

1. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum Rechts der Isar / Deutsches Herzzentrum München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Die Rolle des Chemokins Fractalkine für die
Thrombozytenaktivierung und die Rekrutierung von Leukozyten an
inflammatorisch verändertes Endothel**

Moritz Stolla

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 15.01.2008 bei der Technischen Universität eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 16.07.2008 abgenommen

1. Einleitung
 - 1.1 Thrombozyten
 - 1.1.1 Thrombozytenmorphologie
 - 1.1.1.1 Thrombozytäre Membranglykoproteine (Selektine)
 - 1.1.2 Thrombozytenphysiologie und Pathophysiologie
 - 1.1.2.1 Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase und arterielle Thrombose
 - 1.2 Leukozyten
 - 1.2.1 Physiologie: Bedeutung der Leukozyten für das menschliche Immunsystem
 - 1.2.2 Pathophysiologie: Bedeutung der Leukozyten für die Atherogenese
 - 1.3 Chemokine
 - 1.3.1 Einteilung der Chemokine
 - 1.3.1.1 Fractalkine
 - 1.3.1.2 Fractalkine als Adhäsionsmolekül
 - 1.3.2 Bedeutung der Chemokine im Entzündungsprozess am Beispiel der Atherosklerose
 - 1.3.3 Bedeutung der Chemokine für die Thrombozytenaktivierung
- 2 Zielsetzung
- 3 Materialien und Methoden
 - 3.1 Probandenselektion
 - 3.2 Materialien
 - 3.2.1 Antikörper und Reagenzien
 - 3.2.2 Fluoreszierende Farbstoffe
 - 3.2.3 Puffer und Gele
 - 3.2.4 Zitratblut
 - 3.2.5 Heparinblut
 - 3.3 Methoden
 - 3.3.1 Thrombozytenpräparation
 - 3.3.2 Zellkultivierung und Zellstimulation
 - 3.3.2.1 Präparation von humanen Endothelzellen (HUVEC)
 - 3.3.2.2 Transfektion und Präparation von Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen
 - 3.3.3 Western Blot
 - 3.3.4 Durchflusszytometrie

- 3.3.4.1 Untersuchung der Expression von Fractalkine und etablierten Adhäsionsmolekülen auf HUVEC und CHO Zellen
 - 3.3.4.1.1 Probenpräparation
 - 3.3.4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse
 - 3.3.4.1.3 Auswertung
- 3.3.4.2 Untersuchung der Thrombozytenaktivierung durch lösliches und membrangebundenes Fractalkine
 - 3.3.4.2.1 Probenpräparation
 - 3.3.4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse
 - 3.3.4.2.3 Auswertung
- 3.3.4.3 Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten mit Leukozyten
 - 3.3.4.3.1 Probenpräparation und Stimulation
 - 3.3.4.3.2 Durchflusszytometrische Analyse
 - 3.3.4.3.3 Auswertung
- 3.3.5 Flusskammer
 - 3.3.5.1 Untersuchung der Leukozytenadhäsion an humanen Endothelzellen
 - 3.3.5.1.1 Versuchsdurchführung und Auswertung
 - 3.3.5.2 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion an humanen Endothelzellen und CHO Zellen
 - 3.3.5.2.1 Versuchsdurchführung und Auswertung
 - 3.3.5.3 Statistische Auswertung
- 4 Ergebnisse
 - 4.1 Nachweis von Fractalkine auf humanen Endothelzellen (HUVEC)
 - 4.2 Einfluss von Fractalkine auf die Adhäsion von Leukozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) im Modell der Flusskammer
 - 4.3 Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC)
 - 4.4 Thrombozytenadhäsion auf aktivierten Endothelzellen und die Rolle der adhärenen Thrombozyten für die Leukozytenrekrutierung
 - 4.5 Einfluss von Fractalkine auf die Thrombozytendegranulation und auf die Oberflächenexpression von P-Selektin
 - 4.6 Einfluss von Fractalkine auf die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten

- 4.7 Bedeutung von Fractalkine induzierter P-Selektin-Expression für die Leukozytenadhäsionen unter Flussbedingungen
- 5 Diskussion
 - 5.1 Bedeutung von Fractalkine und thrombozytärem P-Selektin für die Leukozyten-Adhäsion an inflammatorisches Endothel
 - 5.2 Bedeutung von Fractalkine für die Thrombozytenaktivierung und Leukozytenadhäsion
 - 5.3 Mögliche Bedeutung von Fractalkine für die Atherogenese
 - 5.4 Studienbeschränkungen
- 6 Zusammenfassung
- 7 Literaturverzeichnis
- 8 Abkürzungsverzeichnis
- 9 Abbildungsverzeichnis
- 10 Tabellenverzeichnis
- 11 Danksagung
- 12 Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Thrombozytenmorphologie

Die Erstbeschreibung von Thrombozyten (syn. (Blut-)Plättchen) erfolgte durch Bizzozzero im Jahre 1882. Es folgten Eberth und Schimmelbusch (1888) und Aschhoff (1925), die ihre Bedeutung in der Hämostase erforschten.

Thrombozyten sind anukleäre Zellen, die aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen. Es handelt sich um Zellfragmente, die normalerweise in einer Konzentration von 150.000 – 400.000 / μ l Blut vorkommen. Mit einem Durchmesser von 2 – 4 μ m sind sie die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Im Gegensatz zu anderen Zellen ist mRNA nur in sehr geringen Mengen vorhanden, die prinzipielle Möglichkeit zur Bildung von Proteinen ist daher vorhanden, allerdings deutlich eingeschränkt. Die physiologische Verweildauer eines Plättchens im peripheren Blutstrom beträgt ungefähr sieben Tage, mit einer täglichen Neuerungsrate von etwa 20 % der zirkulierenden Gesamtanzahl der Thrombozyten. Ihr Abbau wird durch das Retikulo-Endotheliale-System in Milz und Leber gewährleistet. Elektronenmikroskopisch fällt ihre diskoide Form auf, die sich bei Aktivierung in eine kugelig-stachelige Oberfläche mit Pseudopodien umwandelt (s. Abbildung 1 und 2). Dieser Wechsel geht mit einer Oberflächenzunahme von 8 μ m² auf 13 μ m² einher und ist für die folgende Adhäsion und Aggregation von Bedeutung.

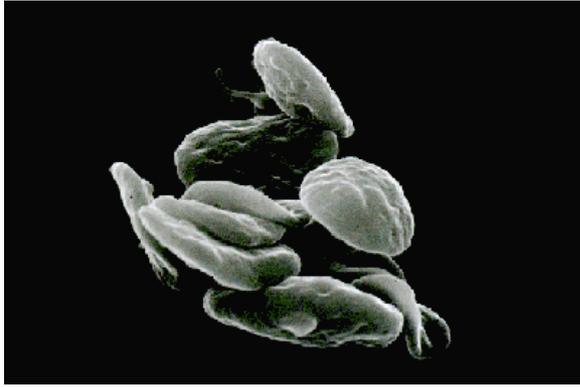


Abbildung 1: Ruhende Thrombozyten mit der charakteristischen diskoiden Form (Elektronenmikroskopisch Aufnahme von „The Platelet Page“ des Allgemeinen Krankenhauses Wien (<http://www.akh.wien.ac.at/biomed-research/htx/platweb.1htm>))

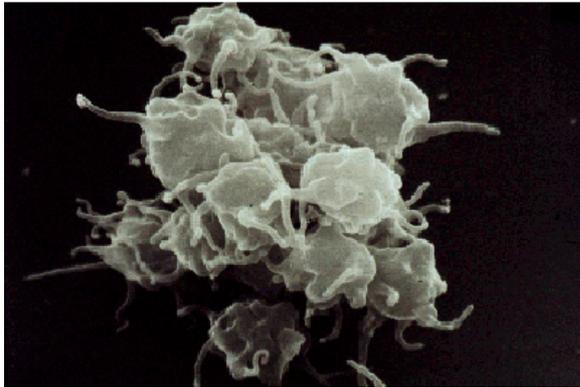


Abbildung 2: Aktivierte Thrombozyten (Elektronenmikroskopisch Aufnahme von „The Platelet Page“ des Allgemeinen Krankenhauses Wien (<http://www.akh.wien.ac.at/biomed-research/htx/platweb.1htm>)).

Der innere Aufbau eines Thrombozyten ist komplex. Es lassen sich vier Bereiche unterscheiden:

Die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen und das Membransystem (Mackie IJ 1988, White G 1987). Jede Zone hat ihre funktionelle Aufgabe:

Die **periphere Zone** besteht aus einer trilaminären Zellmembran, die reich an Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden (Glykokalix) ist. Die Glykoproteine übernehmen als Oberflächenrezeptoren eine wichtige Aufgabe. Des Weiteren finden sich verschiedene Enzyme, die unter anderem für die Kalziumfreisetzung von Bedeutung sind.

Die **strukturelle Zone** besteht aus Microtubuli, sowie einem morphologisch stark divergierenden Netzwerk aus Strukturproteinen (G-Aktin, F-Aktin und Myosin), die die diskoide Form des Thrombozyten in Ruhe aufrecht erhalten sowie seine morphologischen Änderungen bei Aktivierung gewährleisten.

Die **Zone der Organellen** befindet sich im Zytoplasma und besteht aus Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen, Glykogenspeicher, und plättchenspezifische Speichergranula, von denen man 3 Typen unterscheidet:

1. Dichtegranula
2. Lysosomen
3. α -Granula

Nach Aktivierung des Thrombozyten verschmelzen alle 3 Typen von Granula mit der Zellmembran und setzen ihre Inhalte (zum größten Teil hämostaserelevante Substanzen) frei. Die Inhaltsstoffe der Granula sind in Tabelle 1 (nach Gawaz 2001) aufgelistet.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (nach Gawaz 2001)

Dichtegranula	α – Granula	Lysosomen
ATP ADP Kalzium Serotonin Phosphat	Enzyme: α 1-Antitrypsin α 2-Makroglobulin α 2-Antiplasmin adhäsionsfördernde Proteine: Fibrinogen Fibronectin von Willebrand-Faktor Thrombospondin Vitronectin Glykoprotein IIb/IIIa P-Selektin Wachstumsfaktoren: PDGF TGF- β Epidermal-GF Endothelial-GF	α – Arabinoside β – Galaktosidase β – Glukuronidase N – Acetylglukosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin

	Zytokinähnliche Proteine: IL-1 CD40L PF 4 B-Thromboglobulin Koagulationsfaktoren: HMWK Plasminogen PAI-1 Faktor V Faktor XI Fibrinogen Protein S	
--	--	--

Die **Membransysteme** stellen die vierte Zone dar. Sie bestehen im Wesentlichen aus zwei bekannten Strukturen: einem mit der Membranoberfläche verbundenen offenen kanalikulären System (Surface Connected System, SCS) und einem dichten tubulären System (Dense Tubular System, DTS). Das SCS besteht aus geschlängelten Kanälen, die von der Oberfläche bis tief in den Thrombozyten reichen. Sie stellen somit eine Verbindung zwischen innen und außen dar und können dem Stoffaustausch dienen. Die geschlängelten Kanäle werden zusammen als Membranstapel in der Zelle komprimiert, und bei Aktivierung des Thrombozyten mit der Membranoberfläche verschmolzen. Dies führt zu einer zusätzlichen Glykoproteinexpression an der Zellmembran (Charo IF 1994). Das dichte tubuläre System stammt phylogenetisch vom rauen endoplasmatischen Retikulum ab. Es stellt eine der wesentlichen Kalziumspeicherquellen dar, die essenziell für die Plättchenaktivierung und den Plättchenmetabolismus sind. Außerdem ist es der Ort für den Arachidonsäure-Metabolismus und die Bildungsstätte von cyclooxygenaseähnlichen Vasokonstriktorsubstanzen wie Thromboxan A_2 innerhalb der Blutplättchen (Mackie IJ 1988).

1.1.1.1 Thrombozytäre Membranglykoproteine (Selektine)

Die komplexen Mechanismen der Hämostase und Thrombose erfordern ein enges Zusammenspiel von Plättchen, plasmatischen Koagulationsfaktoren, Endothel und anderen Strukturen der Gefäßwand (wie z.B. die extrazelluläre Matrix).

Adhäsionsprozesse, die durch eine Vielzahl von Adhäsionsrezeptoren vermittelt werden, spielen eine entscheidende Rolle bei diesen Vorgängen.

Plättchen exprimieren Glykoproteine auf ihren Membranen, die eine Zell-Zell Interaktion zwischen Thrombozyten auf der einen Seite und

- a) Thrombozyten (z.B. Glykoprotein (GP) IIb/IIIa)
- b) Leukozyten (z.B. P-Selektin)
- c) Endothelzellen (z.B. GPIIb/IIIa oder GPIb α -IX)
- d) subendotheliale Matrix (z.B. Kollagen-Rezeptoren)
- e) plasmatischen Koagulationsfaktoren (von Willebrand-Rezeptor)

auf der anderen Seite vermitteln.

Adhäsionsrezeptoren der Plättchen lassen sich nach ihrer molekularen Struktur in vier Gruppen einteilen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulin Typ. Nachfolgend soll, aufgrund der Relevanz in der vorliegenden Dissertation, nur auf die Selektine näher eingegangen werden.

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die heterotypische Interaktionen (Ausnahme: L-Selektin vermittelt auch homotypische Interaktionen) zwischen Zellen vermitteln. Die molekulare Struktur der Selektine ist durch eine extrazelluläre Lektin Domäne mit benachbarter EGF (Epidermal Growth Factor)-artiger Domäne, gefolgt von kurzen Regionen, die homolog zu den regulatorischen Komplementfaktoren sind. Es sind drei verschiedene Subtypen bekannt: L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin. Sie unterscheiden sich durch die Zellen, auf denen sie exprimiert werden und durch ihr Molekulargewicht (s. Tabelle 2).

P-Selektin kommt auf Plättchen und Endothel vor, es wird in α -Granula und Weibel Palade Körperchen gespeichert (McEver RP 1994). P-Selektin wird auf ruhenden Plättchen und Endothelzellen nicht oberflächen-exprimiert, jedoch werden auf beiden Zelltypen große Mengen nach Aktivierung freigesetzt und an der Zellmembran installiert. Dort spielt es eine große Rolle bei der sekundären Hämostase und vaskulären Reparatursprozessen. Auf Endothelzellen oder adhärenen Thrombozyten exprimiertes P-Selektin unterstützt beispielsweise die Adhäsion von Leukozyten an der endothelialen Läsion. Darüber hinaus erfolgt über P-Selektin eine inflammatorische Reaktion in Leukozyten (McEver RP 1995).

Tabelle 2 Selektine (nach Gawaz 2001)

Selectin	Synonym	Größe (kDa)	Liganden	Vorkommen	Funktion
L-Selektin	MEL – 14 LAM – 1 CD62L	75 – 95	Sialyl Lewis ^x (50 kDa)	Leukozyten	Regulation der Adhäsion von Leukozyten am Endothel
E-Selektin	ELAM – 1 CD62E	97 – 115	Sialyl Lewis ^x (150 kDa)	Endothel	Adhäsion der Granulozyten am Endothel
P-Selektin	CD62P PADGEM GMP-140	140	Sialyl Lewis ^x (120 kDa) PSGL-1 CD15	Endothel, Plättchen	Adhäsion der Leukozyten an Plättchen und Endothel

1.1.2 Thrombozytenphysiologie und Pathophysiologie

1.1.2.1 Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase und arterielle Thrombose

Für die Integrität des menschlichen Blutkreislaufs ist eine funktionierende Hämostase unverzichtbar. Die menschliche Hämostase erreicht eine enorme Komplexität, da sie sowohl zelluläre Strukturen, plasmatische Faktoren, als auch Bestandteile der Gefäßwand umfasst. Jedes dieser Systeme kann mit dem anderen interagieren und weist für sich pro- und antithrombotische Mechanismen auf. Die Homöostase der Systeme wird im physiologischen Zustand durch ein sensibles Gleichgewicht aus pro- und antithrombotischen Faktoren gewährleistet. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Richtung des prothrombotischen Zustandes, entsteht eine Thromboseneigung (thrombophile Diathese). Überwiegen die antithrombotischen Mechanismen, entsteht eine Neigung zur Hämorrhagie (hämorrhagische Diathese). Thrombozyten stellen den zentralen Bestandteil der zellulären Hämostase da. Sie beeinflussen sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase und können plasmatische und vaskuläre Faktoren beeinflussen (Metha P 1979, Fitzgerald DJ 1986). Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Gefäßsystem ohne relevante Interaktion mit der Gefäßwand. Die Adhäsion bzw. Aktivierung von Thrombozyten wird durch die endotheliale Auskleidung des Gefäßsystems verhindert. Insbesondere durch Freisetzung von vasoaktiven und anti-

thrombogenen Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) hemmt das intakte Endothel die physiologische Reaktivität von Thrombozyten und inhibiert ihre Interaktion mit der Gefäßwand. Bereits während der Entstehung atherosklerotischer Läsionen jedoch kann eine Verletzung der protektiven endothelialen Barriere durch so genannte Mikroerosionen zu einer lokalen Exposition der subendothelialen Matrix führen. Vielmehr jedoch kommt es durch die Ruptur fortgeschrittener atheromatöser Läsionen (Plaques) zu einer Freilegung der thrombogenen subendothelialen Matrix, wodurch der rasche thrombotische Gefäßverschluss der betroffenen Arterie eingeleitet wird. Die Exposition von Matrixproteinen wie Kollagen triggert sehr rasch die lokale Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie die Rekrutierung und Bindung von Thrombozyten an das Plaquematerial im Bereich der verletzten Gefäßwand. Es resultiert eine arterielle Thrombose mit einem das betroffene Gefäß teilweise oder komplett okkludierenden Thrombus. (Leung LLK 1986) (Siess W 1989).

Die ersten Schritte der **primären Hämostase** sind durch eine Adhäsion von Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand gekennzeichnet (transiente Adhäsion). Sie findet unter arteriellen Flussbedingungen mit hohen Scherraten statt. Die sekundäre (feste) Adhäsion beschreibt eine Haftung der Thrombozyten an subendothelialen Strukturen, wie z. B. adhäsiven Glykoproteinen (Andrews RK 1997).

