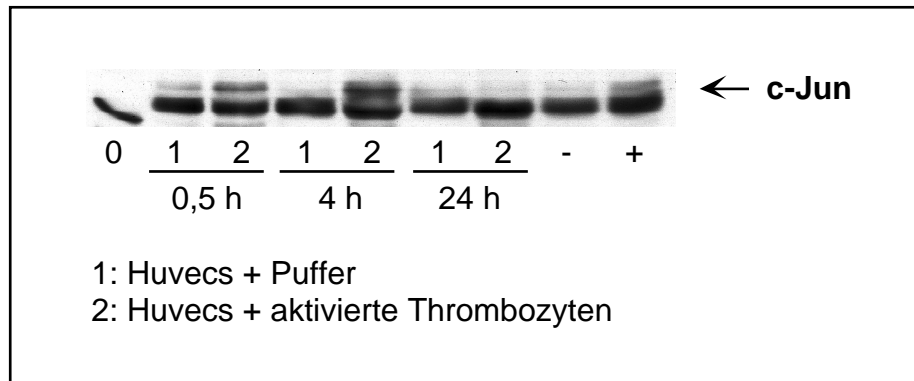


Abbildung 6.24: Expression von c-Jun im Western Blot. Huvecs wurden mit Puffer (1) oder aktivierten Thrombozyten (2) inkubiert. Nach 0,5 h, 4 h und 24 h der Koinkubation wurde ein Teil der Huvecs für Western Blot-Analysen abgestoppt. Bande (0) zeigt aktivierte Thrombozyten als Kontrolle. Bande (-) und Bande (+) zeigen als Negativ- bzw. Positivkontrolle Huvecs, die mit 2% bzw. mit 20% Serum inkubiert wurden. Die obere Bande zeigt c-Jun, die untere Bande resultiert aus einer unspezifischen Kreuzreaktion des Antikörpers.

Die Regulation der übrigen Faktoren (Tabelle 6.2) wird zur Zeit durch Northern und Western Blots überprüft.

7 DISKUSSION

7.1 Durchflußzytometrische Analyse der VASP-Phosphorylierung

Basierend auf der Durchflußzytometrie wurde eine Methode entwickelt, welche die schnelle und semiquantitative Analyse von Proteinphosphorylierungen in Thrombozyten erlaubt. Diese Methode wurde anhand der Messung der VASP-Phosphorylierung etabliert. Vergleiche mit der allgemein anerkannten Methode des Western Blots zeigten eine enge Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Analysenverfahren (Abbildung 6.3). Bisher war die durchflußzytometrische Analyse der Thrombozytenfunktion auf Oberflächenmarker beschränkt, beispielsweise auf die Expression von P-Selektin (CD62P), Änderungen des Aktivierungszustandes des Fibrinogenrezeptors (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und die Bildung von Mikropartikeln und Aggregaten (Michelson, 1996). Die hier entwickelte Methode wurde in ersten Versuchen erfolgreich für die Analyse der Phosphorylierung der p42 MAPK eingesetzt (Abbildung 6.9) und erweitert dadurch das Spektrum der durchflußzytometrischen Messung der Thrombozytenaktivierung auf die Analyse von intrazellulären Signalwegen. Durch die fortschreitende Entwicklung phosphorylierungsspezifischer Antikörper sollte es in Zukunft möglich sein, weitere Proteinphosphorylierungen in Thrombozyten zu messen, beispielsweise die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosin (MLC) durch die MLCK oder die Phosphorylierung von Pleckstrin, dem Substrat der Proteinkinase C, oder die Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne der β_3 -Untereinheit des Fibrinogenrezeptors, die für das *outside-in-signaling* und die Thrombozytenaggregation entscheidend ist (Law *et al.*, 1999). Voraussetzung für diese Messungen ist, daß die Zielmoleküle in ausreichend hoher Konzentration in den Thrombozyten vorliegen, um eine ausreichende Signalstärke für die durchflußzytometrische Analyse zu garantieren.

Für das Verständnis der Thrombozytenfunktion ist neben der Analyse von aktivierenden Signalwegen jedoch auch die Untersuchung der Thrombozytenhemmung von besonderer Bedeutung. Hochwirksame Thrombozyteninhibitoren, wie beispielsweise die von Endothelzellen sekretierten Faktoren PG-I₂ und EDRF (NO) oder die pharmakologischen Vasodilatoren PG-E₁ und SNP, aktivieren die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen und führen so zur Phosphorylierung zahlreicher intrazellulärer Zielmoleküle wie VASP, Rap1b und MLCK (Eigenthaler und Walter, 1994). VASP ist ein gut

charakterisiertes Substrat beider Kinasen, und die VASP-Phosphorylierung korreliert mit der Hemmung der Thrombozytenaktivierung, insbesondere der Hemmung der Fibrinogenbindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Horstrup *et al.*, 1994). Die Phosphorylierung von VASP ist daher ein guter Marker für die Hemmung der Thrombozytenfunktion. Die bisher verfügbaren biochemischen Methoden waren jedoch auf die Analyse der VASP-Phosphorylierung in gewaschenen Thrombozyten oder PRP beschränkt. Die hier entwickelte durchflußzytometrische Methode ermöglicht eine schnelle Messung der VASP-Phosphorylierung sowohl in gewaschenen Thrombozyten und PRP als auch in Vollblut (Abbildung 6.4). Die Messung im Vollblut könnte von Relevanz für die klinische Diagnose sein. Indem man sofort nach der Entnahme das Blut fixiert und den Status der VASP-Phosphorylierung in den Thrombozyten bestimmt, könnte man Auskunft über die Endothelfunktion des Patienten erhalten oder die Wirkung einer Therapie mit Prostaglandinen oder NO-freisetzenden Vasodilatoren nachweisen. Beispielsweise wurde gezeigt, daß die Acetylcholin-stimulierte Freisetzung von NO aus Endothelzellen die Thrombozytenaggregation hemmt und daß dieser Effekt bei Patienten mit Atherosklerose und Endothelschaden vermindert war (Diodati *et al.*, 1998). Die Experimente mit kultivierten Endothelzellen zeigen, daß die hier entwickelte Durchflußzytometriemethode prinzipiell geeignet ist, um die Wirkung von Endothelzellofaktoren auf Thrombozyten im Vollblut zu messen (Abbildung 6.5). Die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung von Patienten mit Endothelschäden ist zur Zeit in der Erprobung.