Die transiente Adhäsion führt über das Rollen und Anheften (engl. „tethering“) zu morphologischen Veränderung, Aktivierung und „Spreizen“ der Thrombozyten am Endothel. Darüber hinaus werden aus den Granula Substanzen freigesetzt die eine pro-aggregatorische und vasokonstriktive Wirkung besitzen. Vermittelt wird der Adhäsionsprozess über Rezeptoren auf Thrombozyten, die subendotheliale Strukturen erkennen und binden. Der für die transiente Adhäsion wichtigste Rezeptor ist der GPIb-V-IX Rezeptor, er bindet am von Willebrand Faktor (vWF), man spricht von der Kontaktphase. Hinzu kommen Rezeptoren für Fibronektin, Kollagen und Laminin. Sie vermitteln eine Verfestigung der Adhärenz am Subendothel (Stabilisierungsphase). Die Aktivierungsphase ist durch eine morphologische Veränderung gekennzeichnet, mit Ausbildung der charakteristischen Pseudopodien und zur Freisetzung von Thromboxan A₂. Beides hat eine weitere Thrombozytenrekrutierung, Aktivierung und Aggregation zur Folge sowie durch

Vasokonstriktion eine Blutstromverlangsamung und somit eine verstärkte Thrombosierungsneigung. Zuletzt kommt es zum kompletten Gefäßlumenverschluss. Eine komplette Thrombusbildung ist nur durch eine Aktivierung der Thrombozyten zu erreichen. Sie geht mit morphologischen Veränderungen, Aktivierung der Oberflächenrezeptoren sowie Wechsel in der Orientierung von Membranphospholipiden einher (Siess W 1989). Während der Adhäsion und dem Wechsel der Oberflächenstruktur beginnen die Thrombozyten mit der Freisetzung von Inhaltsstoffen ihrer Granula (Sekretion oder Degranulation genannt). Dieser Prozess ist ATP- und Kalzium-abhängig und wird via Exozytose der Granula und über das offene kanalikuläre System ermöglicht. ADP wird durch Thrombozyten, die Gefäßwand und Erythrozyten freigesetzt. Es sorgt für eine verstärkte Thrombozytenaktivierung sowie Thrombozytenrekrutierung, durch eine spezifische Bindung an einem Membranrezeptor auf Thrombozyten. Das α -granuläre Glykoprotein P-Selektin wird während der Sekretion auf die Membranoberfläche verlagert und vermittelt eine Plättchen-Leukozyten Aggregation und inflammatorische Reaktionen bei Leukozyten (Holt JC 1985). Darüber hinaus werden noch viele weitere Stoffe freigesetzt, die unterschiedliche Interaktionen ermöglichen.

Das durch die primäre Hämostase entstandene Aggregat ist eher instabil und erfordert eine zusätzliche Konsolidierung. Dies wird durch die **sekundäre Hämostase**, die eine Interaktion mit der plasmatischen Koagulationskaskade darstellt, gewährleistet (Colman RW 1994). Die sekundäre Hämostase beginnt mit Aktivierung der Koagulationskaskade und der Formation von Thrombin und Fibrin. Hierfür spielt der Kontakt mit der aktivierten Thrombozytenoberfläche eine entscheidende Rolle. Man spricht von der „Prokoagulanten Aktivität“ der Thrombozyten (Flier JS 1992). Sie ist charakterisiert durch eine Darstellung von negativ geladenen Oberflächenstrukturen auf aktivierten Plättchen (dies entspricht dem so genannten Plättchen Faktor 3) und die dadurch ermöglichte Anlagerung der Koagulationsfaktoren IXa, VIIIa und Ca^{2+} (Bervers EM 1983, Bervers EM 1993). Dies führt zu einer Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Aktivierte Thrombozyten setzen in diesem Zusammenhang Faktor V frei, dieser bindet an die negativ geladenen Phospholipide und mit Xa und Prothrombin bildet sich der katalytisch wirksame Prothrombinase-Komplex (II, Xa, V, Ca^{2+} , PF3). Er sorgt für eine Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Die Freisetzung von Isomerasen aus Thrombozyten treibt die Aktivierung von Thrombin weiter voran (von Bruehl et al. J. Clin. Invest. 2008, im

Druck). Ein weiterer enzymatischer Komplex ist der so genannte Tenase-Komplex (IXa, VIIIa, Ca^{2+} , PF3). Die oben beschriebene Rolle von Plättchen bei der Aktivierung von Thrombin durch Interaktionen mit Koagulationsfaktoren ist von Bedeutung für die Fibrinbildung in der Nähe des Plättchenaggregates, was eine konsekutive Verfestigung des Thrombus zur Folge hat. Thrombin ist darüber hinaus ein Plättchenagonist und sorgt für eine zusätzliche Plättchenrekrutierung. Der letzte Schritt der sekundären Hämostase besteht in einer Kontraktion des Thrombus (Gerinnselretraktion) (Plow EF 1995). Das Gerinnsel schrumpft unter der Bindung zwischen Fibrin und Thrombozyten über den GP IIb/IIIa Rezeptor und Pseudopodienbildung. Dieser Prozess dauert über Stunden an und es wird Serum freigesetzt.

1.2 Leukozyten

1.2.1 Physiologie: Bedeutung der Leukozyten für das menschliche Immunsystem

Leukozyten sind die wesentlichen Zellen des menschlichen Immunsystems.

Zur Familie der Leukozyten zählen: T und B Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten (im weiteren: Eosinophile, Basophile, Neutrophile).

All diese Zellen haben spezifische Aufgaben, so zum Beispiel ist die Antikörperproduktion eine Aufgabe der B-Lymphozyten und die Zerstörung von Bakterien eine Aufgabe insbesondere der Neutrophilen.

Alle Leukozyten werden aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark produziert. Lymphozytopoetische Stammzellen bilden die Grundlage für T und B Lymphozyten sowie für natürliche Killerzellen. Myelozytopoetische Stammzellen bilden die Grundlage für Monozyten, Eosinophile, Basophile und Neutrophile. Die Reifung der Leukozyten wird über verschiedene Faktoren reguliert, z.B. Colony stimulating factor (CSF) oder verschiedene Interleukine (IL). Über den Blutstrom gelangen die Leukozyten zu ihren jeweiligen Geweben. Die normale Blutleukozytenkonzentration beträgt $3,4-10,8 \times 10^9/l$ Blut, wobei Neutrophile ca. 45-74 %, Lymphozyten 16-45 %, Monozyten 4-10 %, Eosinophile 0-7 % und Basophile 0-2 % ausmachen.

Jede Leukozytensubgruppe hat ihre eigenen morphologischen und funktionellen Charakteristika.

Granulozyten sind ca. 12µm groß und enthalten granuläre Partikel. Sie werden auch polymorphonukleäre Leukozyten genannt. Dies liegt an ihrem atypisch geformten Nucleus. Neutrophile sind die häufigsten Granulozyten und enthalten drei verschiedene Arten von Granula: azurophile, spezifische und sekretorische Granula (Bainton DF 1995). Neutrophile sind die wichtigsten zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort. Eosinophile und Basophile sind normalerweise in sehr viel geringerer Zahl im Blut vorhanden. Sie werden vor allem zu Orten allergischer Entzündungsreaktionen rekrutiert, oder sind an der Abwehr gegen parasitäre Infektionen beteiligt. Monozyten sind etwa 12-15µm im Durchmesser mit einem bohnenförmigen Nucleus (Douglas SD 1995). Monozyten sind Vorläufer von Makrophagen, die wiederum für Antigen Präsentationen und zellvermittelte Phagozytose verantwortlich sind. Lymphozyten sind klein (6-9µm) und tragen wenig zytoplasmatische Organellen (Kay NE 1995). Lymphozyten können sich in Effektorzellen differenzieren, die dann gegen infektiöse Eindringlinge angehen können. B-Lymphozyten können sich nach Aktivierung in Plasmazellen differenzieren, die für die Antikörper vermittelte Abwehr zuständig sind. T-Lymphozyten können sich in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen differenzieren. T-Helferzellen können T, B-Zellen und Makrophagen aktivieren. Natürliche Killerzellen (NKZ) sind Lymphozyten mit zytotoxischen Granula und sind Teil des angeborenen Immunsystems.

Die Leukozytenmembranen verfügen über eine hohe Zahl von Glykoproteinen, von denen viele als Adhäsionsmoleküle fungieren und somit einen Zell-Zell-Kontakt oder Migration vermitteln. Manche Adhäsionsmoleküle werden auf allen Leukozyten exprimiert, während andere nur auf bestimmten Subtypen vorkommen (Tan P 1999). L-Selektin und P-Selektin Glykoprotein Ligand (PSGL-1) werden auf allen Leukozyten exprimiert. L-Selektin vermittelt eine homotypische Aggregation zwischen Leukozyten und das Anheften und Rollen (engl. „tethering“ und „rolling“) von Leukozyten auf Endothelzellen (Guyer DA 1996). PSGL-1 ist ein Ligand für Selektin-vermittelte Verbindungen zwischen Leukozyten und Thrombozyten, für homotypische Leukozyten-Leukozyten Interaktionen und für Leukozyten-Endothel Interaktionen (Moore KL 1998) (Yang J 1999) (Hicks AE 2003). Leukozytenspezifische β_2 -Integrine, wie Leukozytenfunktion assoziierte Antigene (LFA-1; CD11a/CD18), Mac-1

(CD11b/CD18) und p150/95 (CD11b/CD18) fördern eine feste Adhäsion (engl. „firm adhesion“). LFA-1 wird auf allen Leukozytenpopulationen exprimiert, während Mac-1 und p150/95 nur auf Granulozyten und Monozyten exprimiert wird. Leukozyten tragen außerdem Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Immunglobulin-Superfamilie, unter anderem das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (engl. intercellular adhesion molecule 1 oder abgekürzt als ICAM-1; CD54), 2 (ICAM-2; CD102) und 3 (ICAM-3; CD50), die an einer Leukozytenadhäsion und -migration beteiligt sind (Kriegelstein CF 2001).

Leukozytenaktivierung führt zu einer Reihe von funktionellen Antworten, dazu gehören die Diapedese, die Transmigration aus dem Blutkreislauf in periphere Gewebe, die Sekretion von Granula, Phagozytose, Synthese und Freisetzung von Radikalen und Zytokinen und Zytotoxizität. Im Falle von Infektionen werden Leukozyten in mehreren Schritten vom zirkulierenden Blutstrom an Orte der akuten Inflammation rekrutiert (Butcher EC 1991) (Springer TA 1994). Zunächst kommt es zum losen Rollen, dann zum Anheften der Leukozyten an inflammatorisch verändertes Endothel, welches unter venösen Flussverhältnissen von Selektinen und α_4 -Inegrinen vermittelt wird. Während des Rollens auf entzündlich verändertem Endothel bekommen Leukozyten Signale von Zytokinen, Chemokinen sowie von Glykoproteinligation (Ley K 2002). Diese vielfältigen Signale führen zu verstärkter Integrinexpression und einer erhöhten Affinität der β_2 -Integrine, wie LFA-1 und Mac-1, für ihre Liganden. Interaktionen zwischen Integrinen und ICAM führen zu einer festen Adhäsion (engl. „firm adhesion“). Diese wird gefolgt von einer Migration durch das Endothel (Diapedese).

Klassifikation	Zelluläre Verteilung	Rezeptor / Ligand
Selektine L-Selektin	alle Leukozyten	PSGL-1
Muzin-ähnliche Glykoproteine PSGL-1	alle Leukozyten	Selektine
Integrine CD29 ($\alpha_4\beta_1$) CD11a/CD18 (LFA-1) CD11b/CD18 (Mac-1) CD11c/CD18 (p150, 95) $\alpha_4\beta_7$	Monozyten, Lymphozyten alle Leukozyten Monozyten, Neutrophile Monozyten, Neutrophile Lymphozyten	VCAM-1 VCAM-1, 2, 3 ICAM-1, Fibrinogen Fibrinogen VCAM-1
Immunglobulin Superfamilie ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3 PECAM-1	alle Leukozyten Lymphozyten, Monozyten alle Leukozyten alle Leukozyten	LFA-1, Mac-1 LFA-1 $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ PECAM-1, CD38

Tabelle 3: Übersicht der Membranglykoproteine auf Leukozyten (nach Tan P 1999)

Nach der Migration zu der infizierten Region nehmen Granulozyten und Monozyten / Makrophagen die Eindringlinge auf. Pathogene werden zunächst von Leukozytenoberflächenrezeptoren (Makrophagen Mannose Rezeptor, Scavenger Rezeptor, Rezeptor für das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS)) erkannt und dann mittels Phagozytose aufgenommen. Reaktive Sauerstoffverbindungen (O_2^- , H_2O_2 , HOCl), NO-Verbindungen, lytische Enzyme im Phagosom und zytotoxische Verbindungen aus Granula zerstören dann die Mikroorganismen (Babior BM 1973). Neutrophile verfügen über eine besonders ausgeprägte Menge an radikalen Sauerstoffverbindungen und sind somit besonders potente Zerstörer von eindringenden Mikroorganismen. Makrophagen können mittels Freisetzung von Zytokinen Neutrophile anlocken und darüber hinaus Antigene von aufgenommenen Mikroorganismen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, was wiederum die

Lymphozytenaktivierung triggert. Dies führt dazu, dass zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen ihre Aufgabe via Zell-Zell Kontakt erfüllen können, was in einer Lyse der eindringenden Pathogene mündet. T-Helferzellen aktivieren B-Zellen und verursachen eine Transformation in Plasmazellen, die Antikörper gegen fremde Eindringlinge produzieren.

Leukozytenaktivierung geht mit komplexen metabolischen und biosynthetischen Reaktionen einher, die essenziell für die Leukozytenfunktion und die inflammatorischen Antworten sind. So ist zum Beispiel die Mobilisierung von Kalzium, durch den PLC vermittelten Phospholipidabbau und die Produktion von IP_3 , essenziell für die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Neutrophilen (Dewald B 1988). Phospholipidprodukte, die durch die Aktivierung von PLA_2 entstehen, wie Prostaglandine, Leukotriene (LT) und PAF sind potente Mediatoren von Inflammation. Prostaglandine und PAF werden auch von Thrombozyten produziert, wohingegen Leukotriene nur von Leukozyten, in einem 5-Lipoxygenase abhängigen Weg, produziert werden können. Während der Aktivierung von Leukozyten wird die 5-Lipoxygenase an die Zellmembran transloziert. Dort katalysiert sie die Transformation von Arachidonsäure in 5-Hydroperoxeikosatetraenidsäure (5-HPETE). 5-HPETE wird dann in $LT-A_4$ dehydrogeniert sowie zuletzt in $LT-B_4$ und $LT-C_4$ umgewandelt (Peters-Golden M 2003).

1.2.2 Pathophysiologie: Bedeutung der Leukozyten für die Atherogenese

Der heutigen Lehrmeinung entsprechend wird die Atherosklerose als chronischer, systemischer, inflammatorischer Prozess beschrieben, der eine Lipideinlagerung in der Intima von arteriellen Gefäßwänden zur Folge hat (Libby P 2002) (Ross R 1999). Diese Lipideinlagerungen sind die ersten sichtbaren atherosklerotischen Veränderungen und werden als „Fatty Streaks“ bezeichnet. In westlichen Nationen sind solche Veränderungen oft schon bei sehr adipösen Jugendlichen oder Kindern mit homozygoter Hypercholesterinämie sichtbar. Die Lipideinlagerungen sind reich an oxidiertem LDL und an Monozyten und Makrophagen (Ross R 1999). Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Diabetes Mellitus oder Nikotinabusus sind mit einer erhöhten basalen Aktivität und Hyperaggregabilität von Thrombozyten assoziiert. Die Adhäsion von Thrombozyten

an Endothelzellen ist ein wichtiger Faktor in der Atherogenese, da sie den ersten nachweisbaren Schritt der Plaqueinitiation darstellt und somit der Leukozytenadhäsion zeitlich vorausgeht (Huo Y 2003) (Massberg S 2002) (Massberg S 2003). In bestimmten Regionen von Blutgefäßen, wo der Zustand von laminarer Strömung nicht gewährleistet ist, z.B. Abzweigung von Blutgefäßen (Karotidenbifurkation), kann es durch turbulente Strömung zu einem kurzen Kontakt zwischen Gefäßwand und aktiviertem Blutplättchen kommen. Dieser Kontakt führt zu einer Aktivierung des Endothels, mit konsekutiv verstärkter monozytärer Transmigration.

Das VCAM-1 (engl. Vascular adhesion molecule-1) ist ein bekanntes Adhäsionsmolekül das primär eine Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten vermittelt. Neben VCAM-1 scheinen auch P-Selektin und E-Selektin wichtige Kandidaten für die Rekrutierung von Leukozyten an inflammatorisches Endothel zu sein (Dong Z 1998). Insgesamt ist der Prozess der Leukozytenadhäsion bzw. Rekrutierung im atherosklerotischen Kontext jedoch noch sehr schlecht verstanden und seine Erforschung ist Teil der vorliegenden Arbeit. Die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ vermitteln eine Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen an Endothelzellen. Darüber hinaus vermittelt oxidiertes eine NF- κ B abhängige Expression von Leukozytenadhäsionsrezeptoren auf inflammatorischem Endothel (Libby P 2002). Nachdem Leukozyten, wie Monozyten oder Lymphozyten adhären wurden, kommt es zur Penetration der Zellen durch das Endothel mit folgender Durchwanderung der Gefäßwand bis zur Intima. Einmal dort angekommen differenzieren die mononukleären Leukozyten in Makrophagen, die oxidiertes LDL phagozytieren und zu Schaumzellen werden. Dieser Phagozytoseprozess wird über Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen vermittelt. Einige Schaumzellen verlassen die Arterienwand um sie so von den akkumulierenden Lipiden zu reinigen, andere wiederum gehen als Schaumzellen in der Intima über Apoptose zugrunde, dies führt daher zu dem Phänomen des so genannten „nekrotischen Kerns“ eines atherosklerotischen Plaques. Makrophagen die LDL aufnehmen setzen eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z.B. M-CSF, PDGF, VEGF, TGF- α , IGF, IL-1) frei. Diese führen im Verlauf zu Proliferation von glatten Muskelzellen sowie zu Proliferation von Proteinen der extrazellulären Matrix, was wiederum zu Wachstum des atherosklerotischen Plaques führt.

1.3 Chemokine

1.3.1 Einteilung der Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen (ca. 8 –14 kDa), untereinander strukturell verwandten Molekülen, die eine Leukozytenmigration durch Interaktionen mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermitteln. Daher rührt auch ihre obsoleete Bezeichnung als „chemoattractant cytokines“. Es sind mittlerweile etwa 40 verschiedene Chemokine bekannt. Chemokine spielen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Die Einteilung der Chemokine nach dem Keystone Chemokin Symposium erfolgt in zwei große Untergruppen auf der Basis des Arrangements der beiden N-terminalen Cystein Aminosäuren: CC oder CXC, je nach dem ob sich zwischen ihnen noch eine Aminosäure befindet, oder ob sie direkt miteinander verbunden sind. Das Chemokine Fractalkine nimmt eine Sonderstellung ein, da es ein CX₃C Motiv aufweist, also 3 weitere Aminosäuren zwischen den beiden Cystein Aminosäuren besitzt. Darüber hinaus ist es das einzige Chemokine mit einem muzinartigen Stiel (Bazan JF 1997). Die Chemokine Nomenklatur basiert auf der Chemokine Rezeptor Klassifikation, die ein CC, CXC oder CX₃C vorsieht, gefolgt von einem R für Rezeptor sowie einer Nummer. Die Nummer ist die gleiche, die auch zur Spezifizierung des Genlokus verwendet wird (z.B. SCYd1 im Falle von Fractalkine). Am Beispiel von Fractalkine bezeichnet man den Rezeptor also als CX₃CR1. Der passende Ligand wird nach der aktuellen Klassifikation zusätzlich durch ein L und die Nummer des Genlokus gekennzeichnet (CX₃CL1).

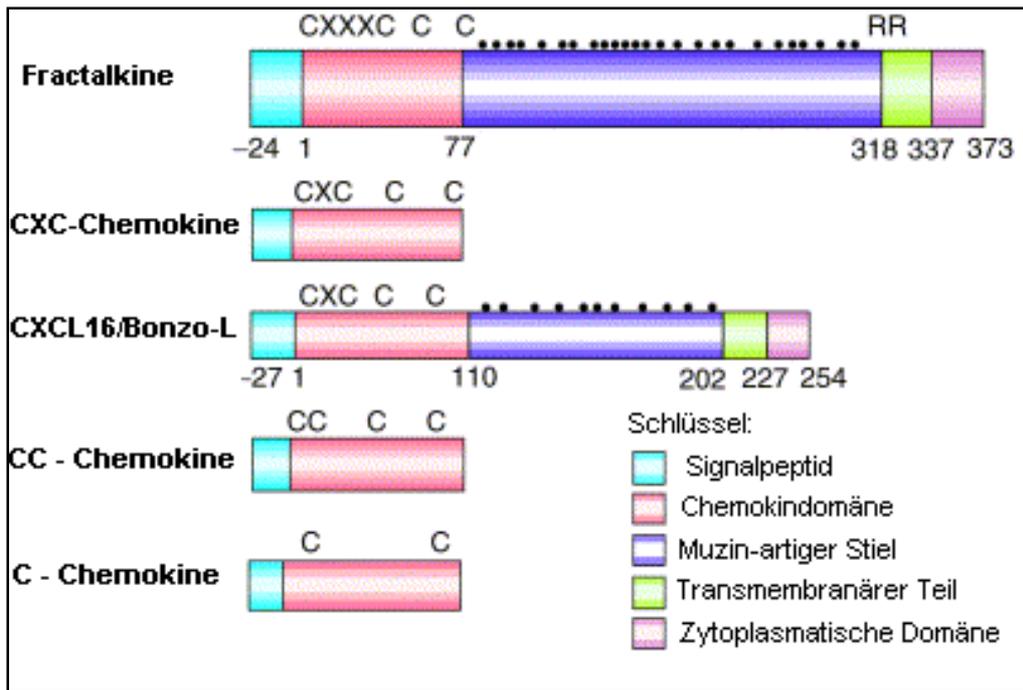


Abbildung 3: schematische Darstellung der Ultrastruktur von verschiedenen Chemokinen (nach Umehara T, ATVB 2004)

1.3.1.1 Fractalkine

Fractalkine wird als transmembranäres Molekül auf Zelloberflächen exprimiert. Ultrastrukturell besteht Fractalkine (s. Abbildung 3) aus 373 Aminosäuren. Die erste extrazelluläre Komponente ist das Signalpeptid, gefolgt von der Chemokindomäne, die sich aus 76 Aminosäuren zusammensetzt, wobei die ersten 5 Aminosäuren das für Fractalkine typische Muster: CysXaaXaaXaaCys aufweisen. Darauf folgt der muzinähnliche Stiel, der reich an O-glykosilierten Serin und Threonin Resten ist. Die transmembranäre Domäne ist reich an hydrophoben Aminosäuren und wird von einer kurzen intrazellulären Domäne (37 Aminosäuren) abgeschlossen.

Die Expression von Fractalkine kann durch inflammatorische Cytokine wie TNF- α , INF- γ oder IL-1 auf Endothelzellen induziert werden. Im Gegensatz dazu wird seine Expression durch T2-Helfer Cytokine, wie IL-4 oder IL-13 gehemmt (Fratice P 2001).

Lösliches Fractalkine kann von der Zelloberfläche durch Proteolyse an einer membranahen Stelle freigesetzt werden, und entfaltet dann als lösliches Chemokin hohes chemotaktisches Potenzial für Monozyten und T-Zellen.

Der Fractalkine Rezeptor besitzt 7 transmembranäre Domänen, gekoppelt an GTP-bindende Proteine. Er wurde zuerst bei Ratten (dort genannt RBS 11) und wenig später beim Menschen (V28) gefunden (Combadiere C 1995 ; Raport CJ 1995). Seine Expression ist bekannt auf CD16⁺ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie auf CD14⁺ Monozyten, Thrombozyten (Schäfer A, Schulz C 2004), Endothelzellen (Schäfer 2007) und manchen T-Zell Typen (ruhende und CD8⁺ T-Zellen) beim Menschen (Imai T 1997).

1.3.1.2 Fractalkine als Adhäsionsmolekül

Vor der Entdeckung von Fractalkine wurde angenommen, dass Chemokine nur in löslicher Form auftreten und mit Zelloberflächenstrukturen wie Proteoglykanen und Gewebe Matrixstrukturen wie Glykosaminoglykane interagieren, um mit der Zelloberfläche verbunden zu bleiben (Tanaka Y 1993). Es kommt daraufhin zu einer G-Protein vermittelten Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche. Diese vermitteln dann eine Adhäsion am Endothel via ICAM-1 und / oder VCAM-1. Es zeigte sich, dass im Falle von Fractalkine zusätzlich ein anderer Mechanismus existiert.

Fractalkine kann durch seinen langen muzinartigen Stiel, auf dessen Spitze die Chemokindomäne sitzt selbst, dass heißt ohne die Hilfe von Integrinen, unter venösen Flussbedingungen als Adhäsionsmolekül fungieren. Zusätzlich kann über G-Protein vermittelte Wege eine Aktivierung von Leukozyten vermittelt werden, welche wiederum über Integrinaktivierung eine besonders feste Adhäsion ermöglicht (Goda S 2000) (s. Abbildung 4).

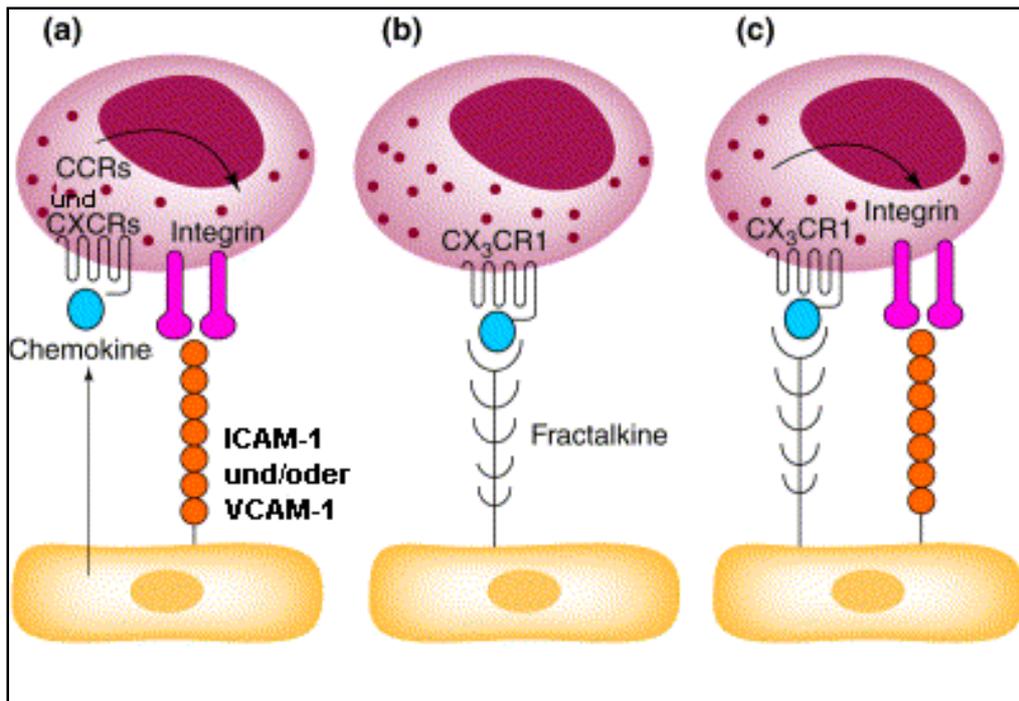


Abbildung 4: Die durch Fractalkine vermittelte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (nach Umehara T, ATVB 2004),

- a) durch lösliche Chemokine wird eine Integrin vermittelte Antwort getriggert**
- b) Fractalkine als Adhäsionsmolekül**
- c) Koadhäsion durch Fractalkine sowie eine durch Fractalkine getriggerte Integrin abhängige Adhäsion**

Fractalkine wird, in Kontrast zu seiner adhäsionsfördernden Rolle, auch die Inhibition von MCP-1 Chemokin, das primär zelluläre Migration fördert, zugeschrieben.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Rolle von Fractalkine sowohl in einer Adhäsion der Fractalkine-Rezeptor exprimierenden Zellen auf den Endothelzellen, als auch in einer Förderung der Transmigration von Leukozyten liegt.

1.3.2 Bedeutung von Chemokinen im Entzündungsprozess am Beispiel der Atherosklerose

Atherosklerose ist ein chronischer inflammatorischer Prozess. Von Chemokinen ist bekannt, dass sie bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, wie Rheumatoide Arthritis, Asthma, Multiple Sklerose und Transplantatsabstoßung. Chemokinen wird auch eine bedeutende Rolle bei der

Progression der Atherosklerose zugeschrieben. In ihrer Hauptfunktion als migrationsfördernde Cytokine sind sie an der initialen Rekrutierung von Entzündungszellen (Monozyten / Makrophagen) in die Gefäßwand beteiligt. Außerdem spielt eine Aktivierung von endothelständigen Chemokinen beim Rekrutierungsvorgang eine entscheidende Rolle (Glass CK 2001). Bei fortschreitender Krankheitsdauer sezernieren die zu Schaumzellen umgewandelten Makrophagen Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Cytokine und Chemokine, die eine weitere Entzündungsprogredienz triggern (Mach F 2001).

Bis jetzt wurde eine besondere Bedeutung der CC-Chemokine und möglicherweise von Fractalkine im Kontext der Atherosklerose nachgewiesen.

Fractalkine wurde in menschlichen atherosklerotischen Plaques gefunden (Wong BW 2002) (Lucas A 2003). Wong et al. verwendeten immunhistochemische Assays, um nachzuweisen, dass Fractalkine in Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen in der Media von atherosklerotisch alterierten humanen Koronararterien exprimiert wird. Studien mit ApoE/CX₃CR1-defizienten Mäusen zeigten die entscheidende Rolle von Fractalkine in der Signaltransduktionskaskade der Atherosklerose. Bei den Doppel-Knockout Mäusen zeigte sich eine im Vergleich zu Kontrollmäusen eine signifikante Reduktion der atherosklerotischen Plaques. Genetische Variationen in den Chemokin-Genen wurden interessanterweise als Risikofaktor für Atherosklerose identifiziert, im Einzelnen waren dies:

A) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

Bei einem Polymorphismus in der Promotorregion des MCP-1-Gens, der eine erhöhte Transkriptionsrate zur Folge hat, und bei zusätzlicher Behandlung von Monozyten mit IL-1 β kam es zur erhöhten MCP-1 Produktion, gegenüber der Kontrolle. Erhöhte MCP-1 Level können zur Zunahme der Atherosklerose beitragen. Szalai et al. Fanden, dass der Polymorphismus in seiner homozygoten Variante deutlich häufiger bei Patienten mit Atherosklerose vorkam, als bei gesunden Kontrollpersonen (Szalai C 2001).

B) CC-Chemokin Rezeptor 5

Der CCR5/RANTES Chemokin / Chemokin-Rezeptor Pfad wurde ebenfalls mit Atherosklerose und Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht. CCR5 wird auf Makrophagen, T-Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert, ebenso wie auf glatten Muskelzellen der Aorta, was auf eine mögliche Rolle bei Atherosklerose

hinweist. Eine bekannte 32-Basenpaar-Deletion auf dem CC5-Rezeptor Gen geht mit einem geringeren Risiko für tödlichen Myokardinfarkt einher (Gonzales P 2001; Szalai C 2001).

C) Fractalkine / Fractalkine-Rezeptor

Es sind zwei Polymorphismen bekannt, einer hat ein Wechsel von Valin zu Isoleucin zur Folge auf Position 249 (CX₃CR1-I249), der andere verursacht einen Wechsel von Threonin zu Methionin auf Position 280 (CX₃CR1-M280). Diese Mutationen sind in der sechsten und siebten transmembranären Domäne lokalisiert. In drei unabhängigen Studien wurde nachgewiesen, dass sowohl der I249, als auch der M280 Polymorphismus des CX₃CR1 bei Menschen mit einem reduzierten Risiko für koronare Herzkrankheit einhergeht (Moatti D 2001; McDermott DH 2001; McDermott DH 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Chemokine und ihre Rezeptoren, besonders RANTES und MCP-1 eine wichtige Rolle in der Progression der Atherosklerose spielen. Die genaue Rolle von Fractalkine in der Atherogenese ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt und soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.3.3 Bedeutung der Chemokine für die Thrombozytenaktivierung

Eine Aktivierung von Thrombozyten durch primäre Agonisten wie Thrombin, Adenosin Diphosphat (ADP) und Kollagen führt zu Aggregation und Adhäsion. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Chemokine über die Fähigkeit verfügen Thrombozyten zu aktivieren oder eine bestehende Aktivierung durch geringe Mengen von Agonisten zu potenzieren.

Stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α ; CXCL12) kann eine Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten über den Rezeptor CXCR4 induzieren. SDF-1 α ist ein Chemokin, dessen Expression auf atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnte. Es liegt daher eine Verbindung zur Atherogenese nahe (Abi-Younes S 2000). Ebenso konnte für die Chemokine „macrophage derived chemokine“ (MDC; CCL22) und „thymus- / activation-regulated chemokine“ (TARC; CCL17) gezeigt werden, dass sie Thrombozyten über einen Rezeptor (CCR4) aktivieren. Beides sind

Chemokine, die in atherosklerotischen Läsionen überexprimiert werden (Abi-Younes S 2001). Sowohl für SDF-1, als auch für MDC und TARC gilt, dass sie die Aktivierung von voraktivierten Thrombozyten durch bekannte Agonisten wie ADP oder Thrombin weiter steigern können (Gear AR 2001).

Aktivierte Thrombozyten können ihrerseits inflammatorische Veränderung in Endothelzellen induzieren (Gawaz 1998). Die Expression des CD40L wurde nach Stimulation *in vitro* und bei Thrombusformation *in vivo* nachgewiesen (Pitsilos S 2003). Für CD40L konnte gezeigt werden, dass es (wie andere proinflammatorische Zytokine auch) eine endotheliale Aktivierung und eine Sekretion von Chemokinen (zum Beispiel MCP-1; CCL2) bewirkt. „Monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1; CCL2) fördert eine Rekrutierung von Monozyten und somit die Inflammation in atherosklerotischem Plauegewebe (Henn V 1998). Folgerichtig konnte in *in vivo* Experimenten bei Mäusen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem Antikörper gegen CD40L eine reduzierte Formation und sogar Rückbildung von atherosklerotischen Läsionen zufolge hat (Mach F 1998).

Auch von Fractalkine ist bisher bekannt, dass es in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird. Auf Rattenthrombozyten führte Fractalkine zur Aktivierung, Degranulation und Adhäsion auf Kollagen, wobei ebenfalls eine Koaktivierung von ADP eine Rolle spielt (Schäfer A, Schulz C 2004). Der Rezeptor auf Thrombozyten ist CX₃CR1. Darüber hinaus ist für Fractalkine und SDF-1 bekannt, dass sie in glatten Muskelzellen der Neointima hochreguliert werden (Zeiffer U 2004). Dies könnte bei der Aktivierung von zirkulierenden Thrombozyten im Kontext einer vaskulären Verletzung bei Plaqueruptur eine Rolle spielen. Daneben bieten sie auch die Möglichkeit einer inflammatorischen Rekrutierung von Monozyten.

2. Zielsetzung

Es sollten mögliche Mechanismen analysiert werden, über die Fractalkine zur Manifestation atherosklerotischer Läsionen beitragen könnte. Im Detail sollte daher

- a) seine Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten an inflammatorisches Endothel, erstmalig unter arteriellen Flussbedingungen in Vollblut bestimmt werden und,

- b) die Bedeutung von Fractalkine für die Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion definiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Probandenselektion

Probanden waren geeignet für die Teilnahme an den Untersuchungen, wenn sie gesund waren, also im Speziellen an keiner Erkrankung litten, die mit Veränderung von Thrombozytenzahl, -aktivierung und -funktion einhergeht. Des Weiteren sollten sie die letzten zehn Tage vor Blutentnahme keine Medikation eingenommen haben, von der eine Interferenz mit der Thrombozytenfunktion bekannt ist (NSAR, Thienopyridine, etc.).

3.2 Materialien

3.2.1 Antikörper und Reagenzien

Bei den verschiedenen Messungen wurden verschiedene Fluorochrom-konjugierte, monoklonale Antikörper zur Zellidentifizierung bzw. Funktionsdarstellung verwendet. Die verwendeten Antikörper und Reagenzien sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

- ADP;

Sigma, St. Louis, USA

- Anti-CD11b-FITC;

Firma: Immunotech, Marseille, Frankreich

- Anti-CD14-FITC;

Firma: Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

- Anti-CD41-PE;

Firma: DAKO, Glostrup, Dänemark

- Anti-CD45-FITC;

Firma: Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland

- Anti-CD54-FITC;

Firma: Beckmann, Coulter, Krefeld, Germany

- Anti-CD61-FITC;

Firma: Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland

- Anti-CD62P-FITC;

Firma: BD Pharmingen, San Diego, USA

- Anti-CD62E-FITC;

Firma: Calbiochem, Bad Schwalbach, Deutschland

- Anti-CD106-FITC;

Firma: Serotec, Düsseldorf, Deutschland

- Anti-Human $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin (GP IIb/IIIa) (c7E3);

Firma: Lilly Deutschland, Bad Homburg, Deutschland

- Anti-Human Aktin (I-19);

Firma: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

- Anti-Human CX₃CL1 (Lot Nr. AF 537);

Firma: R&D, Minneapolis, USA

- Anti-Human CX₃CL1 (Lot. Nr. mAb365);

Klon: 51637

Firma: R&D Diagnostics, Minneapolis, MN, USA

- Anti-Human CX₃CR1 (Lot. Nr. TP502);

Firma: Torrey Pines Biolabs, Houston, Texas, USA

- Anti-Human GPIIb α ;

Firma: Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- Anti-Human IgG Antikörper;

Firma: ImmunoResearch West Baltimore, USA

- Anti-Maus IgG1-Isotype Kontrolle;

Firma: Becton and Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- Anti-Maus Antikörper-FITC;

Firma: DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland

- Anti-Ziege IgG;

Firma: Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland

- FACS-Lysing Solution;

Firma: Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland

- Interferon- γ (INF- γ);

Firma: PeproTech, London W68LL, United Kingdom

- Paraformaldehyd (PFA);

Firma: Sigma, St. Louis, USA

- Rekombinantes menschliches Fractalkine (rhCX₃C);

Firma: R&D Diagnostics, Minneapolis, Minnesota, USA

- Tumornekrosefaktor- α (TNF- α);

Firma: PeproTech, London W68LL, United Kingdom

3.2.2 Fluoreszierende Farbstoffe

Zur Färbung von Thrombozyten bzw. Leukozyten wurden folgende Fluorochrome verwendet:

- 5 - carboxyfluoreszin diacetat succinimidyl ester (DCF)

Firma: Molecular Probes, Eugene, Oregon ,USA

- Rhodamin-6G

Firma: Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

3.2.3 Puffer und Gele (in alphabetischer Reihenfolge):

Zur Herstellung von Gelen und Puffern wurden die im Folgenden aufgelisteten Reagenzien eingesetzt::

- Anodenpuffer 1: 300 mM Tris, 20 % MeOH, pH 10,4

- Anodenpuffer 2: 25 mM Tris, 20%MeOH, pH 10,4

- HEPES-Tyrodes-Puffer 1:

NaCl 132 mM; KCl 4 mM; NaHCO₃ 11,9 mM; NaH₂PO₄ 0,36 mM; Glukose 10 mM; pH 6,5

- HEPES-Tyrodes-Puffer 2:

s. Puffer 1; pH 7,4 + CaCl₂, 1 mM; MgCl₂, 1 mM

- Hybond Nitrozellulose-Membran

Firma: Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckingham, UK

- Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM Aminocaproinsäure, 20 % MeOH, pH 9,4

- Lämmli-puffer (4fach): 300 mM Tris-Cl pH 6,8, 6 % DTT, 400 mM SDS, 40 % Glyzin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

- PBS (Phosphate buffered saline)

Firma: Dulbeccos, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- PBS-T: 0,1 % Tween in PBS (Phosphate buffered saline)

- Precast Novex Tris-Glyzin Gradientengel

Firma: Invitrogen, Karlsruhe, Germany

- RIPA Puffer (zur Lysatgewinnung bei Immunoblottingverfahren): 50mmol/L Tris-HCl, pH7,4, 150mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natrium Deoxycholat, 0,1% SDS, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid

Firma: Roche, East Sussex, United Kingdom

- SDS-Kammerpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 0,1 % SDS, mit HCl_{aq}, pH 8,3

3.2.4 Zitratblut:

Den Probanden wurde 5 ml Blut in eine handelsübliche Monovette abgenommen, und mit in dem Monovette vorhandenen 2,8-prozentigen ACD (Acid citrate dextrose: Zitronensäure 3,8 mM und Dextrose 125 mM; 1 ml ACD auf 4 ml Vollblut) antikoaguliert. Es wurde darauf geachtet, die Stauung am Oberarm so geringfügig wie möglich zu halten, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund wurde auch auf eine geringe Abnahmegeschwindigkeit geachtet. Nach Blutentnahme wurde das Röhrchen leicht geschwenkt, um das Zitrat gut mit dem Blut zu mischen.