Die Messung der VASP-Phosphorylierung mittels Durchflußzytometrie kann außerdem für die funktionelle Analyse von Thrombozytenaktivatoren, deren Rezeptoren mit inhibitorischen G_i -Proteinen gekoppelt sind, eingesetzt werden. Diese hemmen die Adenylylzyklase und üben so einen hemmenden Einfluß auf die cAMP-vermittelten Signalwege aus. Mit der hier entwickelten Methode wurde gezeigt, daß Epinephrin, ADP und Thrombin, aber nicht TxA_2 die Prostaglandin-induzierte VASP-Phosphorylierung reduzieren (Abbildung 6.6). Die Methode könnte daher bei Krankheitsbildern, die auf einen Rezeptordefekt schließen lassen, zum Einsatz kommen, um die Funktionalität von G_i -gekoppelten Rezeptoren zu überprüfen. Beispielsweise sind zwei Patienten mit angeborener Blutungsstörung bekannt, bei denen die Aktivierung der ADP-Rezeptoren auf Thrombozyten gestört ist (Cattaneo *et al.*, 1992; Nurden *et al.*, 1995). Bei den Thrombozyten dieser Patienten war die Fibrinogenbindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermindert, und ADP war nicht in der Lage, den cAMP-Level zu reduzieren,

ein Effekt, der leicht mit der Messung der VASP-Phosphorylierung nachweisbar wäre. Weitere genetische oder erworbene Defekte in humanen Thrombozyten, die zu einem verstärkten Risiko von Gerinnungsstörungen beitragen, sind bekannt, z.B. ein vererbter Defekt in der Antwort auf NO in einer Familie mit Neigung zu arteriellen Thrombosen oder eingeschränkte cGMP-regulierte Signalübertragung in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (Freedman *et al.*, 1996; Eigenthaler *et al.*, 1993). Die Durchflußzytometriemethode zur Messung der intrazellulären VASP-Phosphorylierung ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Untersuchung solcher Defekte von Rezeptor- oder Enzymaktivitäten. Wird die Methode auf weitere Proteinphosphorylierungen ausgedehnt, ist ein noch größeres Spektrum an Signalwegen erreichbar.

In einer ersten klinischen Anwendung wurde die Methode für die Analyse von Thrombozyteninhibitoren, die als Antagonisten der ADP-Antwort wirken, eingesetzt. Die Thienopyridinderivate Ticlopidin und Clopidogrel hemmen die durch ADP ausgelöste Aggregation (Savi *et al.*, 1996a). Sie wirken selektiv auf den P2Y_{AC} ADP-Rezeptor, der über inhibitorische G_i-Proteine die Adenylylzyklase hemmt. Die beiden anderen thrombozytären ADP-Rezeptoren, P2X1 und P2Y1, die einen raschen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum bzw. die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern bewirken, werden nicht beeinträchtigt (Geiger *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1999). Ticlopidin bzw. die Nachfolgesubstanz Clopidogrel wird häufig in Kombination mit Aspirin, welches die Zyklooxygenase und damit die Thromboxansynthese hemmt, in der antithrombozytären Behandlung bei Stentimplantationen eingesetzt. Die Wirkungen dieser beiden Medikamente ergänzen sich, so daß die Wahrscheinlichkeit eines Gefäßverschlusses bei den behandelten Patienten deutlich gesenkt wird (Brookes und Sigwart, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigten, daß die Behandlung von Probanden mit Ticlopidin oder Clopidogrel den inhibitorischen Effekt von ADP auf die PG-E₁-stimulierte VASP-Phosphorylierung stark beeinträchtigte (Tabelle 6.1 und Abbildung 6.7). Der hemmende Effekt von Epinephrin, dessen Rezeptor ebenfalls über G_i-Proteine die Adenylylzyklase hemmt, wurde hingegen nicht reduziert (Daten nicht gezeigt). Ticlopidin und Clopidogrel wirken *in vivo* also selektiv auf den P2Y_{AC} ADP-Rezeptor. In den durchgeführten Studien ließen sich der Zeitverlauf, die Wirkungsstärke und die Auswaschphase der Medikation verfolgen. Außerdem wurden Personen mit einer Resistenz gegen Clopidogrel gefunden (Abbildung 6.8). Eine Resistenz gegen diese Medikamente könnte in Abnormalitäten im

ADP-Rezeptor begründet sein, so daß der Wirkstoff nicht angreifen kann, oder die Verstoffwechslung in der Leber, die erforderlich ist, um den Wirkstoff freizusetzen, könnte beeinträchtigt sein. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Messung der VASP-Phosphorylierung eine geeignete und hilfreiche Methode ist, um die Wirksamkeit einer Ticlopidin- oder Clopidogrelbehandlung *in vivo* nachzuweisen und im Therapieverlauf zu beobachten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier entwickelte Methode der durchflußzytometrischen Analyse der VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten einen neuen Parameter in der Analyse der Thrombozytenfunktion darstellt, der sowohl für Forschungs- als auch für klinische Zwecke nützlich sein wird. Sie kann angewendet werden, um Einflüsse von Endothelfaktoren auf die Thrombozyten zu messen, um Defekte in Rezeptoren oder intrazellulären Signalwegen aufzudecken und um die therapeutische Wirksamkeit von Thrombozyteninhibitoren nachzuweisen. Es wurde gezeigt, daß die Methode auch für die Messung weiterer Proteinphosphorylierungen anwendbar ist, wodurch das Anwendungsspektrum noch erweitert werden kann.

7.2 Aktivierung und Hemmung der thrombozytären MAPK-Signalwege

Es wurde gezeigt, daß sowohl die p42 MAPK als auch die p38 MAPK durch verschiedene Thrombozytenagonisten in unterschiedlicher Stärke aktiviert werden (Abbildung 6.10). Bei der p42 MAPK war die Aktivierung durch Thrombin am stärksten, gefolgt von TxA₂ (U46619) und ADP, welches das vergleichsweise schwächste Signal hervorgerufen hat. Für die Aktivierung der p38 MAPK war der gleiche Trend erkennbar, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Aktivatoren etwas geringer waren. Die Aktivierung durch alle drei Aktivatoren wurde durch die Vasodilatoren PG-E₁ und SNP gehemmt (Abbildung 6.11 und Abbildung 6.12). MAP Kinasen sind in allen eukaryotischen Zellen exprimiert und bilden essentielle Bestandteile von komplexen Signalnetzen. Sie werden durch verschiedene Stimuli wie Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hormone aktiviert und leiten die Proliferation oder Differenzierung der Zelle ein. Über ihre Funktion und Regulation in den zellkernlosen Thrombozyten ist erst wenig bekannt. Als Substrat der p42 MAPK wurde in Thrombozyten die ribosomale S6 Kinase (p90^{rsk}) gefunden, die in anderen Zelltypen an mitotischen und proliferativen Prozessen beteiligt ist, deren Funktion in Thrombozyten jedoch noch unklar ist