3.2.5 Heparinblut

Heparinblut wurde wie Zitratblut gewonnen, allerdings wurde mit 0,5 vol.% Heparin antikoaguliert.

3.3 Methoden

3.3.1 Thrombozytenpräparation:

Vollblut wurde den gesunden (s.o.) Probanden aus mäßig gestauten Armvenen vorsichtig in mit ACD (Acid citrate dextrose: Zitronensäure 3,8 mM und Dextrose 125 mM; 1 ml ACD auf 4 ml Vollblut) gefüllte Spritzen abgenommen. Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde durch Zentrifugation bei 430 g für 20 Minuten gewonnen. Dem PRP wurde HEPES (10mM) modifizierter Tyrodes-Puffer 1 (NaCl 132 mM; KCl 4 mM; NaHCO₃ 11,9 mM; NaH₂PO₄ 0,36 mM; Glukose 10 mM; pH 6,5) im Verhältnis 1 ml PRP auf 3,5 ml Puffer zugefügt. Daraufhin wurden plasmafreie Plättchen (PFP) durch die Zentrifugation von PRP bei 900 g für 10 Minuten gewonnen. Das

resultierende Pellet wurde in HEPES modifiziertem Tyrodes-Puffer 2 (s. Puffer 1; pH 7,4; CaCl₂, 1 mM; MgCl₂, 1 mM) resuspendiert und zwar bis zu einer finalen Thrombozytenkonzentration von 2 x 10⁸/ml.

3.3.2 Zellkultur und Zellstimulation

3.3.2.1 Präparation von humanen Endothelzellen (HUVEC)

Kryokonservierte humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) wurden bei der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) gekauft und in 37 °C beheizten Brutschränken kultiviert. Zur Verwendung kam HUVEC-Medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland), das alle 2 bis 3 Tage gewechselt wurde. In regelmäßigen Abständen wurden mikroskopische Kontrollen durchgeführt und bei Bedarf die Zellen gesplittet, so dass diese konfluierend wachsen konnten. Es wurden Zellkulturflaschen der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Am jeweiligen Tage vor den Untersuchungen wurde das konditionierte Medium abgenommen und anschließend mit PBS gewaschen, um die Medienreste mit α₁-Antitrypsin zu entfernen.

Danach wurden die Zellen mit Trypsin und EDTA vom Schalenboden abgelöst und in 20 Well Platten mit eingelegten sterilen Mikrotiterplatten überführt. Dort wurden sie auf den Mikrotiterplatten als Monolayer mit HUVEC-Medium konfluierend wachsen gelassen. Zur Anwendung kamen Zellen der 3. oder 4. Passage. Am Tage vor dem Versuch wurden sie entweder unstimuliert belassen oder für 20 Stunden entweder

- a) mit 50 ng/ml TNF-α stimuliert
- b) mit 20 ng/ml INF-γ stimuliert
- c) mit je 50 ng/ml TNF-α und 20 ng/ml INF-γ stimuliert.

Punkt c war für alle weiteren Versuche dann die Vorgehensweise der Wahl.

Am Tage des Experiments wurde konfluentes Wachstum erreicht und über mikroskopische Kontrolle sichergestellt. Für alle weiteren Experimente (also mit Ausnahme des Nachweises von Fractalkine auf HUVEC) wurden Zellen entweder unstimuliert belassen oder direkt mit beiden Zytokinen kostimuliert.

3.3.2.2 Transfektion und Präparation von Chinese Hamster Ovary (CHO)

Zellen

Das Flp-In System von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA) wurde verwendet, um eine Flp-In CHO (Chinese hamster ovary) Zelllinie herzustellen, die Fractalkine stabil exprimiert. Die kodierende Sequenz von menschlichem Fractalkine (GenBank Nummer BC001163) wurde vom Säugetier-Expressionsvektor pcDNA3 amplifiziert mit cDNA von vollständigem, membrangebundenem Fractalkine. Es wurden die Primer 5´ - GCGGCCGCTAGCGCCACCATGGCTCCGATATCTCTGTCTGTCG-3´ und 5´ - GCGGCCGGATCCTCACACGGGCACCAGGACATA-3´ verwendet. Das resultierende PCR-Fragment wurde in die NheI und BamHI Restriktionsseiten des Expressionsvektors pcDNA5-FRT (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) geklont, um das Plasmid pcDNA5-hFKN zu erhalten. Flp-In CHO Zellen (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurden in einem Verhältnis von 9:1 (w/w) der Plasmide pOG44:pcDNA5-hFKN kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen in einem Medium mit 500 µg/ml Hygromycin B selektiert. Hygromycin resistente Foci wurden ca. 2 Wochen nach der Transfektion entnommen, expandiert und in Duplikate gesplittet, wobei ein Set auf Zelloberflächenexpression von menschlichem Fractalkine untersucht wurde. Dies erfolgte mittels einer FACS Analyse mit Antikörpern gegen menschliches Fractalkine (Maus Anti-Human, Klon: 51637.11) und einem sekundären Antikörper (Anti-Maus IgG) mit FITC Markierung. Hochgradig Fractalkine-positive rekombinante Klone wurden mittels eines MoFlo™ Durchflusszytometrie-Gerätes (DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) sortiert. Hierdurch wurde ein Reinheitsgrad von über 98 % erreicht. Hierauf wurden die transfizierten Zellen unter begrenzter Verdünnung geklont und in Gegenwart von 500 µg/ml Hygromycin gehalten. Nicht transfizierte Flp-In CHO und pcDNA5/FRT Mock transfizierte Flp-In CHO Zellen dienten als Kontrollzellen.

3.3.3 Western Blot

Western Blot ist eine Methode, die von Towbin, Burnette und Gordon von 1979 bis 1984 etabliert wurde. Es werden elektrophoretisch getrennte Proteine von einem Gel auf eine Membran transferiert (engl. „geblottet“) und durch spezifische Antikörper gegen bestimmte Aminosäuresequenzen (epitopische Antigene), die vom Zielprotein dargestellt werden, markiert. Die Methode ist deswegen sehr sinnvoll für die Identifikation und Quantifizierung von Proteinen in Zelllysaten, die nicht radiomarkiert sind.

Dadurch dass die elektrophoretische Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, entstehen keine Probleme, die durch Löslichkeit, Aggregation und Kopräzipitation des Zielproteins mit den anderen Proteinen zustande kommen könnten. Die Proben werden mit Detergenzien (SDS-Puffer) und reduzierenden Agenzien (wie β -Mercaptoethanol) gelöst, danach durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt, dann auf eine Membran transferiert (Nitrocellulosefilter), die danach mit Ponceau S gefärbt wird. Der Filter wird darauf hin mit unmarkierten Antikörpern, die für das Zielprotein spezifisch sind, in Berührung gebracht. Zuletzt wird der gebundene Antikörper mit Hilfe von sekundären immunologischen Reagenzien detektiert (z.B. Meerrettich-Peroxidase gebundene Anti-Immunglobulin Antikörper), gefolgt von einer Chemilumineszenz durch enzymatische Produktion ein Licht emittierendes Präzipitat. Der Western Blot ermöglicht den Nachweis von so geringen Mengen wie 1-5 ng eines mittelgewichtigen Proteins. Zur Analyse der Fractalkine-Expression mittels Western Blot wurden HUVEC wie unter 3.3.1 beschrieben präpariert. Anschließend wurden sie in vorgekühltem RIPA-Puffer (s. Materialien) lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die zellulären Proteine durch Zentrifugation (16000 g; 15 Minuten) von Membranresten getrennt. Von jeder Probe wurden 25 μ g Protein unter reduzierenden Bedingungen auf einem vorgefertigten 8-16 % Novex Tris-Glyzin Gradientgel isoliert und auf eine Hybond Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunoblot wurde nach Standardprotokollen mittels eines polyklonalen Ziege Anti-Human Fractalkine Antikörpers sowie eines sekundären Meerrettich-Peroxidase Anti-Ziege IgG durchgeführt. Um eine gleiche Proteinmenge auf allen Bahnen sicherzustellen, wurden die Membranen erneut mit einem polyklonalen Antikörper gegen Aktin in einer finalen Konzentration von 0,2 μ g/ml markiert.

3.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Überprüfung der Thrombozyten- und Leukozytenfunktion, sowie der Thrombozyten-Leukozyteninteraktion *ex vivo*. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einem kontinuierlichen Fluss von Zellen in einer speziellen FACS-Lösung durch die Apparatur, wobei ein Laserstrahl durch den Zellfluss fällt und in charakteristischer Weise re-/deflektiert wird: Die Vorwärtsstreuung (engl. Forwardscatter) des Lasers gibt Auskunft über die Größe der Zellen in der Lösung. Die Seitwärtsstreuung (engl Side Scatter) gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Der Laserstrahl wird durch Photodioden detektiert und am Bildschirm durch ein zweidimensionales Diagramm repräsentiert. Auf der x-Achse findet sich der Forward Scatter, auf der y-Achse der Side Scatter. Jeder Punkt der Punktwolke im Diagramm repräsentiert eine Zelle im Zellfluss der Probe.

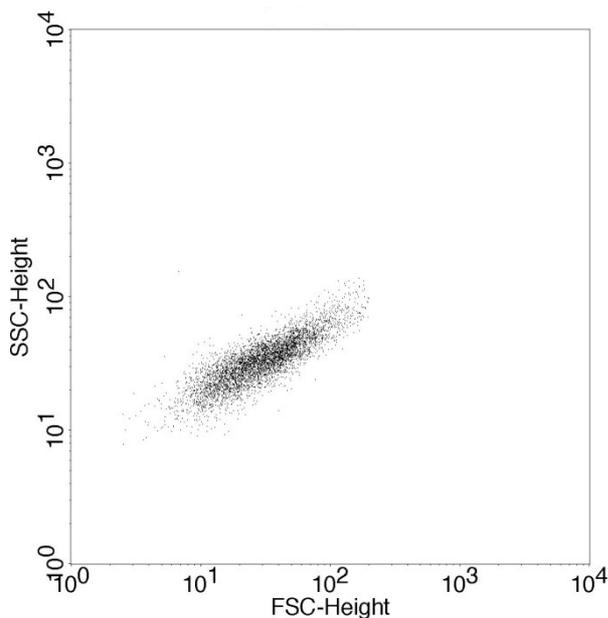


Abbildung 5: Punktwolke einer durchflusszytometrischen Messung von Thrombozyten. Jeder Punkt repräsentiert einen Thrombozyten im Zellfluss der Probe.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Charakterisierung von Zellen mittels FACS ist die Markierung durch Fluoreszenz-emittierende Antikörper. Hierdurch wird die Expression von Antigenen auf der Oberfläche von Zellen sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz wird ebenfalls über Photodioden erfasst. Das hier verwendete

Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton&Dickinson) erkennt die in Tabelle 4 dargestellten Fluoreszenzen. Die Parameter (Streuung und Fluoreszenz) lassen sich beliebig am Bildschirm gegeneinander auftragen. Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von Zellcharakteristika ist neben der Punktwolke (Dot Plots) auch die Darstellung von Histogrammen, wobei die gezählten Zellen (Events) gegen einen weiteren beliebigen Parameter (meist Fluoreszenz) aufgetragen werden (s. Abbildung 5). Dies ermöglicht die spezifische Zellcharakterisierung innerhalb einer Population (z.B. Fluoreszenz).

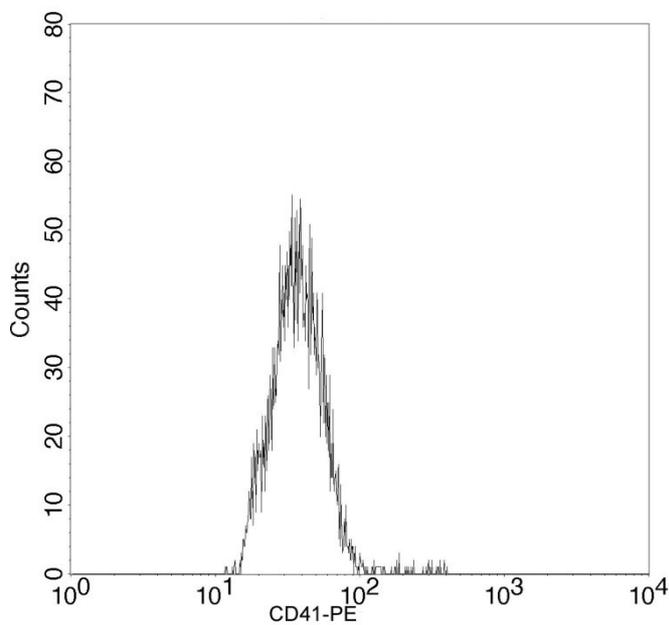


Abbildung 6: Darstellung einer Zellpopulation mithilfe eines Histogrammes. Thrombozyten wurde mit Anti-CD41-PE markiert und gemessen.

Tabelle 4: Häufig verwendete Fluorochrome bei der durchflusszytometrischen Erfassung von Thrombozyten

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	488	530 (grün)
Phykoerythrine (PE)	492	580 (rot)
Phycoerythrine-Texas (PE:TR)	510	620 (rot)
Peridinine-chlorophyll protein (PerCP)	488	530 (grün)

Der Mittelwert einer so gemessenen Fluoreszenz ermöglicht nun eine quantitative Aussage über die jeweilige Antikörperbindungstendenz und somit auch über die Expression von bestimmten, dem Aktivierungsgrad entsprechenden Oberflächenantigenen auf Thrombozyten.

Thrombozyten ergeben eine für sie charakteristische Punktwolke in der Vorwärts- und Seitwärtslichtbrechung. Wird mit Vollblut gearbeitet, also einem Medium mit verschiedenen Zellpopulationen, empfiehlt sich die Färbung der Thrombozyten mit thrombozytenspezifischen Fluorochrom konjugierten Antikörpern (z.B. Anti-CD41-PE). Das Durchflusszytometer lässt sich mit Hilfe von so genannten „Gates“ derart konfigurieren, dass nur bestimmte Zellpopulationen (die über die Fluoreszenz, die Lichtbrechung oder beides identifiziert wurden) in den Messbereich mit einfließen.

Alle Messungen wurden auf dem Gerät FACSCalibur[®] der Firma Becton & Dickinson, (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software CellQuest[®] (B&D, Heidelberg, Deutschland) die auf dem am FACSCalibur angeschlossenen Computer installiert war.

3.3.4.1 Untersuchung der Expression von Fractalkine und von etablierten Adhäsionsmolekülen auf HUVEC und CHO Zellen

3.3.4.1.1 Probenpräparation

Um die Expression von Fractalkine auf HUVEC zu evaluieren, wurden HUVEC kultiviert, und in unstimulierten Zustand belassen, bzw. für 20 h mit TNF- α und INF- γ kostimuliert, wie bereits unter Kapitel 3.3 beschrieben. Die Expression von Fraktalkine wurde mittels FACS und Western blot Technik evaluiert (siehe 3.3.3. und 3.3.4). Daneben wurden auch Fractalkine-transfizierte und Mock-transfizierte (also mit einem Kontrollvektor-transfizierte) CHO Zellen auf die Expression von Fractalkine nach demselben Protokoll wie HUVEC untersucht. Für die FACS-Analyse wurden HUVEC/CHO-Zellen mit einem Fractalkine-Antikörper (Anti-Human CX₃CL1) in einer Konzentration von 10 μ g/ml und einem sekundären FITC- markierten Antikörper in einer Konzentration von 10 μ g/ml für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden sie gewaschen, von der Mikrotiterplatte mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit Paraformaldehyd (0,5 %) fixiert. Die Analyse der Fractalkineexpression mittels FACS ist unter 3.3.4.1.2 im Detail dargestellt. Die Western Blot Analyse erfolgte wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben.

Um die Expression von Adhäsionsmolekülen zu untersuchen, wurden HUVEC kultiviert und mit Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α stimuliert, wie unter 3.3 beschrieben. Anschließend wurden sie mit monoklonalen, Fluorochrom markierten Antikörpern gegen CD106, CD62E, CD54, CD62P, CD11b oder eine Maus IgG1 Isotypenkontrolle (s. Materialien) für 10 Minuten inkubiert. Hierauf wurden sie gewaschen, von der Mikrotiterplatte mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit Paraformaldehyd (0,5 %) fixiert und durchflusszytometrisch analysiert (s.u.).

3.3.4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Es wurden mit dem Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) 20.000 Ereignisse analysiert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 100 gezählte Ereignisse pro Sekunde. Die HUVEC und CHO Zellen wurden über ihre charakteristische Population in Größe und Granularität (Forward- und Side-Scatter)

identifiziert und in den Messbereich aufgenommen. Die mittlere Fluoreszenz wurde als Index für die Antigenoberflächenexpression herangezogen.

3.3.4.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem im angeschlossenen Computer installierten Programm: Cell Quest[®] (B&D, Heidelberg, Deutschland). Die gemessene Fluoreszenz wurde anhand von Histogrammen sichtbar gemacht und der Mittelwert vom Programm ermittelt.

3.3.4.2 Untersuchung der Thrombozytenaktivierung durch lösliches und membrangebundenes Fractalkine

Um die Auswirkung von löslichem Fractalkine auf Thrombozyten zu untersuchen, wurde die Messung der Degranulation herangezogen. Die Degranulation von α -Granula ist ein sensibler Indikator für den Thrombozytenfunktionsstatus. Aus den α -Granula wird bei Aktivierung das Glykoprotein P-Selektin freigesetzt und an die Oberfläche des Thrombozyten mobilisiert (s. Einleitung). Diese morphologische Veränderung kann mithilfe von Anti-CD62P sichtbar gemacht werden.