(Papkoff *et al.*, 1994). Die p38 MAPK phosphoryliert die Ca^{2+} -abhängige zytosolische Phospholipase A_2 (cPLA₂) und trägt damit zur Aktivierung der cPLA₂ und zur Freisetzung von Arachidonsäure bei (Kramer *et al.*, 1996; Börsch-Haubold *et al.*, 1997). Ein weiteres Substrat der p38 MAPK ist die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK-2). Diese phosphoryliert das kleine Hitzeschockprotein Hsp27, welches die Aktinpolymerisation verstärkt und so zu den Umbauvorgängen des Zytoskeletts während der Thrombozytenaktivierung beitragen könnte (Saklatvala *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 2000). In einigen Studien wurde eine Rolle der p42 MAPK und der p38 MAPK in der frühen Phase der Thrombozytenaktivierung vermutet, die notwendig für die Expression von Oberflächenrezeptoren und die Aggregation bei niedrigen Konzentrationen von Thrombozytenagonisten sein könnte (Saklatvala *et al.*, 1996; McNicol *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde eine niedrige Konzentration des TxA₂-Analoges U46619 eingesetzt, die nur zu einer schwachen Thrombozytenaktivierung führte. Unter diesen Bedingungen konnte die Oberflächenexpression von P-Selektin und CD40L durch Inhibitoren der MAPK-Wege nicht gehemmt werden (Abbildung 6.14). Die verwendeten Inhibitoren (PD98059 und SB203580) wirken jedoch nicht spezifisch auf die MAP-Kinasen, sondern hemmen auch die Funktion der Zyklooxygenasen (Börsch-Haubold *et al.*, 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche (auch die Kontrollversuche ohne MAPK-Inhibitoren) wurden in Gegenwart von Aspirin, das ebenfalls die Zyklooxygenasen hemmt, durchgeführt, so daß Effekte durch die Zyklooxygenasen ausgeschlossen werden können. Dies war bei den genannten Studien (Saklatvala *et al.*, 1996; McNicol *et al.*, 1998) nicht der Fall, so daß dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte.

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP haben in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche Wirkungen auf die Aktivität der p42/p44 MAPK. In 3T3 Fibroblasten, COS-7 Affennierenzellen und einer myeloiden Vorläuferzelllinie führte cAMP zu einer Aktivierung dieser MAP-Kinasen (Faure und Bourne, 1995; Lee, 1999), wohingegen sie in Rattenfibroblasten und glatten Muskelzellen aus humanen Aorten durch cAMP gehemmt wurden (Faure und Bourne, 1995; Graves *et al.*, 1993). cGMP aktivierte die p42/p44 MAPK in Rattenmesangialzellen und glatten Muskelzellen aus Rattenaorten, in denen die cGMP-PK exprimiert wurde (Callsen *et al.*, 1998; Komalavilas *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu hemmten cGMP-Analoga die MAPK-Aktivierung in cGMP-PK-exprimierenden Nierenzellen aus Hamsterbabys (Suhasini *et al.*, 1998). Die p38 MAPK wurde durch cAMP oder cGMP in

epidermalen Fettzellen der Ratte bzw. humanen embryonalen Nierenfibroblasten aktiviert (Moule und Denton, 1998; Browning *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde in humanen Thrombozyten durch Vasodilatoren, die zu einer Erhöhung entweder des cAMP- oder des cGMP-Spiegels führen, eine Hemmung der Aktivierung sowohl der p42 MAPK als auch der p38 MAPK beobachtet (Abbildung 6.12). Die Hauptwirkorte der zyklischen Nukleotide in humanen Thrombozyten sind die cAMP- und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Butt *et al.*, 1992; Eigenthaler *et al.*, 1993). In Thrombozyten sind zahlreiche Substrate der cAMP-PK und der cGMP-PK bekannt (Eigenthaler und Walter, 1994). Die MAP-Kinasen selbst enthalten jedoch kein Phosphorylierungsmotiv für diese beiden Kinasen. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Regulation über die den MAP-Kinasen vorgeschalteten Aktivierungswege läuft. Es ist bekannt, daß die cAMP-PK und cGMP-PK die Thrombozytenfunktion unter anderem auf der Ebene der Phospholipase C hemmen (Waldmann und Walter, 1989; Ryningen *et al.*, 1998). Da die Aktivierung der p42 MAPK abhängig von der Aktivierung der PLC zu sein scheint (Börsch-Haubold *et al.*, 1995), ist dies ein möglicher Weg, über den die cAMP-PK und die cGMP-PK die Aktivierung der p42 MAPK hemmen könnten. Die Aktivierung der p38 MAPK scheint hingegen unabhängig von der Aktivierung der PLC zu sein (Ezumi *et al.*, 1999). Hier ist wahrscheinlich ein anderer Angriffsort der cAMP-PK und der cGMP-PK für die Hemmung verantwortlich.

7.3 Aktivierung und Hemmung der thrombozytären CD40L- und CD62P-Expression

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß endotheliale bzw. pharmakologische Vasodilatoren wie NO und Prostaglandine die Expression der Oberflächenmoleküle CD40 Ligand (CD40L) und P-Selektin (CD62P) auf Thrombozyten hemmen. Die Entwicklung und das Fortschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen wird stark beeinflusst von der Thrombozytenaktivierung und der damit verbundenen Expression von proinflammatorischen Molekülen wie CD40L und CD62P. CD62P ist ein gut charakterisierter Adhäsionsrezeptor auf Thrombozyten und Endothelzellen, der die Interaktion mit Leukozyten vermittelt (Palabrica *et al.*, 1992) und die Leukozyten zur Zytokinproduktion und -sekretion anregt (Neumann *et al.*, 1997). CD40L ist ein Mitglied vom Typ I der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie und wurde ursprünglich auf stimulierten CD4⁺-T-Zellen identifiziert. Während der Thrombozytenaktivierung wird CD40L auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert (Henn *et*

al., 1998). Es bindet an CD40 auf Endothelzellen und regt diese zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen an (Henn *et al.*, 1998; Slupsky *et al.*, 1998). Aktivierten Thrombozyten kommt daher eine besondere Rolle bei der Initiation von inflammatorischen Prozessen zu. Daß cAMP und cGMP/NO die Expression von CD62P auf Thrombozyten hemmt, wurde bereits gezeigt (Michelson *et al.*, 1996; Murohara *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1999; Gries *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß cAMP- und cGMP-erhöhende Vasodilatoren die Expression sowohl von CD62P als auch von CD40L hemmen (Abbildung 6.13a. und b.) und somit einen wichtigen Beitrag zur Verhinderung von inflammatorischen Prozessen leisten. Die durch ADP ausgelöste Expression von CD40L wurde jedoch nur teilweise gehemmt. Möglicherweise wird durch ADP ein anderer Mechanismus der CD40L-Freisetzung ausgelöst, der durch zyklische Nukleotide nur unvollständig gehemmt wird. Der Expressionslevel von CD40L war nach Stimulation mit Thrombin, U46619 und ADP etwa gleich hoch, folgte jedoch unterschiedlichen Kinetiken. Die Expression von CD62P war nach Thrombinstimulation etwa dreimal so stark wie nach Stimulation mit U46619. ADP vermochte nur eine sehr geringe Expression von CD62P auszulösen (Abbildung 6.13b.). Diese Beobachtung wird in neueren Studien bekräftigt, die zeigen, daß ADP allein keine Degranulierung auszulösen vermag, sondern auf die Freisetzung von TxA₂ aus den Thrombozyten angewiesen ist (Dangelmaier *et al.*, 2001). Die verschiedenen Kinetiken der CD40L- und CD62P-Expression weisen darauf hin, daß sie in verschiedenen intrazellulären Speicherorganellen enthalten sind. Von CD62P ist bekannt, daß es in den α -Granula gespeichert ist. Die intrazelluläre Lokalisation von CD40L ist noch nicht geklärt. Besonders die Tatsache, daß ADP eine Freisetzung von CD40L, aber nicht von CD62P, bewirkt, impliziert, daß CD40L zumindest teilweise in anderer Form als den sekretorischen Granula gespeichert ist und unabhängig von Degranulierungsprozessen freigesetzt wird. Dieser Mechanismus scheint durch zyklische Nukleotide nur teilweise gehemmt zu werden.

cAMP und cGMP entfalten ihre Wirkung in humanen Thrombozyten hauptsächlich über die cAMP-PK und die cGMP-PK, die zahlreiche Substrate phosphorylieren. Die Abläufe der Granulasekretion sind im Detail noch nicht verstanden. Es wurde jedoch gezeigt, daß ein erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) für die Sekretion essentiell sind (Knight *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1996; Sloan und Haslam, 1997). Durch die Hemmung der Phospholipase C (PLC) durch die cAMP-PK und die cGMP-PK

(Ryningen *et al.*, 1998) wird die Ca^{2+} -Freisetzung und die Produktion von DAG gehemmt, die beide für die Aktivierung der PKC erforderlich sind. Die wichtigsten Substrate der PKC in Thrombozyten sind Pleckstrin und MARCKS, die wahrscheinlich beide die Granulasekretion beeinflussen (Rotondo *et al.*, 1997; Sloan und Haslam, 1997; Elzagallaai *et al.*, 2000). Da für den Transport der Granula an die Zellmembran Umbauprozesse des Zytoskeletts von großer Bedeutung sind, sind vermutlich noch weitere Wirkmechanismen der cAMP-PK und cGMP-PK an der Hemmung der Sekretion beteiligt. Die cAMP-PK und cGMP-PK phosphorylieren zahlreiche Zytoskelett-assoziierte Proteine wie VASP, ABP, Caldesmon, GPIIb/IIIa, Rap1b und MLCK, die im phosphorylierten Zustand das Zytoskelett stabilisieren oder Umbauvorgänge hemmen (Eigenthaler und Walter, 1994).

7.4 Beeinflussung von humanen Endothelzellen durch aktivierte Thrombozyten

Mit Hilfe von *Atlas Human 1.2 cDNA Expression Arrays* wurden die Effekte von aktivierten Thrombozyten auf die Genexpression in humanen Endothelzellen untersucht. 16 Gene wurden identifiziert, deren Transkription nach Kontakt mit aktivierten Thrombozyten verstärkt wurde sowie ein Gen, dessen Expression vermindert war (Tabelle 6.2). Fünf dieser Gene waren bereits vorher dafür bekannt, daß sie durch aktivierte Thrombozyten induziert werden. Sie kodieren für Faktoren, die an der Zelladhäsion und an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind (Integrin α_v , ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 und IL-8) (Henn *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000). Bei den neu gefundenen Genen handelt es sich hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren (c-Jun, c-Myc, ErgB, ATF-4 und Egr1) und Wachstumsfaktoren (PDGF und *glial growth factor*). Außerdem wurden der Replikationsfaktor C, das Zelladhäsionsmolekül SQM1, das Integrin β_1 sowie der *corticotropin releasing factor receptor 1* verstärkt exprimiert. Eine verminderte Expression nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten wies das *bone morphogenic protein 4* (BMP4) auf. Die verstärkte Expression von c-Jun wurde zusätzlich im Northern Blot und im Western Blot bestätigt. Für die übrigen Faktoren steht diese Bestätigung noch aus. Ein Koinkubationsexperiment über 24 h zeigte, daß die Expression von c-Jun transient war (Abbildung 6.24). Bereits nach 0,5 h der Koinkubation wurde eine verstärkte Expression von c-Jun auf Proteinebene nachgewiesen, die nach 4 h noch deutlicher wurde. Nach 24 h wurde kein c-Jun mehr exprimiert. In weiteren Experimenten soll durch gezielte Blockade bestimmter Rezeptoren, beispielsweise durch

Antikörper gegen CD40L, P-Selektin oder den Fibrinogenrezeptor, die Bedeutung dieser Moleküle für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen untersucht werden. Um den Einfluß löslicher Faktoren zu bestimmen, sollen Endothelzellen mit dem Überstand der aktivierten Thrombozyten inkubiert werden. Es wurde bereits gezeigt, daß die Interaktion des thrombozytären CD40 Ligand mit CD40 auf Endothelzellen einen deutlichen Einfluß auf die Expression der inflammatorischen Moleküle ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, E-Selektin und Interleukin-8 hat (Henn *et al.*, 1998). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist zumindest teilweise an der Expression dieser Proteine beteiligt (Gawaz *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2000). Außerdem vermittelt die CD40L/CD40-Interaktion auch die verstärkte Freisetzung von TF und die verminderte Expression von Thrombomodulin und induziert so in den Endothelzellen einen prokoagulatorischen Phänotyp (Slupsky *et al.*, 1998). Thrombozyten interagieren außerdem über Fibrinogenbrücken mit dem Vitronektinrezeptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$) auf Endothelzellen. Diese Interaktion kann mit RGD-Peptiden oder Antikörpern gegen den Fibrinogenrezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) auf Thrombozyten geblockt werden (Gawaz *et al.*, 1997; Gawaz *et al.*, 2000). Neben den Interaktionen von membranständigen Molekülen beeinflussen auch von aktivierten Thrombozyten sezernierte, lösliche Faktoren die Endothelzellen. Beispielsweise wurde die Expression von Endothelin-mRNA in bovinen Endothelzellen durch den Überstand von Thrombin-aktivierten Thrombozyten ausgelöst (Ohlstein *et al.*, 1991). Auch die durch aktivierte Thrombozyten ausgelöste endotheliale Sekretion von MCP-1 und die Expression von ICAM-1 und Integrin $\alpha_v\beta_3$ scheint zumindest teilweise durch Interleukin-1 vermittelt zu werden, das jedoch sowohl aus den aktivierten Thrombozyten als auch aus den Endothelzellen freigesetzt werden könnte (Gawaz *et al.*, 2000). Der Überstand von geronnenem plättchenreichem Plasma induzierte eine starke chemotaktische Migration von bovinen und humanen Endothelzellen (English *et al.*, 2000; Yatomi *et al.*, 2000). Als aktive Komponente, die diesen Effekt hauptsächlich verursachte, wurde Sphingosin-1-phosphat (S1P), ein von Thrombozyten freigesetztes Lysophospholipid, identifiziert. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß ein Zusammenspiel verschiedener membranständiger und löslicher Faktoren für die Aktivierung der Endothelzellen durch aktivierte Thrombozyten verantwortlich ist.