3.3.4.2.1 Probenpräparation

Die gewaschenen Plättchen wurden mit PBS, ADP, Fractalkine (rhCX₃C) sowie ADP und Fractalkine (s. Materialien) für 10 Minuten inkubiert. Um die Rolle von Fractalkine in der Stimulation der Plättchen zu evaluieren, wurden sie mit Fractalkine oder Fractalkine plus ADP (Konz. Angeben) in Abwesenheit oder Gegenwart eines blockierenden Anti-Fractalkine Antikörper (Anti-rhCX₃C) inkubiert. Gefärbt wurde mit einem FITC-markierten Anti-CD62P Antikörper (s. Materialien). Nach Inkubation wurde mit PFA (0,5 %) fixiert, d.h. der Inkubationsprozess gestoppt und die Zellen konserviert.

In einem weiteren Ansatz sollte die Auswirkung von immobilisiertem Fractalkine auf die Thrombozytenaktivierung untersucht werden. Well-Platten wurden mit Fibrinogen (5 μ g/ml), Laminin (5 μ g/ml) sowie Fractalkine (1 oder 5 μ g/ml) ausgelegt und mit 2 % BSA über Nacht blockiert. Die gewaschenen Plättchen wurden präpariert wie unter 3.2.6 bereits beschrieben (finale Konzentration von 2 x 10⁸/ml). Die gewaschenen Thrombozyten wurden in die Vertiefungen der Well-Platte hinzugegeben und

anschließend für 60 Minuten unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurden die Thrombozyten durch schonendes Waschen entfernt und mit Anti-CD62P-FITC für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit PFA 0,5 % fixiert und möglichst ohne Zeitverlust im FACSCalibur® analysiert.

In einem zusätzlichen Ansatz wurden gewaschene Thrombozyten präpariert, wie bereits unter 3.2.6 beschrieben. Anschließend wurden sie mittels einer Flusskammer über Fractalkine-transfizierte CHO Zellen und CHO-Mock Zellen bei Scherraten von 1000/s perfundiert, wie unten unter 3.6 beschrieben. Die perfundierten CHO-Zellen wurden anschließend mittels HEPES Tyrodes Puffer (s. Materialien) für weitere 5 Minuten perfundiert und zwar unter der gleichen Scherrate. Auf CHO-Zellen adhärente Thrombozyten wurden direkt in der Flusskammer mit Anti-Human CD62P-FITC und Anti-Human CD41-PE (s. Materialien) gefärbt. Nach der Färbung wurden die Thrombozyten gewaschen, mittels Trypsin/EDTA von der Mikrotiterplatte abgelöst und mittels PFA (0,5 %) fixiert. Die Thrombozyten wurden über die Immunfluoreszenz von CD41-PE „gated“ und die CD62P-FITC Expression von 100 adhärenen Thrombozyten wurde quantifiziert.

3.3.4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse wurde wie unter 3.3.4.1.2 beschrieben durchgeführt.

3.3.4.2.3 Auswertung

Die Auswertung wurde wie unter 3.3.4.1.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.4.3 Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten mit Leukozyten

Thrombozyten und Leukozyten können heterotypische Aggregate formen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Alle Leukozyten-Subpopulationen können mit Plättchen Aggregate bilden, allerdings mit unterschiedlicher Affinität: Von Monozyten ist die höchste Tendenz bekannt, von Lymphozyten die geringste (s. Einleitung). Eine Bindung von Leukozyten an Plättchen vermittelt ein Rollen der Leukozyten am

Gefäßwandendothel („Rolling“), Adhäsion und Transmigration durch die Gefäßwand und somit eine verstärkte Akkumulation von Leukozyten in inflammatorischen Prozessen. Da sich Thrombozyten und Leukozyten wechselseitig sowohl inhibierend als auch aktivierend beeinflussen können, gilt eine verstärkte Co-Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten (PLA) als sensitiver Marker für eine Thrombozyten- bzw. eine Leukozytenaktivierung (s. Einleitung). Die Untersuchung der PLA in Gegenwart oder Abwesenheit von Fractalkine erfolgte in der Durchflusszytometrie mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD11b-FITC (s. Materialien) zur Detektion von Leukozyten. Die Identifizierung von gebundenen Thrombozyten wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen CD41-PE (s. Materialien) gewährleistet.

3.3.4.3.1 Probenpräparation und Stimulation

Zur Analyse der Effekte von Fractalkine auf die PLA wurde Probanden Zitratblut wie unter Materialien bereits beschrieben abgenommen. Das Blut wurde unstimuliert, mit 1µg/ml konzentriertem Fractalkine, sowie mit Fractalkine und ggf. einem Anti-Fractalkine Antikörper für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Fluorochrom markierten Antikörper hinzupipettiert und für weitere 15 Minuten inkubiert. Danach wurde für 10 Minuten ein Lysierungsreagens zur Lyse der Erythrozyten hinzupipettiert. Nach der Lyse wurde jede Probe mit 3 ml PBS aufgefüllt und anschließend 5 Minuten bei 603 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das durch die Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 500µl PFA resuspendiert. Anschließend wurden die Proben innerhalb von 12 Stunden analysiert. Es wurden insgesamt n = 9 Proben gemessen.

In einem weiteren Ansatz wurde n=6 Proben wie oben stimuliert, jedoch mit einem selektiven, antagonistischen Antikörper gegen P-Selektin (Anti-CD62P) inkubiert. Als Thrombozytenmarker diente in dieser Versuchsreihe ein FITC markierter Antikörper gegen CD61.

3.3.4.3.2 Durchflusszytometrische Analyse

Um die Aggregate im Vollblut darstellen zu können, wurde ein Messbereich („Gate“) über die durch anti-CD11b-FITC-Fluoreszenz identifizierten Leukozyten gelegt. In

diesem Messbereich wurden auch nach gebundenen Thrombozyten (FITC-positive, PE positive Zellen) gesucht und die gemessene Fluoreszenz über ein Histogramm dargestellt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 25 gezählte Events pro Sekunde. Es wurde nach 10.000 im Messbereich gezählten Zellen automatisch mit der Messung gestoppt. Da es sich um eine Messung mit Doppelfärbung handelte, musste die detektierte Fluoreszenz kompensiert werden.

3.3.4.3.3 Auswertung

Die Auswertung wurde wie unter 3.3.4.1.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.5 Flusskammer

3.3.5.1 Untersuchung der Leukozytenadhäsion an humanen Endothelzellen

Blut ist keine newtonsche Flüssigkeit im eigentlichen Sinne (η nur abhängig von der Temperatur), sondern eine inhomogene Suspension von Zellen in Plasma, d.h. seine Viskosität ist abhängig von seiner Schubspannung (also mittelbar von seiner Strömungsgeschwindigkeit) und vom Arterienradius (Fahreus-Lindqvist-Effekt). Je höher die Schubspannung respektive die Strömungsgeschwindigkeit und je kleiner der Gefäßradius, umso geringer ist die Viskosität des Blutes.

Es wird deswegen von der so genannten scheinbaren oder apparenten Viskosität des Blutes ($\eta_{app.}$) ausgegangen. Diese beträgt für hohe arterielle Schubspannungen und arterielle Gefäßradien von ca. 4 mm sowie einem normalen Hämatokrit von 0,37 bis 0,54 $\eta_{app.} = 3,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$.

Die in den Versuchen vorhandene Schubspannung betrug $\tau = 244 \text{ Pa}$, die Scherrate $1000/\text{s}$, dies entspricht arteriellen Flussparametern.

3.3.5.1.1 Versuchsdurchführung und Auswertung

Alle Flusskammerversuche wurden mit einer Parallelplatten-Flusskammer durchgeführt. Die Maße der verwendeten Flusskammer FCS^{1C} (Oligene, Berlin, Deutschland) betragen:

Kanallänge: 15 mm

Kanalbreite: 2 mm

Kanalhöhe: 300 μm

Die Flusskammer war an einen Perfusor fm (Braun, Melsungen, Deutschland) angeschlossen. Es wurde ohne Pulsation perfundiert.

Die Bilder wurden mit einer Kamera Axiocam (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) auf dem Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 100 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit 20-facher Vergrößerung gemacht und auf dem angeschlossenen Computer mit dem installierten Programm AxioVision 3.0.6.1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) in Echtzeit bearbeitet und gespeichert.

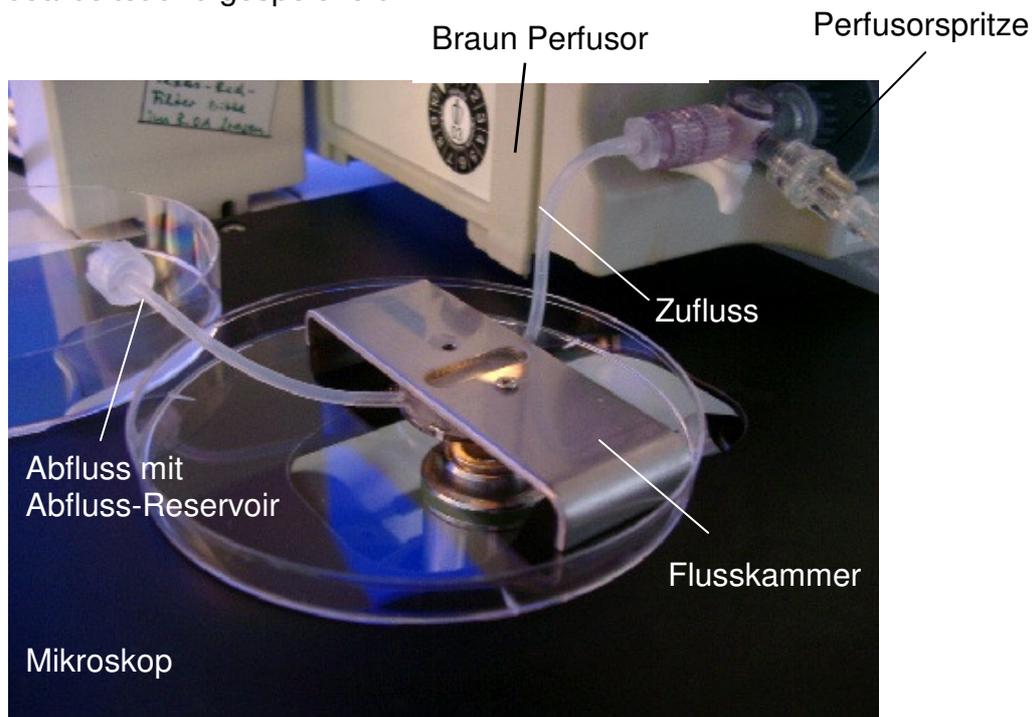


Abbildung 7: Die Flusskammer ist auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop installiert (s. Beschriftungen)

Glasmikrotiterplatten wurden mit HUVEC, die für 20 Stunden mit TNF- α und INF- γ stimuliert wurden oder mit Fractalkine- oder Mock-transfizierten Zellen kultiviert. Es wurde auf konfluentes Wachstum geachtet. Vollblut wurde von gesunden Probanden entnommen, die bis zu 10 Tage vor dem Experiment keine Medikamente eingenommen hatten. Als Antikoagulation wurde 0,5 vol% Heparin verwendet. Um die Analyse und die Quantifizierung der Adhäsion von Leukozyten unter arteriellen Flussbedingungen durchzuführen, wurden Leukozyten und Thrombozyten mit Rhodamin-6G in einer finalen Konzentration von 0,2 g/L gefärbt. Die Dauer der Färbung betrug 15 Minuten, bei 37 °C. Leukozyten können von Thrombozyten leicht

morphologisch unterschieden werden, da sie deutlich größer sind. Erythrozyten werden durch Rhodamin-6G nicht gefärbt.

Vor der Perfusion wurden HUVEC mit PBS mit einem blockenden Antikörper (Anti-Human CX₃CL1) oder einem nicht bindenden IgG-Kontrollantikörper (Anti-Human) für 30 Minuten inkubiert. Demgegenüber wurden Antikörper gegen den Fractalkine-Rezeptor (CX₃CR1), P-Selektin oder mit einem IgG1 Isotypenkontrollantikörper 30 Minuten bei 37 °C mit Vollblut inkubiert. Antikörper gegen Fractalkine und den Fractalkine-Rezeptor wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 µg/ml) alleine oder in Kombination inkubiert (Fractalkine mit HUVEC / PBS und Fractalkine-Rezeptor mit Vollblut). Die Perfusion wurde mit einer Scherrate von 1000/s für 10 Minuten durchgeführt, was Flussbedingungen von mittelgroßen Arterien unter physiologischen Bedingungen entspricht (Kroll MH 1996). Anschließend wurde für 5 Minuten bei 1000/s mit HEPES-Tyrodes Puffer perfundiert. Die Auswertung erfolgte direkt nach der Perfusion hierbei wurden 10 Bilder mit der Digitalkamera von unterschiedlichen, aber repräsentativen Bereichen gemacht. Die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten wurde am Bildschirm mithilfe eines Handstückzählers erfasst. Hierbei wurde manuell mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Microsoft Paint Version 5.1) das Bild in 9 gleich große Rechtecke eingeteilt und daraufhin jedes Rechteck einzeln ausgezählt. Anschließend wurden die Ergebnisse der 9 Quadrate addiert. Von den 10 Bildern wurde danach ein Mittelwert gebildet, dieser Mittelwert wurde später bei der statistischen Auswertung (s. u.) herangezogen.

Die Anzahl der adhärenen Leukozyten wurde in Prozent von der Anzahl der unter stimulierten HUVEC ohne Antikörper adhärenen Leukozyten angegeben. Die Perfusionen wurden durchgeführt bis zur Gesamtzahl von n = 6 pro Ansatz.

3.3.5.2 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion an humanen Endothelzellen und CHO Zellen

3.3.5.2.1 Versuchsdurchführung und Auswertung

Um die Adhäsionsmoleküle der Thrombozytenadhäsion an aktiviertes Endothel zu untersuchen und um die Rolle von Thrombozyten für die Adhäsion von Leukozyten zu eruieren, wurden gewaschene Thrombozyten oder heparinisiertes Vollblut mit Rhodamin-6G gefärbt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 1000/s nach in 3.7.1

beschriebener Art perfundiert. Als Endothelzellen wurden mit TNF- α und INF- γ stimulierte HUVEC verwendet. Mit den HUVEC wurden monoklonale Antikörper gegen GPIIb/IIIa (c7E3) (Schäfer A; Schulz C 2004) in einer Konzentration von 4 μ g/ml und gegen GPIb α (Massberg S 2002) in einer Konzentration von 10 μ g/ml inkubiert. Die Auswertung erfolgte, wie bereits in 3.7.1 beschrieben.

Um die Rolle von membrangebundenem Fractalkine und P-Selektin für die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten zu untersuchen, wurden heparinisiertes Vollblut und gewaschene Thrombozyten mit DCF gefärbt (Massberg S 2002) und bei 1000/s für 10 Minuten über Fractalkine- und Mock-transfizierte Zellen perfundiert. Ein Antikörper gegen P-Selektin in einer Konzentration von 10 μ g/ml und ein Kontroll-Antikörper Maus IgG1 wurden ebenfalls inkubiert. Die Leukozyten wurden mittels eines monoklonalen Anti-CD45-FITC konjugiertem Antikörper in einer Konzentration von 20 μ g/ml identifiziert. Die Auswertung erfolgte, wie unter 3.7.1 beschrieben.

Es wurden mit jeder Gruppe n = 6 Experimente durchgeführt.

3.3.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS[®] für Windows[®] Version 9.0. Die Analyse wurde mit dem One Way Anova Test mit einem Tukey Post-hoc Test durchgeführt. Als signifikant wurden p Werte kleiner als 0,05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von Fractalkine auf humanen Endothelzellen (HUVEC)

Um die Expression von membranständigem Fractalkine zu induzieren, wurden HUVEC auf vier verschiedene Arten behandelt: Ohne Stimulation, Stimulation mit INF- γ (20 ng/ml) oder TNF- α (50 ng/ml) oder Kostimulation mit beiden Cytokinen für jeweils 20 Stunden. Die Expression von Fractalkine wurde mittels Immunoblotting und Durchflusszytometrie erfasst. Während auf unstimulierten HUVEC keine Fractalkine-Expression nachweisbar war, sorgte die Stimulation mit einem der beiden Cytokine für einen leichten Anstieg der Expression von Fractalkine. Nur die Kostimulation mit beiden Cytokinen resultierte in einer signifikanten Oberflächenexpression von Fractalkine ($p < 0,001$) (s. Abbildung 8).

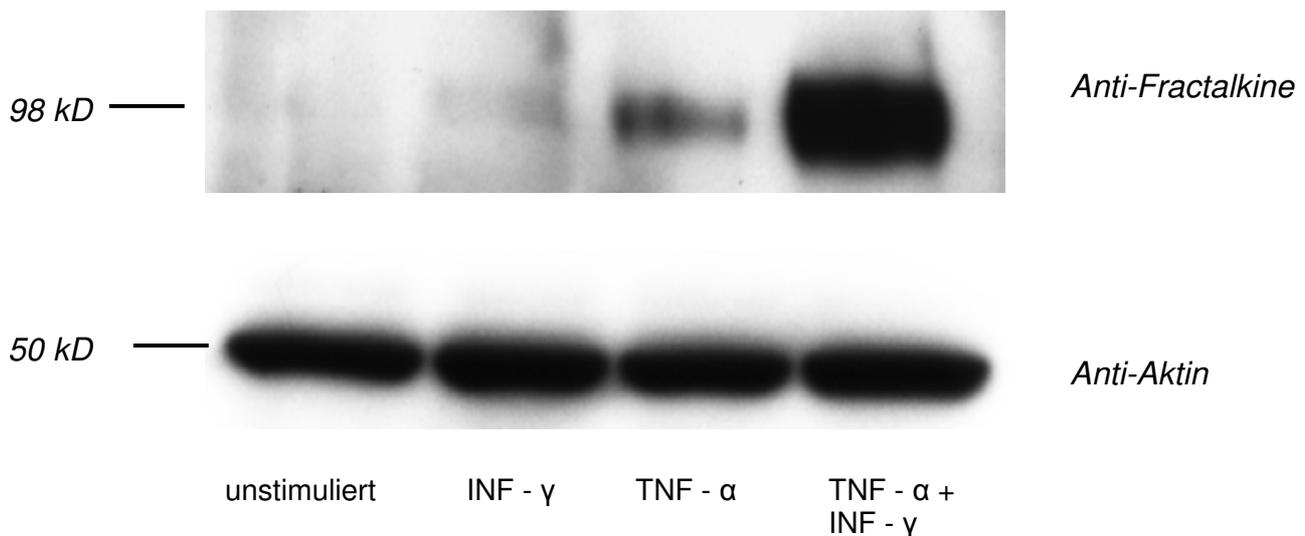


Abbildung 8: Repräsentative Anti-Fractalkine Immunoblotting Experimente der Fractalkine Proteinexpression. Die Equilibrierung der Proteinmenge erfolgte über das Aktin-Signal.