Die Transkriptionsfaktoren, die in dieser Arbeit in den aktivierten Endothelzellen identifiziert wurden, sind in der Lage, ganze Netzwerke von Genen zu exprimieren. c-Jun ist zentraler Bestandteil der Klasse der dimeren AP-1 (Aktivierendes Protein 1)-Transkriptionsfaktoren,

sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren. Die Aktivität von c-Jun ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung vieler Zelltypen (Karin *et al.*, 1997). In Endothelzellen ist c-Jun außerdem an der Transkription von ICAM-1, MCP-1, PDGF-B, c-Jun, Collagen IV und Endothelin-1 beteiligt (Wang *et al.*, 1999; Bandyopadhyay *et al.*, 1995; Kawana *et al.*, 1995). c-Myc fördert ebenfalls die Proliferation, indem es zahlreiche Gene reguliert, die am Fortschreiten des Zellzyklus beteiligt sind (Grandori und Eisenman, 1997). Egr1 gehört zu den *immediate-early*-Genen und wird als Antwort auf zahlreiche Stimuli sehr rasch exprimiert. Im Blutgefäßsystem wird Egr1 nach Verletzung der Endothelschicht hochreguliert (Santiago *et al.*, 1999). Zu den Genen, die von Egr-1 reguliert werden, gehören u.a. TF, ICAM-1, PDGF-A und PDGF-B, Interleukin-2, *fibroblast growth factor* und TNF (Silverman und Collins, 1999). PDGF, MCP-1 und ICAM-1 wurden in dem hier verwendeten Assay-System ebenfalls hochreguliert (siehe Tabelle 6.2). In einem *in vitro*-System wurde gezeigt, daß die Reparatur eines mechanischen Endothelschadens durch Einwanderung der Zellen in die geschädigte Zone abhängig von der Expression von Egr-1 ist (Santiago *et al.*, 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte gemeinsame Aktivierung von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren deuten darauf hin, daß durch Kontakt mit aktivierten Thrombozyten die Proliferation der Endothelzellen oder auch der benachbarten glatten Muskelzellen angeregt werden könnte. Der Nachweis hierfür auf funktioneller Ebene steht jedoch noch aus. Physiologisch würde dieser Sachverhalt gut in das Bild der Wundheilung passen, wo Thrombozyten zunächst durch ein Gerinnsel die beschädigte Gefäßwand verschließen, bevor dann Endothelzellen einwandern, sich teilen und eine neue Gefäßwand bilden. Die Beteiligung von PDGF an der Angiogenese und Wundheilung wurde bereits beschrieben. PDGF stimuliert die Chemotaxis von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Neutrophilen und Makrophagen und regt diese zur Produktion und Sekretion weiterer Wachstumsfaktoren sowie von Matrixmolekülen wie Fibronectin, Collagen und Hyaluronsäure an (Heldin und Westermark, 1999). Die Hochregulierung der Integrine α_v und β_1 , über die der Kontakt zur extrazellulären Matrix aufgenommen wird, könnten die Endothelzellen bei der Migration unterstützen. In diesem Modell wären es die Thrombozyten selbst, welche die Verbindung zwischen Hämostase und Gefäßneubildung (Angiogenese) schaffen. Untersuchungen mit dem Überstand aus geronnenem plättchenreichem Plasma, das eine verstärkte Migration, Proliferation und die Bildung multizellulärer, gefäßähnlicher Strukturen bei den

Endothelzellen auslöste, unterstützen dieses Modell (English *et al.*, 2000). Andererseits könnten auch pathophysiologische Prozesse, wie beispielsweise die Entstehung atherosklerotischer Plaques, unterstützt werden. PDGF-A und PDGF-B sind sehr potente Wachstumsfaktoren, welche auch auf die glatten Muskelzellen wirken und in atherosklerotischen Plaques in erhöhter Konzentration vorliegen (Ross, 1993). Eine mögliche Rolle von PDGF ist, die Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Intima (innerste Schicht der Gefäßwand) zu fördern und sie dort zur Proliferation und Produktion von Matrixmolekülen anzuregen. Durch die Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen PDGF wurde in einem *in vitro*-Modell die Verdickung der Intima, die einen wesentlichen Anteil an der Ausbildung atherosklerotischer Plaques hat, um etwa 50% reduziert (Heldin und Westermark, 1999).

8 LITERATUR

Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., Andersson, K. E., Kehrel, B., Offermanns, S. und Fässler, R. (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* **18**: 37-48.

Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U. und Reinhard, M. (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* **274**(33): 23549-23557.

Bandyopadhyay, R. S., Phelan, M. und Faller, D. V. (1995). Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**(1): 72-78.

Bennett, J. S., Zigmond, S., Vilaire, G., Cunningham, M. E. und Bednar, B. (1999). The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin alpha(IIb)beta(3) for fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **274**(36): 25301-25307.

Börsch-Haubold, A. G., Kramer, R. M. und Watson, S. P. (1995). Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 25885-25892.

Börsch-Haubold, A. G., Kramer, R. M. und Watson, S. P. (1997). Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *Eur. J. Biochem.* **245**: 751-759.

Börsch-Haubold, A. G., Pasquet, S. und Watson, S. P. (1998). Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 28766-28772.

Brass, L. F., Laposata, M., Banga, H. S. und Rittenhouse, S. E. (1986). Regulation of the phosphoinositide hydrolysis pathway in thrombin-stimulated platelets by a pertussis toxin-

sensitive guanine nucleotide-binding protein. Evaluation of its contribution to platelet activation and comparisons with the adenylate cyclase inhibitory protein, *Gi. J. Biol. Chem.* **261**(36): 16838-16847.

Brass, L. F., Manning, D. R., Cichowski, K. und Abrams, C. S. (1997). Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb. Haemost.* **78**(1): 581-589.

Brookes, C. I. und Sigwart, U. (1999). Taming platelets in coronary stenting: ticlopidine out, clopidogrel in? *Heart* **82**(6): 651-652.

Browning, D. D., McShane, M. P., Marty, C. und Ye, R. D. (2000). Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**(4): 2811-2816.

Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. und Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**: 14509-14517.

Butt, E., Immler, D., Meyer, H. E., Kotlyarov, A., Laass, K. und Gaestel, M. (2000). Heat Shock Protein 27 is a Substrate of cGMP-dependent Protein Kinase in Intact Human Platelets. Phosphorylation-induced actin polymerization caused by Hsp27 mutants. *J. Biol. Chem.*

Butt, E., Nolte, C., Schulz, S., Beltman, J., Beavo, J. A., Jastorff, B. und Walter, U. (1992). Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem. Pharmacol.* **43**(12): 2591-2600.