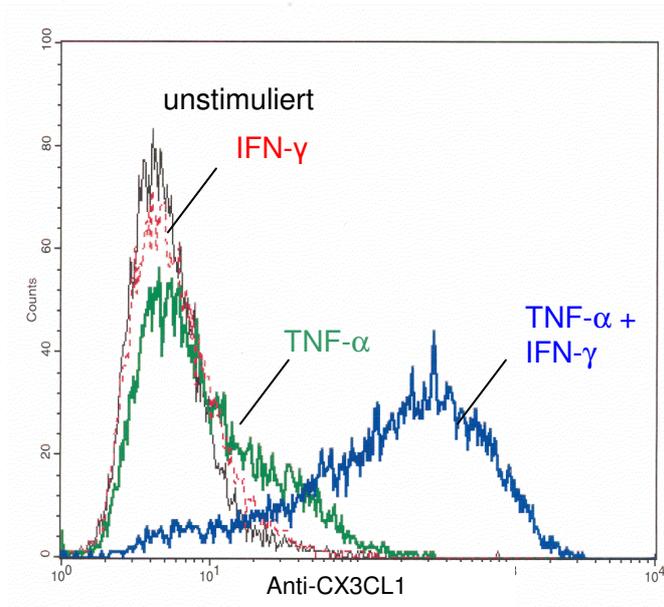


Abbildung 9: Repräsentative FACS-Histogramme von unstimulierten und TNF- α und INF- γ stimulierten HUVEC. Dargestellt ist die Fractalkine Oberflächen-Expression.

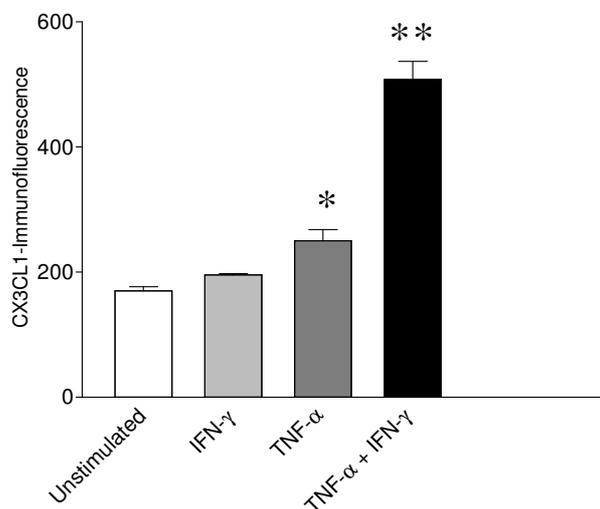
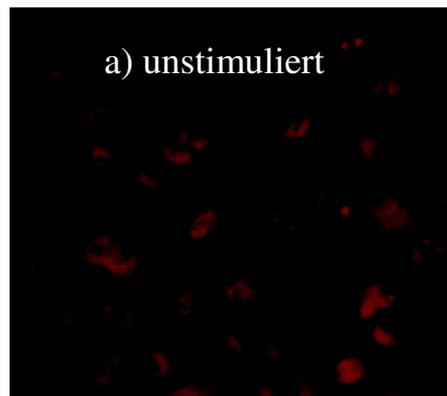


Abbildung 10: Fractalkine-Expression auf konfluenten HUVEC (unstimuliert oder stimuliert mit 50 ng/ml TNF- α oder 20 ng/ml INF- γ alleine oder in Kombination für 20 Minuten). Die Oberflächenexpression von Fractalkine (CX₃CL1) wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt (n=3; *p < 0,05; **p<0,001 vs. unstimuliert)

Für alle weiteren Experimente wurden HUVEC für 20 Stunden mit TNF- α und INF- γ stimuliert.

4.2 Einfluss von Fractalkine auf die Adhäsion von Leukozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) im Modell der Flusskammer

Es ist bekannt, dass Leukozyten unter Flussbedingungen mit niedrigen Scherraten an immobilisiertem, rekombinanten Fractalkine adhären werden. Es ist bekannt, dass Fractalkine auf atherosklerotisch veränderten arteriellen Gefäßwänden vermehrt exprimiert wird. Es ging daher in der vorliegenden Arbeit darum, zu untersuchen, ob Fractalkine auch unter arteriellen Flussbedingungen zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten befähigt ist. Wir führten Flusskammeruntersuchungen durch, wobei wir HUVEC entweder unstimuliert oder stimuliert mit TNF- α und INF- γ für 20 Stunden (s.o.) mit Vollblut superfundierten. Es wurde dabei Rhodamin 6-G gefärbtes Vollblut verwendet, um adhären Leukozyten fluoreszenzmikroskopisch detektieren zu können. Nach 10minütiger Perfusion unter arteriellen Flussbedingungen (1000/sek.) wurde eine deutliche Zunahme der Zahl fest adhären Leukozyten auf stimulierten HUVEC festgestellt, verglichen mit unstimulierten HUVEC (s. Abbildung 11).



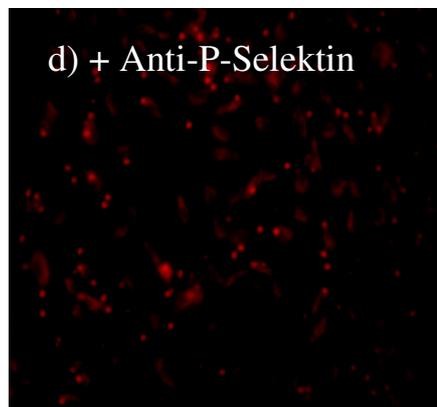
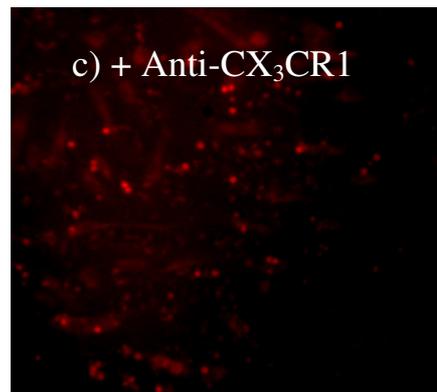
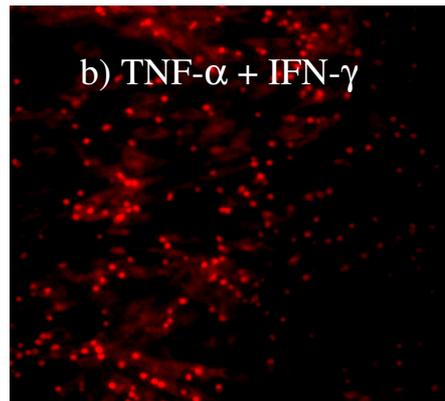


Abbildung 11: Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder (a bis d) zeigen repräsentative Aufnahmen der Leukozytenadhäsion auf unbehandelten oder mit 50 ng/ml TNF- α und 20 ng/ml IFN- γ stimulierten HUVECs. Wo angegeben (c und d) wurden die stimulierten Zellen vor Perfusion mit blockierenden Antikörpern gegen den Fractalkine-Rezeptor bzw. gegen P-Selektin inkubiert.

Um das Ausmaß der Beteiligung von Fractalkine am Adhäsionsprozess von Leukozyten zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt ein blockierender Anti-Fractalkine Antikörper (Anti-CX₃CL1) verwendet. Dieser wurde 10 Minuten mit den

aktivierten HUVEC vorinkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde alternativ ein Antikörper gegen den Fractalkine-Rezeptor (Anti-CX₃CR1) 30 Minuten mit der jeweiligen Vollblutprobe vorinkubiert. Sowohl Anti-CX₃CL1, als auch Anti-CX₃CR1 reduzierten die Adhäsion der Leukozyten signifikant um jeweils ca. 40 Prozent ($p < 0,01$). Bei dem Versuch einer kombinierten Blockade mit beiden Antikörpern wurde kein additiver reduzierender Effekt erreicht. Interessanterweise reduzierte auch ein gegen P-Selektin gerichteter Antikörper die Leukozyten Adhäsion signifikant um einen vergleichbaren Prozentsatz (s. Abbildung 12).

Es wurde jedoch keine signifikante Reduktion der Adhäsion über Anti-E-Selektin oder die verwendeten Kontrollantikörper (IgG1 Isotype und IgG) erreicht (s. Abbildung 12).

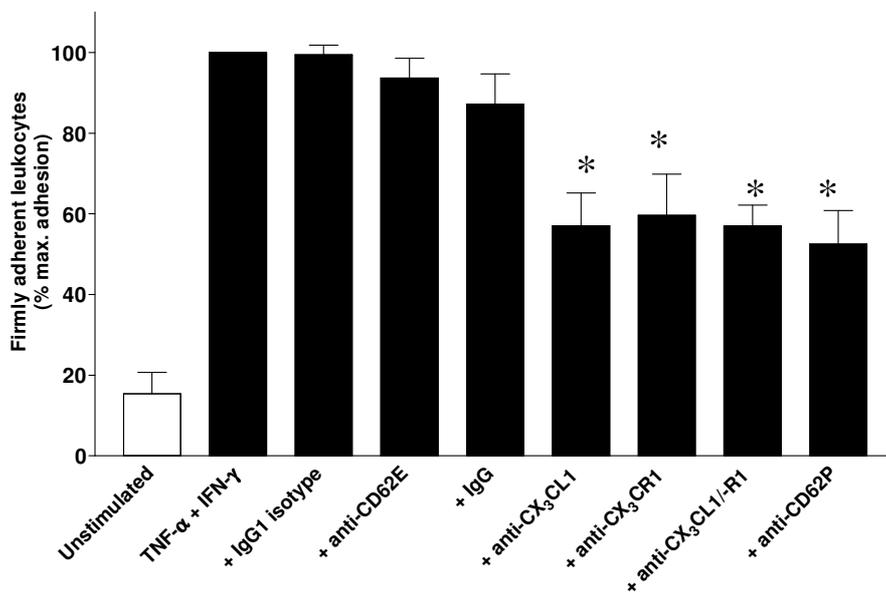


Abbildung 12: Adhäsion von Leukozyten auf HUVEC (in % der maximalen Adhäsion unter Stimulation mit TNF- α und INF- γ) *P < 0.01 verglichen mit TNF- α und INF- γ stimulierten Zellen, Anzahl der Versuche mit n=4 für Anti-CD62P, Anti-CD62E und Kontrollantikörper. Alle anderen Ansätze mit n=9 Versuchen.

4.3 Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC)

Um die Expression der Adhäsionsmoleküle zu überprüfen, führten wir durchflusszytometrische Untersuchungen durch. Es wurden Adhäsionsrezeptoren untersucht, für die eine Rolle bei Leukozyten-Endothel-Interaktionen bekannt ist (ICAM-1 und VCAM-1, P-Selektin und E-Selektin). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation mit TNF- α und INF- γ in einer signifikanten Steigerung der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 sowie E-Selektin resultierte ($p < 0,05$). Dagegen wurde P-Selektin und CD11b (Kontrollantikörper) nicht exprimiert.

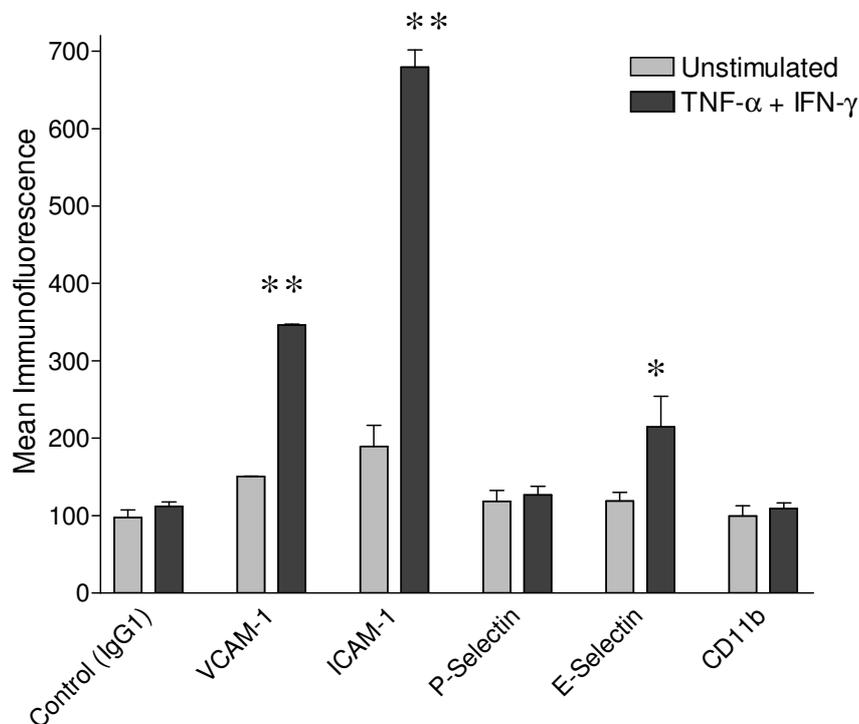


Abbildung 13: Zellrasen von HUVEC wurden mit Medium (unstimuliert) oder mit 50 ng/ml TNF- α und 20 ng/ml INF- γ inkubiert. Daraufhin wurde die Oberflächenexpression von VCAM-1, ICAM-1, P-Selektin, E-Selektin, auf den Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Antikörper gegen IgG1 und CD11b waren die Kontrollantikörper (n=3; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ verglichen mit unstimulierten HUVEC).

4.4 Thrombozytenadhäsion auf aktivierten Endothelzellen und die Rolle der adhärenen Thrombozyten für die Leukozytenrekrutierung

Wie oben dargestellt zeigten stimulierte HUVECs keine vermehrte P-Selektin-Oberflächenexpression im Vergleich zu unstimulierten HUVEC (Abb. 13), dennoch führte in Flusskammerexperimenten zu einer reduzierten Leukozytenadhäsion an inflammatorisch verändertes Endothel (Abb. 11-12). Eine weitere potentielle Quelle von P-Selektin in dem von uns gewählten sind neben den HUVEC die im Vollblut enthaltenen Thrombozyten. Daher untersuchten wir im nächsten Schritt die Rolle von Thrombozyten für die Fractalkine-abhängige Leukozytenrekrutierung an inflammatorisches Endothel unter arteriellen Flussbedingungen.

Plättchen adhären unter arteriellen Flussbedingungen an entzündlich veränderten Endothelzellen. Dieser Prozess wird vermittelt durch Integrine und GPIIb/IIIa, wie in vitro und in vivo gezeigt werden konnte (Massberg 2005) (Massberg 2002) (Bombeli 1998) (Gawaz 1997). Um dies nachzuvollziehen, superfundierten wir Rhodamin gefärbtes Vollblut über TNF- α und INF- γ stimulierte HUVEC. Nach der Perfusion akkumulierten neben Leukozyten zahlreiche Plättchen auf dem entzündlichen Endothel (Abbildung 14).

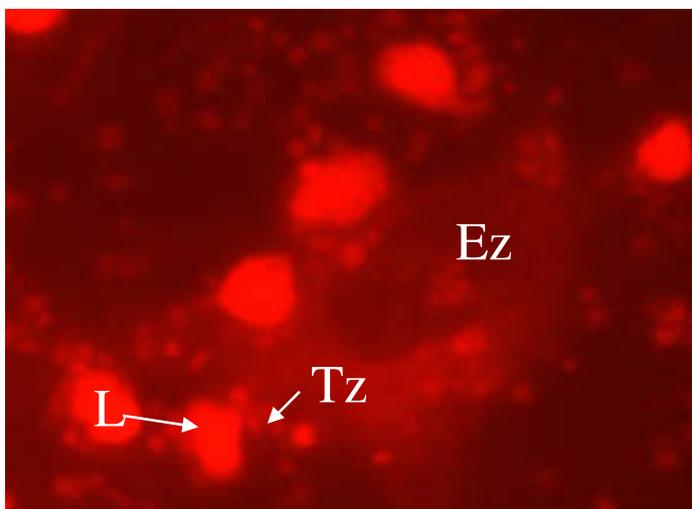


Abbildung 14: Kolokalisation von adhärenen Thrombozyten (Tz) um adhärenen Leukozyten (L) nach Perfusion auf aktivierten HUVEC (Ez). Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme.

Um zu demonstrieren, dass die o.g. Adhäsionsrezeptoren auch in unserem System für die Thrombozytenadhäsion von Bedeutung sind, wurden gewaschene Plättchen über TNF- α und INF- γ stimulierte HUVEC perfundiert. Dies erfolgte in Abwesenheit

oder Gegenwart von monoklonalen Antikörpern c7E3 (anti-GPIIb-IIIa, Fibrinogenrezeptor und anti- $\alpha_V\beta_3$, Vitronektinrezeptor) und Anti-GPIb α (vWF-Rezeptor) perfundiert. Beide Antigene werden auf Thrombozyten, nicht aber auf Leukozyten exprimiert. Beide Antikörper induzierten eine deutliche Reduktion der Adhäsion von Plättchen, wobei c7E3 (der Antikörper gegen den β_3 -Integrin-Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) und $\alpha_V\beta_3$) für eine stärkere Reduktion der Plättchenadhäsion sorgte. Die Koinkubation von beiden Antikörpern reduzierte die Plättchenadhäsion gegenüber der alleinigen Inkubation von c7E3 (Abbildung 15) nur noch leicht.

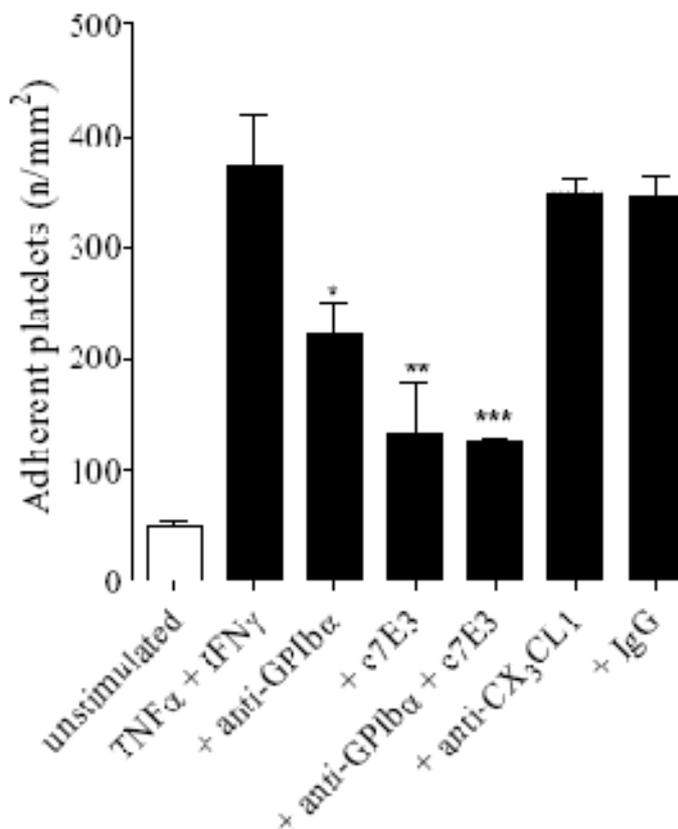


Abbildung 15: Unbehandelte oder TNF- α /IFN- β stimulierte HUVEC wurden mit gewaschenen Thrombozyten für 10 Minuten mit einer Scherrate von 1000/s perfundiert. Zusätzlich wurden die monoklonalen Antikörper c7E3 (4 μ g/ml) und/oder Anti-GPIb α (10 μ g/ml) inkubiert. Um zusätzlich die Rolle von membrangebundenem Fractalkine für die Thrombozytenadhäsion zu untersuchen, wurde ein Antikörper gegen CX₃CL1 und IgG als

Kontrollantikörper inkubiert. Die Resultate sind in adhärenenten Thrombozyten pro mm² aufgetragen (n=4, *p<0,05 für die Behandlung mit Anti-GPIIb α , **p<0,01 für die Behandlung mit c7E3,*p<0,001 für die Behandlung mit beiden Antikörpern gegen alleinige Stimulation mit TNF- α und INF- γ in Abwesenheit von Antikörper).**

Für die Adhäsion von Plättchen an Endothel spielen also beide Rezeptoren eine Rolle. Demgegenüber ist das Fractalkine-Fractalkinerezeptorsystem für die Thrombozytenadhäsion (anders als für die Leukozytenadhäsion) von untergeordneter Bedeutung. Sobald Plättchen an das Endothel adhären mobilisieren sie P-Selektin über Degranulation der α -Granula an ihre Oberfläche. Basierend auf der Beobachtung, dass (1) anti-P-Selektin die Leukozytenadhäsion blockiert und (2) dass endotheliales P-Selektin hieran nicht beteiligt ist, postulierten wir, dass P-Selektin, welches von Plättchen oberflächenexprimiert wird, eine wesentliche Rolle für die Fractalkine-abhängige Leukozytenrekrutierung unter arteriellen Flussbedingungen spielen könnte. Diese Vermutung geht mit der früheren Beobachtung konform, dass Leukozytenadhäsion an inflammatorische HUVEC vor allem dort stattfand, wo bereits eine Plättchenakkumulation bestand (Abbildung 14). (Massberg 2002) (Zwaginga 1999) (Burger 2003)

Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurde Vollblut für 10 Minuten über inflammatorisch veränderte HUVEC perfundiert, in An- und Abwesenheit der monoklonalen Antikörper c7E3 und Anti-GPIIb α . Interessanterweise zeigte sich eine Reduktion der Leukozytenadhäsion durch Inhibition der Plättchenadhäsion auf Endothelzellen (Abbildung 16). Auch hier war die Reduktion unter c7E3 stärker ausgeprägt als unter Anti-GPIIb α , allerdings unter insgesamt geringerer prozentualer Hemmung, als die der Thrombozytenadhäsion. Die Hemmung der Thrombozytenadhäsion geht also mit einer signifikanten Reduktion der Leukozytenadhäsion einher.