Calderwood, D. A., Shattil, S. J. und Ginsberg, M. H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* **275**(30): 22607-22610.

Callsen, D., Pfeilschifter, J. und Brune, B. (1998). Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J. Immunol.* **161**: 4852-4858.

Cattaneo, M., Lecchi, A., Randi, A. M., McGregor, J. L. und Mannucci, P. M. (1992). Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood* **80**: 2787-2796.

Cavallini, L., Coassin, M., Borean, A. und Alexandre, A. (1996). Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**: 5545-5551.

Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C. J., Jockusch, B. M., Reinhard, M., Walter, U. und et al. (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14**(7): 1314-1321.

Cocks, T. M., Angus, J. A., Campbell, J. H. und Campbell, G. R. (1985). Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J. Cell. Physiol.* **123**(3): 310-320.

Collins, T. (1993). Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* **68**(5): 499-508.

Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9**(10): 899-909.

Dangelmaier, C., Jin, J., Smith, J. B. und Kunapuli, S. P. (2001). Potentiation of Thromboxane A₂-induced Platelet Secretion by Gi Signaling through the Phosphoinositide-3 Kinase Pathway. *Thromb. Haemost.* **85**: 341-348.

Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J. B. und Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J. Biol. Chem.* **273**(4): 2024-2029.

Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Kim, Y. B. und Kunapuli, S. P. (1999). Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* **82**(4): 1322-1326.

Daniel, J. L., Molish, I. R., Rigmaiden, M. und Stewart, G. (1984). Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J. Biol. Chem.* **259**(15): 9826-9831.

de Graaf, J. C., Banga, J. D., Moncada, S., Palmer, R. M., de Groot, P. G. und Sixma, J. J. (1992). Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* **85**(6): 2284-2290.

Defreyn, G., Gachet, C., Savi, P., Driot, F., Cazenave, J. P. und Maffrand, J. P. (1991). Ticlopidine and clopidogrel (SR 25990C) selectively neutralize ADP inhibition of PGE₁-activated platelet adenylate cyclase in rats and rabbits. *Thromb. Haemost.* **65**(2): 186-190.

Dickfeld, T., Lengyel, E., May, A. E., Massberg, S., Brand, K., Page, S., Thielen, C., Langenbrink, K. und Gawaz, M. (2001). Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* **49**(1): 189-199.

Diodati, J. G., Dakak, N., Gilligan, D. M. und Quyyumi, A. A. (1998). Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* **98**: 17-24.

Dusting, G. J., Moncada, S. und Vane, J. R. (1979). Prostaglandins, their intermediates and precursors: cardiovascular actions and regulatory roles in normal and abnormal circulatory systems. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **21**(6): 405-430.

Eigenthaler, M., Nolte, C., Halbrügge, M. und Walter, U. (1992). Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur. J. Biochem.* **205**: 471-481.

Eigenthaler, M. und Shattil, S. J. (1996). Integrin Signaling and the Platelet Cytoskeleton. Current Topics in Membranes, Vol. 43: Membrane Protein-Cytoskeleton Interactions. Nelson, W. J. San Diego, Academic Press: 265-291.

Eigenthaler, M., Ullrich, H., Geiger, J., Horstrup, K., Hönig-Liedl, P., Wiebecke, D. und Walter, U. (1993). Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J. Biol. Chem.* **268**: 13526-13531.

Eigenthaler, M. und Walter, U. (1994). Signal Transduction and cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb. Haemorrh. Disorders* **8**: 41-46.

El-Daher, S. S., Patel, Y., Siddiqua, A., Hassock, S., Edmunds, S., Maddison, B., Patel, G., Goulding, D., Lupu, F., Wojcikiewicz, R. J. und Authi, K. S. (2000). Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* **95**(11): 3412-3422.

Elzagallaai, A., Rose, S. D. und Trifaro, J. M. (2000). Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood* **95**(3): 894-902.

English, D., Welch, Z., Kovala, A. T., Harvey, K., Volpert, O. V., Brindley, D. N. und Garcia, J. G. (2000). Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* **14**(14): 2255-2265.

Ezumi, Y., Nishida, E., Uchiyama, T. und Takayama, H. (1999). Thrombopoietin potentiates agonist-stimulated activation of p38 mitogen-activated protein kinase in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 58-63.

Faure, M. und Bourne, H. R. (1995). Differential effects on cAMP on the MAP kinase cascade: evidence for a cAMP-insensitive step that can bypass Raf-1. *Mol. Biol. Cell* **6**: 1025-1035.

Fox, J. E. und Berndt, M. C. (1989). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelets. *J. Biol. Chem.* **264**(16): 9520-9526.

Freedman, J. E., Loscalzo, J., Benoit, S. E., Valeri, C. R., Barnard, M. R. und Michelson, A. D. (1996). Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J. Clin. Invest.* **97**: 979-987.

Freedman, J. E., Sauter, R., Battinelli, E. M., Ault, K., Knowles, C., Huang, P. L. und Loscalzo, J. (1999). Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ. Res.* **84**(12): 1416-1421.

Furchgott, R. F. und Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**(9): 2007-2018.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1992a). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* **326**(4): 242-250.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1992b). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N. Engl. J. Med.* **326**(5): 310-318.

Fuster, V., Fallon, J. T., Badimon, J. J. und Nemerson, Y. (1997). The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb. Haemost.* **78**(1): 247-255.

Gawaz, M. (1999). Das Blutplättchen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schomig, A. und Neumann, F. (2000). Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* **148**(1): 75-85.

Gawaz, M., Neumann, F. J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K. L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A. und Brand, K. (1998). Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* **98**(12): 1164-1171.

Gawaz, M., Neumann, F. J., Dickfeld, T., Reininger, A., Adelsberger, H., Gebhardt, A. und Schomig, A. (1997). Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* **96**(6): 1809-1818.

Geiger, J., Brich, J., Hönig-Liedl, P., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P., Herbert, J. M. und Walter, U. (1999). Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(8): 2007-2011.

Geiger, J., Hönig-Liedl, P., Schanzenbächer, P. und Walter, U. (1998). Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **351**: 235-246.

Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S. O. und Walter, U. (1992). Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 1031-1035.

Geiger, J., Nolte, C. und Walter, U. (1994). Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *Am. J. Physiol.* **267**(1 Pt 1): C236-244.

Grandori, C. und Eisenman, R. N. (1997). Myc target genes. *Trends Biochem. Sci.* **22**(5): 177-181.

Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Potts, B. C., Macdonald, S. G., Ross, R. und Krebs, E. G. (1993). Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10300-10304.

Gries, A., Bode, C., Peter, K., Herr, A., Bohrer, H., Motsch, J. und Martin, E. (1998). Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* **97**: 1481-1487.

Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. und Walter, U. (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* **265**: 3088-3093.

Halbrügge, M. und Walter, U. (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur. J. Biochem.* **185**(1): 41-50.

Harbeck, B., Hüttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B. M. und Illenberger, S. (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* **275**(40): 30817-30825.

Hathaway, D. R., Eaton, C. R. und Adelstein, R. S. (1981). Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature* **291**: 252-256.

Hauser, W., Knobloch, K. P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U. und Zimmer, M. (1999). Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 8120-8125.

Heldin, C. H. und Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**(4): 1283-1316.

Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. und Kroczeck, R. A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**: 591-594.

Hettasch, J. M. und Sellers, J. R. (1991). Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**: 11876-11881.

Hollopeter, G., Jantzen, H.-M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.-B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. und Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**: 202-207.

Horstrup, K., Jablonka, B., Hönig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. und Walter, U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur. J. Biochem.* **225**: 21-27.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. und Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**(11): 2745-2756.

Jin, J., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* **273**(4): 2030-2034.

Jin, J. und Kunapuli, S. P. (1998). Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 8070-8074.

Karin, M., Liu, Z. und Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**(2): 240-246.

Kawana, M., Lee, M. E., Quertermous, E. E. und Quertermous, T. (1995). Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**(8): 4225-4231.

Kawata, M., Kikuchi, A., Hoshijima, M., Yamamoto, K., Hashimoto, E., Yamamura, H. und Takai, Y. (1989). Phosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system and in response to prostaglandin E1 in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* **264**: 15688-15695.

Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. und Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell. Biol.* **144**(4): 745-754.

Knight, D. E., Niggli, V. und Scrutton, M. C. (1984). Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca²⁺. *Eur. J. Biochem.* **143**(2): 437-446.

Komalavilas, P., Shah, P. K., Jo, H. und Lincoln, T. M. (1999). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Pathways by Cyclic GMP and Cyclic GMP-dependent Protein Kinase in Contractile Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 34301-34309.

Kramer, R. M., Roberts, E. F., Striffler, B. A. und Johnstone, E. M. (1995). Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J. Biol. Chem.* **270**: 27395-27398.

Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Börsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J. und Jakubowski, J. A. (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* **271**: 27723-27729.

Kroczek, R. A., Graf, D., Brugnani, D., Giliani, S., Korthuer, U., Ugazio, A., Senger, G., Mages, H. W., Villa, A. und Notarangelo, L. D. (1994). Defective expression of CD40 ligand

on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol. Rev.* **138**: 39-59.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-685.

Law, D. A., DeGuzman, F. R., Heiser, P., Ministri-Madrid, K., Killeen, N. und Phillips, D. R. (1999). Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* **401**(6755): 808-811.

Lee, A. W. (1999). Synergistic activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP and myeloid growth factors opposes cyclic AMP's growth-inhibitory effects. *Blood* **93**: 537-553.

Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* **104**(12): 1731-1737.

Lutgens, E., Cleutjens, K. B., Heeneman, S., Koteliansky, V. E., Burkly, L. C. und Daemen, M. J. (2000). Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(13): 7464-7469.

Lutgens, E., Gorelik, L., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., Grewal, I. S., Koteliansky, V. E. und Flavell, R. A. (1999). Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat. Med.* **5**(11): 1313-1316.

Macphee, C. H., Reifsnnyder, D. H., Moore, T. A., Lerea, K. M. und Beavo, J. A. (1988). Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets. *J. Biol. Chem.* **263**: 10353-10358.

Manganello, J. M., Djellas, Y., Borg, C., Antonakis, K. und Le Breton, G. C. (1999). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A(2) receptor-associated Galpha(13). *J. Biol. Chem.* **274**: 28003-28010.

McNicol, A., Philpott, C. L., Shibou, T. S. und Israels, S. J. (1998). Effects of the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase inhibitor 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one (PD98059) on human platelet activation. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1759-1767.

Meredith, I. T., Anderson, T. J., Uehata, A., Yeung, A. C., Selwyn, A. P. und Ganz, P. (1993). Role of endothelium in ischemic coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.* **72**(8): 27C-31C; discussion 31C-32C.

Michelson, A. D. (1996). Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* **87**: 4925-4936.

Michelson, A. D., Benoit, S. E., Furman, M. I., Breckwoldt, W. L., Rohrer, M. J., Barnard, M. R. und Loscalzo, J. (1996). Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am. J. Physiol.* **270**: H1640-H1648.

Mills, D. C., Puri, R., Hu, C. J., Minniti, C., Grana, G., Freedman, M. D., Colman, R. F. und Colman, R. W. (1992). Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arterioscler. Thromb.* **12**(4): 430-436.

Moule, S. K. und Denton, R. M. (1998). The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells. *FEBS Lett.* **439**: 287-290.

Murohara, T., Parkinson, S. J., Waldman, S. A. und Lefer, A. M. (1995). Inhibition of nitric oxide biosynthesis promotes P-selectin expression in platelets. Role of protein kinase C. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 2068-2075.

Nachmias, V. T., Kavalier, J. und Jacobowitz, S. (1985). Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton. *Nature* **313**(5997): 70-72.

Nakayama, T., Soma, M., Rahmutula, D., Izumi, Y. und Kanmatsuse, K. (1997). Nonsense mutation of prostacyclin synthase gene in a family. *Lancet* **349**(9069): 1887-1888.

Neumann, F. J., Marx, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., Sticherling, C., Meinl, C., May, A. und Schomig, A. (1997). Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* **95**: 2387-2394.

Nurden, P., Savi, P., Heilmann, E., Bihour, C., Herbert, J. M., Maffrand, J. P. und Nurden, A. (1995). An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J. Clin. Invest.* **95**: 1612-1622.

O'Donnell, V. B. und Freeman, B. A. (2001). Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways : implications for vascular disease. *Circ. Res.* **88**(1): 12-21.

Offermanns, S. (2000). The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol. Chem.* **381**(5-6): 389-396.

Offermanns, S., Toombs, C. F., Hu, Y. H. und Simon, M. I. (1997). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* **389**(6647): 183-186.

Ohlstein, E. H., Storer, B. L., Butcher, J. A., Debouck, C. und Feuerstein, G. (1991). Platelets stimulate expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ. Res.* **69**(3): 832-841.

Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y. M., Sajer, S. A. und Furie, B. (1992). Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**: 848-851.

Palmer, R. M., Ashton, D. S. und Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**(6174): 664-666.

Papkoff, J., Chen, R. H., Blenis, J. und Forsman, J. (1994). p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 463-472.

Paul, B. Z., Jin, J. und Kunapuli, S. P. (1999). Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J. Biol. Chem.* **274**(41): 29108-29114.

Pearson, J. D. (1999). Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **12**(3): 329-341.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. und Moncada, S. (1987). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**(3): 1482-1489.

Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M. und Walter, U. (1995a). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* **14**(8): 1583-1589.

Reinhard, M., Halbrügge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B. M. und Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* **11**: 2063-2070.

Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D. und Walter, U. (1995b). Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**(17): 7956-7960.

Reinhard, M., Rüdiger, M., Jockusch, B. M. und Walter, U. (1996). VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* **399**(1-2): 103-107.