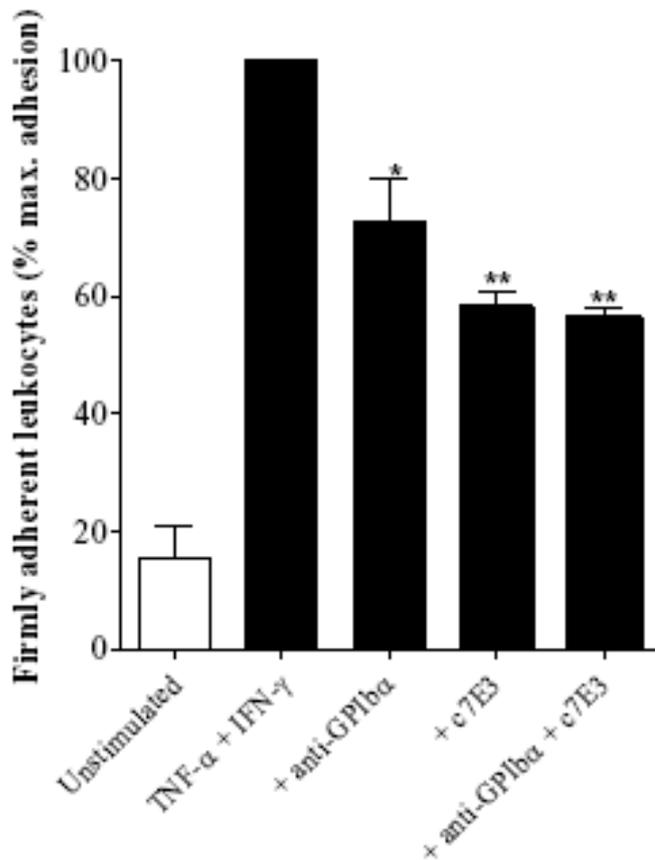


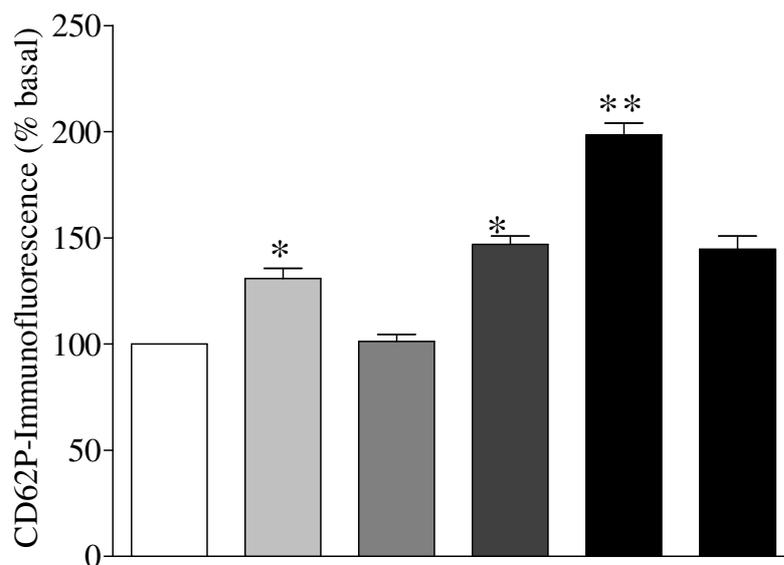
Abbildung 16: TNF- α und INF- γ stimulierte HUVEC wurden mit Rhodamin gefärbtem Vollblut für 10 Minuten bei einer Scherrate von 1000/s in An- und Abwesenheit der monoklonalen Antikörper c7E3 (4 μ g/ml) und Anti-GPIIb α (10 μ g/ml) perfundiert sowie in Kombination mit beiden Antikörpern (n=3, *p<0,05 für die Behandlung mit Anti-GPIIb α und **p<0,01 für die Behandlung mit c7E3 sowie die Kombination beider Antikörper, alle gegen die alleinige Stimulation mit TNF- α und INF- γ).

4.5 Einfluss von Fractalkine auf die Thrombozytendegranulation und auf die Oberflächenexpression von P-Selektin

Wie oben gezeigt ist damit die Leukozytenadhäsion an inflammatorisch verändertes Endothel unter arteriellen Flussbedingungen abhängig (1) von der Fractalkine-Expression auf den Endothelzellen selbst und (2) von der Gegenwart adhärenter Plättchen. Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass neben Leukozyten auch

Thrombozyten CX₃CR1, den Rezeptor für Fractalkine, exprimieren. Außerdem resultierte aus einer Ligandenbindung am CX₃CR1 Rezeptor eine Aktivierung der Thrombozyten (Schäfer A, Schulz C 2004).

Wir wollten daher in der vorliegenden Arbeit untersuchen, ob Fractalkine, welches auf entzündlich veränderten Endothelzellen in relevanter Dichte exprimiert wird, zu einer Aktivierung / Degranulation von Thrombozyten mit konsekutiver Oberflächenexpression von P-Selektin führen kann. Um dies zu testen wurde zunächst lösliches Fractalkine mit Thrombozyten inkubiert. Hierbei resultierte aus einer Stimulation mit 1µg/ml Fractalkine eine Expression von P-Selektin in etwa vergleichbar mit 1µmol/l ADP (p<0,001) (Abbildung 17). Die Kostimulation von ADP 1µmol/l ADP und 1µg/ml Fractalkine sorgte für eine weitere Steigerung der P-Selektin Expression (p<0,001).



rhCX ₃ C	-	+	+	-	+	+
anti-CX ₃ CL1	-	-	+	-	-	+
ADP	-	-	-	+	+	+

Abbildung 17: P-Selektin (CD62P) Expression wurde bestimmt auf gewaschenen Thrombozyten nach 15-minütiger Stimulation mit rekombinantem Fractalkine (1µg/ml), in An- und Abwesenheit eines

antagonisierenden Antikörpers Anti-CX₃CL1 und ADP (1µmol/L). Die Resultate sind in Prozent der maximalen CD62P Immunfluoreszenz unter nicht stimulierenden Bedingungen dargestellt (n=6, *p<0,001 gegen unstimulierte Bedingungen, **p<0,001 gegen ADP und ADP + CX₃C + Anti-CX₃C).

Die Expression von membrangebundenem Fractalkine auf entzündlich veränderten Endothelzellen ist bekannt. Der nächste Schritt bestand nun in der Beantwortung Frage, ob nicht nur lösliches, sondern auch membrangebundenes/oberflächengebundenes Fractalkine zu einer gesteigerten P-Selektin Expression auf Thrombozyten führen kann. Thrombozyten wurden für 10 Minuten mit immobilisiertem Fractalkine inkubiert. Daraufhin wurde die Expression von P-Selektin bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass immobilisiertes Fractalkine konzentrationsabhängig zu einer gesteigerten Expression von P-Selektin führt (Abbildung 18).

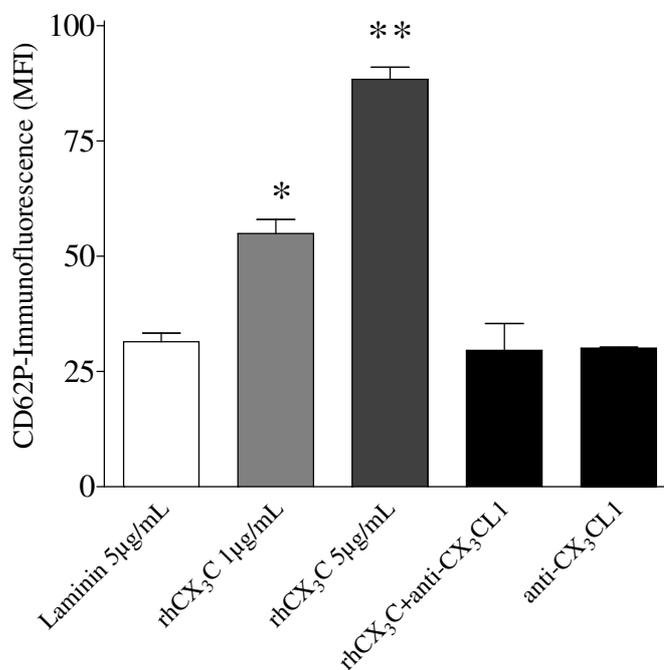


Abbildung 18: CD62P Expression wurde auf gewaschenen Thrombozyten untersucht, und zwar nach Adhäsion an immobilisiertem Laminin (5µg/ml), Fractalkine (rhCX₃C 1µg/ml oder 5µg/ml), Fractalkine (5µg/ml) inkubiert mit

Anti-Fractalkine sowie Anti-Fractalkine alleine für 60 Minuten (n=3 für Anti-Fractalkine, die anderen n=6, *p<0,05, **p<0,01, alle gegen Laminin).

Um die Beobachtung, dass membrangebundenes Fractalkine zu einer erhöhten P-Selektin Expression führt, weiter zu untermauern, wurden stabile Fractalkine CHO Transfektanten hergestellt. Die Oberflächenexpression von Fractalkine auf Fractalkine-Transfektanten, aber nicht auf Mock-Transfektanten, ähnelte sehr der Fractalkine Expression auf entzündlich veränderten Endothelzellen (Abbildung 19).

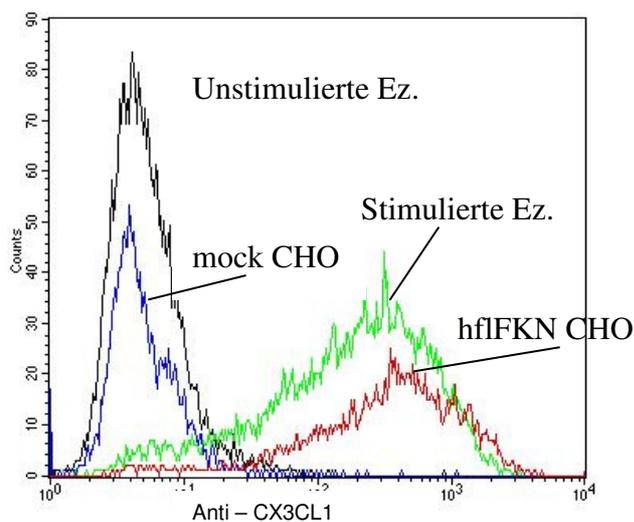


Abbildung 19: Repräsentative Fractalkine (CX₃CL1) Immunhistogramme von unstimulierten oder TNF- α stimulierten HUVEC sowie Fractalkine-Transfektanten und Mock-transfizierten CHO Zellen.

Um die Rolle von membranständigem Fractalkine für die Degranulation von Thrombozyten unter arteriellen Scherraten zu untersuchen, wurden Fractalkine-Transfektanten oder Mock-CHO Zellen auf Coverslips kultiviert. Anschließend wurden sie mit gewaschenen Thrombozyten für 10 Minuten bei 1000/s superfundiert. Daraufhin wurde die P-Selektin Expression der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Adhäsion von Thrombozyten an Fractalkine transfizierte CHO Zellen, nicht aber an Mock-CHO Zellen, resultierte in einem signifikanten Anstieg der P-Selektin Expression (Abbildung 20).

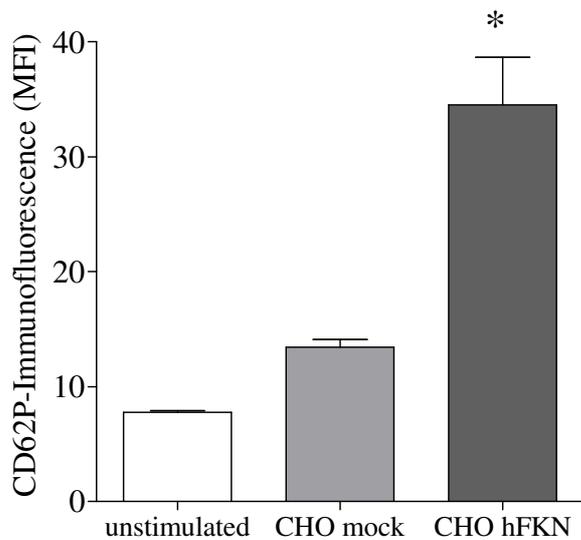


Abbildung 20: CD62P Immunofluoreszenz wurde auf adhärenenten Thrombozyten bestimmt, welche vorher für 10 Minuten bei einer Scherrate von 1000/s über Fractalkine transfizierte oder Mock-transfizierte CHO Zellen perfundiert wurden. Die adhärenenten Thrombozyten wurden direkt mit Anti-CD62P-FITC und CD41-PE Antikörpern gefärbt und anschliessend durchflusszytometrisch analysiert. Die Resultate sind in mittlerer Immunofluoreszenz angegeben (n=3; *p<0,05 gegen Mock-transfizierte CHO Zellen).

Somit kann man insgesamt davon ausgehen, dass membranständiges wie lösliches Fractalkine zu einer Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten führt, welche in der Expression von P-Selektin resultiert. Fractalkine sorgt demnach für eine Aktivierung von adhärenenten Plättchen, nicht aber für eine eigenständige Adhäsion von Plättchen, da in Vorversuchen eine Inhibierung der Adhäsion durch einen Anti-CX₃CR1 Antikörper keinen Effekt hatte (s. Abb. 15).

4.6 Einfluss von Fractalkine auf die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten

Da Fractalkine eine P-Selektin Expression von adhärenenten Thrombozyten induziert, bestand der nächste Schritt darin zu fragen, ob eine Fractalkine-induzierte Degranulation die Adhäsion von Leukozyten triggern kann. Zunächst wurde lösliches Fractalkine mit Vollblut inkubiert. Die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten (PLA) wurde mittels Durchflusszytometrie erfasst. Die Inkubation von löslichem Fractalkine (rhCX₃C) (1µg/ml) mit menschlichem Vollblut für 15 Minuten steigerte die Bildung von PLA signifikant ($p < 0,05$) (Abbildung 21).

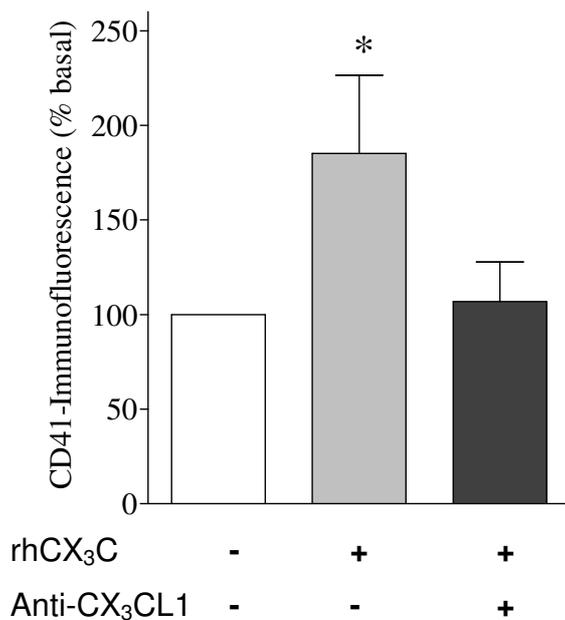


Abbildung 21: Menschliches Vollblut wurde mit rekombinantem Fractalkine (1µg/ml) für 15 Minuten stimuliert. Wo angegeben wurde zusätzlich mit antagonistischem anti-Fractalkine Antikörper (Anti-CX₃CL1) koinkubiert. Darauf folgend wurde die PLA-Formation durch durchflusszytometrische Analyse bestimmt, wobei die mittlere CD41-Immunofluoreszenz in der CD11b+ Leukozytenpopulation bestimmt wurde. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem prozentualen Verhältnis zu unstimulierten Proben (n=6; * $p < 0,05$).

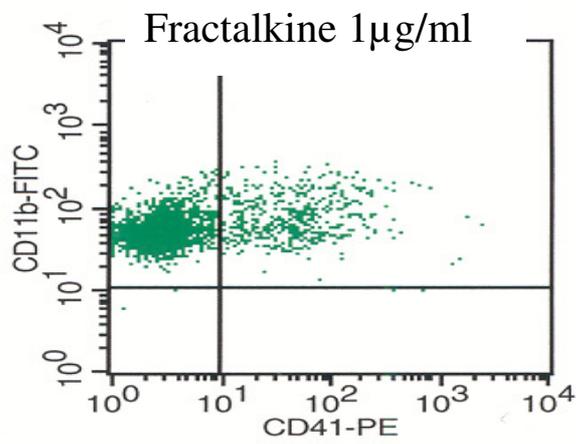
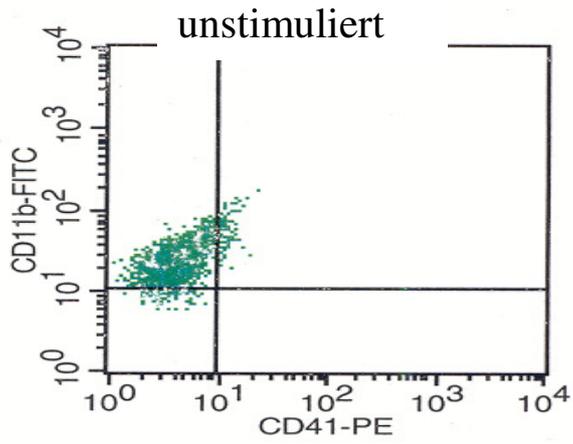


Abbildung 22: Repräsentative Punktwolken von durchflusszytometrischen Messungen der PLA-Formation nach Stimulation mit Fractalkine bei 1µg/ml.