Rink, T. J. und Sage, S. O. (1990). Calcium signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* **52**: 431-449.

- Riondino, S., Gazzaniga, P. P. und Pulcinelli, F. M. (2001). Evidence for Platelet α IIb β 3 Activation despite Elevated Cytosolic cAMP. *Thromb. Haemost.* **85**: 320-325.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**(6423): 801-809.
- Rossomando, A. J., Payne, D. M., Weber, M. J. und Sturgill, T. W. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6940-6943.
- Rotondo, S., Evangelista, V., Manarini, S., de Gaetano, G. und Cerletti, C. (1997). Different requirement of intracellular calcium and protein kinase C for arachidonic acid release and serotonin secretion in cathepsin G-activated platelets. *Thromb. Haemost.* **78**(2): 919-925.
- Ryningen, A., Olav Jensen, B. und Holmsen, H. (1998). Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**(2-3): 235-248.
- Saklatvala, J., Rawlinson, L., Waller, R. J., Sarsfield, S., Lee, J. C., Morton, L. F., Barnes, M. J. und Farndale, R. W. (1996). Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J. Biol. Chem.* **271**: 6586-6589.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandberg, M., Butt, E., Nolte, C., Fischer, L., Halbrügge, M., Beltman, J., Jahnsen, T., Genieser, H. G., Jastorff, B. und Walter, U. (1991). Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCl-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem. J.* **279**(Pt 2): 521-527.

- Santiago, F. S., Lowe, H. C., Day, F. L., Chesterman, C. N. und Khachigian, L. M. (1999). Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am. J. Pathol.* **154**(3): 937-944.
- Savi, P., Beauverger, P., Labouret, C., Delfaud, M., Salel, V., Kaghad, M. und Herbert, J. M. (1998). Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett.* **422**: 291-295.
- Savi, P., Heilmann, E., Nurden, P., Laplace, M.-C., Bihour, C., Kieffer, G., Nurden, A. T. und Herbert, J.-M. (1996a). Clopidogrel: an antithrombotic drug acting on the ADP-dependent activation pathway of human platelets. *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis* **2**: 35-42.
- Savi, P., Pflieger, A. M. und Herbert, J. M. (1996b). cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **7**(2): 249-252.
- Schwarz, U. R., Geiger, J., Walter, U. und Eigenthaler, M. (1999). Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb. Haemost.* **82**: 1145-1152.
- Selwyn, A. P., Kinlay, S., Libby, P. und Ganz, P. (1997). Atherogenic lipids, vascular dysfunction, and clinical signs of ischemic heart disease. *Circulation* **95**(1): 5-7.
- Shattil, S. J. (1999). Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb. Haemost.* **82**(2): 318-325.
- Siess, W., Winegar, D. A. und Lapetina, E. G. (1990). Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**: 944-950.
- Silverman, E. S. und Collins, T. (1999). Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am. J. Pathol.* **154**(3): 665-670.

Sloan, D. C. und Haslam, R. J. (1997). Protein kinase C-dependent and Ca²⁺-dependent mechanisms of secretion from streptolysin O-permeabilized platelets: effects of leakage of cytosolic proteins. *Biochem. J.* **328**(Pt 1): 13-21.

Slupsky, J. R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Kroczeck, R. A. und Muller-Berghaus, G. (1998). Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb. Haemost.* **80**: 1008-1014.

Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. und Walter, U. (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **273**: 20029-20035.

Smolenski, A., Poller, W., Walter, U. und Lohmann, S. M. (2000). Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem.* **275**(33): 25723-25732.

Suhasini, M., Li, H., Lohmann, S. M., Boss, G. R. und Pilz, R. B. (1998). Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6983-6994.

Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**(4): 529-532.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**(9): 4350-4354.

Vane, J. R., Anggard, E. E. und Botting, R. M. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* **323**(1): 27-36.

Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E. und Zetter, B. R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell. Biol.* **99**(6): 2034-2040.

Waldmann, R., Nieberding, M. und Walter, U. (1987). Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur. J. Biochem.* **167**: 441-448.

Waldmann, R. und Walter, U. (1989). Cyclic nucleotide-elevating vasodilators inhibit platelet aggregation at an early step of the activation cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **159**: 317-320.

Walsh, M. T., Foley, J. F. und Kinsella, B. T. (2000). The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A₂ receptor is a target for prostacyclin-mediated desensitization. *J. Biol. Chem.* **275**(27): 20412-20423.

Wang, G. R., Zhu, Y., Halushka, P. V., Lincoln, T. M. und Mendelsohn, M. E. (1998). Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 4888-4893.

Wang, N., Verna, L., Hardy, S., Forsayeth, J., Zhu, Y. und Stemerman, M. B. (1999). Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(9): 2078-2084.

Wardell, M. R., Reynolds, C. C., Berndt, M. C., Wallace, R. W. und Fox, J. E. (1989). Platelet glycoprotein Ib beta is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15656-15661.

Yang, X., Sun, L., Ghosh, S. und Rao, A. K. (1996). Human platelet signaling defect characterized by impaired production of inositol-1,4,5-triphosphate and phosphatidic acid and diminished Pleckstrin phosphorylation: evidence for defective phospholipase C activation. *Blood* **88**(5): 1676-1683.

Yatomi, Y., Ohmori, T., Rile, G., Kazama, F., Okamoto, H., Sano, T., Satoh, K., Kume, S., Tigyi, G., Igarashi, Y. und Ozaki, Y. (2000). Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* **96**(10): 3431-3438.

Yoshimoto, H., Suehiro, A. und Kakishita, E. (1999). Exogenous nitric oxide inhibits platelet activation in whole blood. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33**: 109-115.

Zeicher, A. M., Drexler, H., Wollschlager, H. und Just, H. (1991). Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* **83**(2): 391-401.

Zhang, J., Shattil, S. J., Cunningham, M. C. und Rittenhouse, S. E. (1996). Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or beta-phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of alphaIIb beta3 integrin. *J. Biol. Chem.* **271**(11): 6265-6272.

Lebenslauf

Name: Ulrike Regina Schwarz

Geburtsdatum: 18. April 1973

Geburtsort: Siegen

Familienstand: ledig

1979 – 1983 Grundschule Betzdorf

1983 – 1992 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Betzdorf-Kirchen

Juni 1992 Abitur

Okt. 1992 – Sept. 1997 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (Abschluß: Diplom-Biotechnologin)

Aug. 1995 – Juni 1996 Praktikum und Beschäftigung als studentische Hilfskraft an der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) Braunschweig, Abteilung für Zellbiologie und Immunologie, Prof. Dr. J. Wehland

Aug. – Dez. 1996 Studienarbeit am Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA, Department of Vascular Biology 2, Laboratory of Dr. M. H. Ginsberg

April – Sept. 1997 Diplomarbeit am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg bei Prof. Dr. med. U. Walter

seit Oktober 1997 Doktorarbeit am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg bei Prof. Dr. med. U. Walter

Würzburg, den 22. Februar 2001