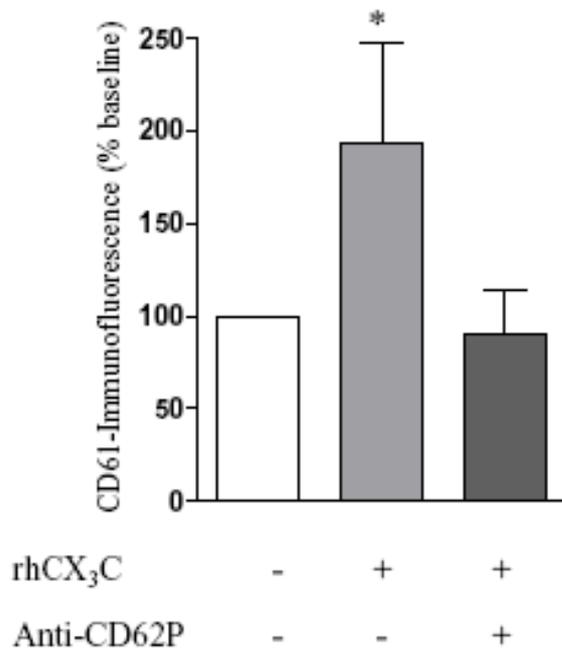


Abbildung 23: Menschliches Vollblut wurde mit rekombinantem Fractalkine für 15 Minuten stimuliert. Es wurde in Gegenwart und Abwesenheit eines selektiven, antagonisierenden Anti-CD62P (Anti-P-Selektin) Antikörpers stimuliert. Daraufhin wurde die PLA-Formation über die mittlere Fluoreszenz von Anti-CD61 durchflusszytometrisch erfasst. Die Resultate werden in Prozent verglichen mit der mittleren Fluoreszenz unter nicht stimulierenden Konditionen angegeben. (n=6 ; *P<0,05)

Die Anwesenheit eines monoklonalen Anti-Fractalkine Antikörpers hob die PLA-Formation auf (Abbildung 21). Dies deutet darauf hin, dass die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten durch Fractalkine reguliert wird und zwar über die Expression von P-Selektin auf Thrombozyten, denn in Anwesenheit eines antagonisierenden, spezifischen Antikörpers gegen CD62P (P-Selektin) wurde die PLA-Formation komplett aufgehoben (Abbildung 23).

4.7 Bedeutung von Fractalkine induzierter P-Selektin-Expression für die Leukozytenadhäsionen unter Flussbedingungen

Schließlich untersuchten wir, ob eine Fractalkine-induzierte P-Selektin-Expression auf Thrombozyten nicht nur die PLA unter statischen Bedingungen induziert (s.o.), sondern außerdem in der Lage ist, die Adhäsion von Leukozyten unter arteriellen Scherraten zu triggern.

CHO Fractalkine (CX₃CL1)-Transfektanten und Mock-CHO wurden hierzu in einer Flusskammer mit Vollblut für 10 Minuten perfundiert. Die Flussrate entsprach 1000/s, wobei in An- und Abwesenheit eines Anti-P-Selektin Antikörpers perfundiert wurde. Adhärenente Leukozyten wurden mittels eines monoklonalen Anti-CD45 Antikörpers identifiziert. Die Leukozytenadhäsion war signifikant höher auf Fractalkine Transfektanten als auf CHO-Mock Zellen (Abbildung 24).

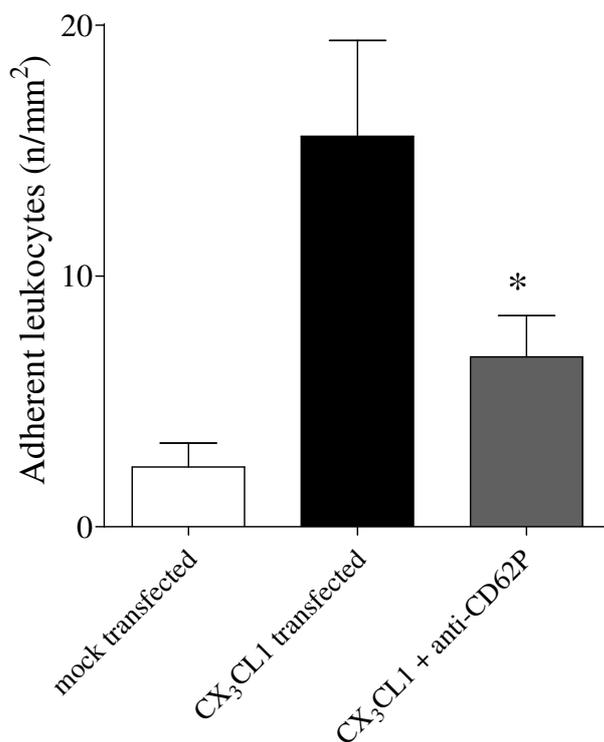


Abbildung 24: Ein konfluenter Zellrasen von Fractalkine-transfizierten CHO Zellen (CX₃CL1) oder Kontrollzellen (Mock-Zellen) wurden in einer Flusskammer mit Vollblut für 10 Minuten bei einer Scherrate von 1000/s perfundiert. Wo angegeben wurde ein monoklonaler, blockierender Antikörper gegen P-Selektin (Anti-CD62P mit 10µg/ml) koinkubiert. Die Leukozyten wurden mittels eines monoklonalen anti-CD45-FITC Antikörpers (Panleukozytenmarker) identifiziert. Die Resultate werden als fest adhärenente Leukozyten n pro mm² aufgetragen (n=8; *p<0,05 gegen Fractalkine transfizierte Zellen).

Die Anwesenheit eines Anti-P-Selektin Antikörpers reduzierte die Zahl der adhärennten Leukozyten substantziell (Abbildung 25). Da CHO Zellen kein P-Selektin exprimieren, muss das P-Selektin von Thrombozyten stammen. Fractalkine vermittelt somit eine von thrombozytärem P-Selektin abhängige Rekrutierung von Leukozyten unter arteriellen Flussbedingungen.

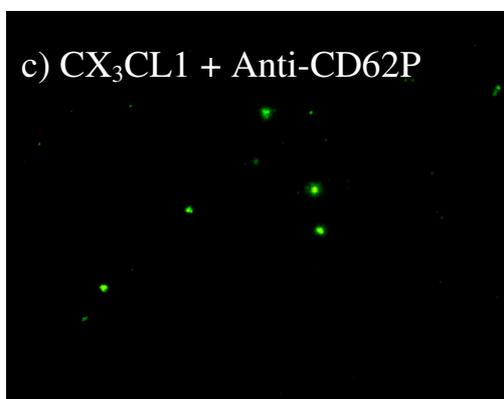
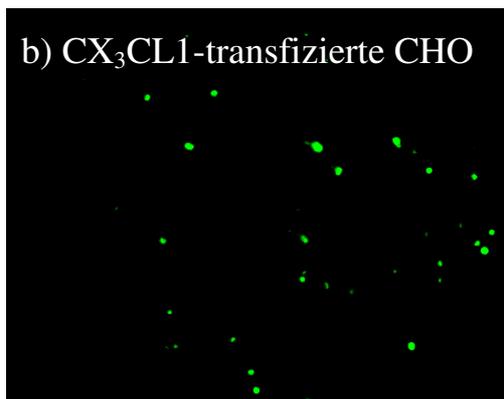
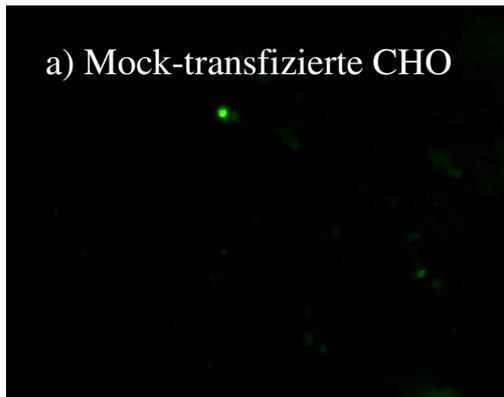


Abbildung 25: Die mikroskopischen Aufnahmen a) bis c) zeigen repräsentative Fluoreszenzbilder der Leukozytenadhäsion auf Mock- oder Fractalkine-

transfizierten CHO Zellen, wobei auf c) zusätzlich ein monoklonaler Anti-P-Selektin (Anti CD62P) Antikörper inkubiert wurde.

Zusammengenommen kann geschlussfolgert werden, dass Plättchen im Vollblut an inflammatorische Endothelzellen rekrutiert werden. Hierbei werden sie lokal hohen Fractalkine Konzentrationen ausgesetzt, was in einer Degranulation von thrombozytärem P-Selektin resultiert. Über thrombozytäres P-Selektin wiederum werden dann zirkulierende Leukozyten an adhärenente Thrombozyten rekrutiert. Dieser Prozess ermöglicht die Rekrutierung von Leukozyten unter arteriellen Scherraten, was für die chronisch inflammatorische Reaktion der Atherosklerose von essenzieller Bedeutung ist.

Es lassen sich deswegen drei Schlussfolgerungen schließen:

1. Eine Fractalkine-abhängige Leukozytenadhäsion an inflammatorisch verändertes Endothel fand primär an Stellen mit gesteigerter Plättchenadhäsion statt,
2. Plättchenadhäsion, Degranulation und Plättchen P-Selektin Expression ist auf stimulierten HUVEC deutlich gesteigert und Fractalkine-abhängig und
3. Anti-P-Selektin inhibiert Leukozytenadhäsion, obwohl die P-Selektin Expression auf stimulierten HUVEC nicht gesteigert war (s.o.).

Wir gehen deswegen von einer plättcheninduzierten, nicht aber von einer endothel-induzierten, P-Selektin vermittelten, Leukozytenadhäsion aus. Im Kontrast zur Leukozytenrekrutierung steht die Beobachtung, dass die Plättchenadhäsion unabhängig von der Anwesenheit von Fractalkine war.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung von Fractalkine und thrombozytärem P-Selektin für die Leukozyten-Adhäsion an inflammatorisches Endothel

Atherosklerose ist durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet (Ross R 1999). Für die Progression der Atherosklerose ist demnach eine kontinuierliche Rekrutierung von Leukozyten bedeutend. Die Leukozytenrekrutierung stellt einen Prozess mit mehreren, aufeinander folgenden Schritten dar, begonnen mit der initialen Kontaktphase zwischen Endothel und Leukozyten („Tethering“), gefolgt von Rollen der Leukozyten auf aktiviertem Endothel, sowie Adhäsion und Aktivierung. Die Endphase dieses für die Atherosklerose eminent wichtigen Prozesses, stellt die Transmigration des Leukozyten über das aktivierte Endothel in die Intima dar (Libby 2002). Für diesen Prozess sind eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen wichtig, wie z.B. Integrine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulin Typ (Muller WA 2003). Je nach Gefäßtyp und Flussbedingungen spielen unterschiedliche Rezeptoren eine Rolle.

Da Atherosklerose ein auf arterielle Gefäße beschränkter Prozess darstellt, stellt sich die Frage, wie die Leukozytenrekrutierung unter hohen arteriellen Scherraten stattfindet. Dieser Prozess ist bis heute im Detail nur wenig verstanden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auf inflammatorischem Endothel Fractalkine, ein kürzlich entdecktes, membranständiges Chemokin, exprimiert wird. Es ist bereits bekannt, dass Fractalkine, neben seiner chemotaktischen Funktion unter niedrigen Scherraten zu einer Rekrutierung und festen Adhäsion von Leukozyten beitragen kann (Imai T 1997). Die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothel ist die Voraussetzung für eine folgende Transmigration und Rekrutierung zu atherosklerotischen Läsionen. In der vorliegenden Arbeit ließ sich die Leukozytenadhäsion an inflammatorisches Endothel unter arteriellen Scherraten durch einen Antikörper gegen Fractalkine und seinen Rezeptor (CX₃CL1 und CX₃CR1) signifikant reduzieren. Dies impliziert, dass CX₃CL1 sowohl für die Akkumulation von Leukozyten unter venösen als auch unter arteriellen Scherraten bedeutsam ist.

Interessanterweise führte in Perfusionsversuchen von Vollblut über entzündlich aktivierte HUVEC nicht nur die Inhibition von CX₃CL1 zu einer Reduktion der

Leukozytenadhaesion, auch eine Blockade von P-Selektin hatte eine drastische Abnahme der Leukozytenadhäsion zur Folge. Dies war insofern überraschend, als P-Selektin nicht signifikant auf aktivierten HUVEC exprimiert wurde. Auch bei Flusskammerversuchen mit Perfusion von Vollblut über Fractalkine-transfizierten CHO Zellen unter arteriellen Scherraten konnte die Leukozytenadhäsion durch einen Antikörper gegen P-Selektin signifikant reduziert werden, obwohl P-Selektin nicht von den CHO-Zellen exprimiert wird.

In anderen Worten konnte im Kontext der vorliegenden Arbeit die Reduktion der Fractalkine-abhängigen Leukozytenadhäsion durch einen Antikörper gegen P-Selektin unter arteriellen Flussparametern nicht suffizient durch endotheliales P-Selektin erklärt werden. Ein weiterer Speicher für P-Selektin stellen Thrombozyten dar. Diese Ergebnisse, zusammen mit einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion an inflammatorische Endothel, legten eine Rolle von thrombozytärem P-Selektin als fehlendes verbindendes Glied in der Kette nahe. Wie oben bereits dargestellt gilt P-Selektin als ein wichtiger Rezeptor für den initialen Kontakt der Leukozyten auf Endothel („Tethering“) und vermittelt das anschließende Rollen auf Endothel (Muller WA 2003). Es mehren sich jedoch die Arbeiten, die eine wesentliche Bedeutung auch von thrombozytärem P-Selektin für die Leukozytenrekrutierung im atherosklerotischen Kontext beschreiben (Huo Y 2003) (Burger PC 2003) (Wagner DD 2003). Ergänzende Ansätze beschreiben in der Tat eine Rolle von aktivierten Thrombozyten bei der Rekrutierung von Leukozyten (Dole V 2005).

Basierend auf diesen Vorbefunden, hypothetisierten wir in der vorliegenden Arbeit, dass neben Fractalkine thrombozytäres P-Selektin einen wesentlichen Mediator der initialen Leukozytenrekrutierung unter arteriellen Scherraten darstellen könnte. Hierbei ist zunächst eine Thrombozytenadhäsion und Aktivierung nötig, um eine Leukozytenadhäsion zu erleichtern. Passend hierzu konnten Zwavinga et al. zeigen, dass bereits eine minimale Thrombozytenablagerung auf aktiviertem Endothel ausreicht, um eine Leukozytenadhäsion zu optimieren (Zwavinga JJ 1999). Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Leukozytenadhäsion nicht nur durch Inhibition der Fractalkine-Rezeptor-Achse blockiert werden, sondern ebenso durch eine spezifische Blockade der Thrombozytenadhäsion.

Unter arteriellen Scherraten ist damit die Adhäsion von Leukoyzten an inflammatorisch verändertes Endothel abhängig (1) von endotheliale

Fractalkine und (2) von auf adhärenenten Thrombozyten exprimiertem P-Selektin. Als leukozytärer Ligand von P-Selektin scheint insbesondere PSGL-1 zu fungieren (Dole VS 2005).

5.2 Bedeutung von Fractalkine für die Thrombozytenaktivierung und Leukozytenadhäsion

Wie oben bereits diskutiert, spielte in der vorliegenden Arbeit die endotheliale Expression von Fractalkine sowie die Adhäsion von Thrombozyten mit nachfolgender thrombozytärer P-Selektinexpression eine entscheidende Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten an inflammatorisches Endothel. Entsprechend zeigten inflammatorisch veränderte Endothelzellen eine gesteigerte Fractalkineexpression und andererseits führte die Gabe eines blockierenden Antikörpers gegen Fractalkine oder gegen dessen Rezeptor zu dramatischen Reduktion der Leukozytenadhaesion. Auf die Thrombozytenadhäsion selbst hatte die Inhibition des Fractalkinesystems keinen Effekt, die Adhäsion von Thrombozyten scheint damit anders als die Adhäsion von Leukozyten Fractalkine-unabhängig zu sein. Die Thrombozytenadhäsion auf inflammatorischem Endothel konnte jedoch signifikant durch Antikörper gegen GPIIb α und c7E3 reduziert werden. Gleichzeitig führten die genannten thrombozytenspezifischen Antikörper wie oben bereits erwähnt zu einer dramatischen Inhibition der Leukozytenadhäsion. Dies legt eine Bedeutung von adhärenenten Thrombozyten für die Leukozytenadhäsion unter hohen Scherkräften nahe. In der Flusskammer lies sich in der Tat eine signifikant vermehrte Leukozytenadhäsion an Orten von hoher Thrombozytendichte beobachten (s. Abbildung 14).

Auch wenn die Thrombozytenadhaesion selbst Fractalkine unabhängig ist, so ist endotheliales Fractalkine dennoch in der Lage die Funktion lokal adhärenter Thrombozyten substantiell zu modulieren. Fractalkine induziert so beispielsweise eine Degranulation von P-Selektin auf Plättchen, und wirkt synergistisch mit ADP. Dies konnte in einem statischen Bindungsansatz und mittels löslichem Fractalkine gezeigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Fractalkine eine P-Selektin abhängige Induktion von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten verursacht. Diese Ergebnisse sind richtungsweisend dahin, dass Fractalkine sekundär für eine Leukozytenadhäsion über eine primäre Plättchenaktivierung sorgt. Für diese Theorie

spricht auch die beobachtete und bereits beschriebene Kolo-kalisation von Plättchen und Leukozyten in der Flusskammer und würde auch die Hemmbarkeit der Leukozytenadhäsion durch einen Anti-CD62P Antikörper bei fehlender P-Selektin Expression auf aktivierten Endothelzellen in der Flusskammer erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend nur für P-Selektin, welches auf Thrombozyten exprimiert wurde, nicht aber für endotheliales P-Selektin, welches in unserem experimentellen Ansatz nicht auf Endothel exprimiert wurde, eine Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung nachgewiesen werden.

Endothelständiges Fractalkine *in vivo* könnte Thrombozyten aktivieren, zur Degranulation anregen und folglich selbst P-Selektin exprimieren lassen. P-Selektin ist wie oben dargestellt eine wichtige Voraussetzung für den initialen Kontakt, sowie das Rollen von Thrombozyten auf aktiviertem Endothel (Frenette PS 2000), der weitere Adhäsionsprozess wird dann über die weitere Adhäsionsmoleküle, wie insbesondere Integrine und Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt.

Es kann deswegen im Kontext der vorliegenden Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass Fractalkine unter hohen Scherraten eine P-Selektin Degranulation auf adhären-ten Thrombozyten triggert, welche dann konsekutiv die Leukozytenadhäsion einleitet.

Unsere Befunde sind in Einklang mit bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen. Eine Aktivierung von Thrombozyten ist durch eine Vielzahl von Agonisten, wie ADP, Thrombin oder Kollagen *in vivo* und *in vitro* möglich. Eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden, aktivierten Thrombozyten ist eng mit chronischen oder traumatischen Vorgängen wie chirurgischen Eingriffen im menschlichen Körper assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass zirkulierende, aktivierte Thrombozyten, über die Expression von P-Selektin, eine inflammatorische Reaktion über die Stimulierung von Endothelzellen und das P-Selektin vermittelte Leukozytenrollen an Endothelzellen fördert (Dole VS 2005).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass immobilisiertes und lösliches, vollständiges Fractalkine Thrombozyten aktiviert. Zusätzlich konnte in Flusskammerversuchen auch eine Degranulation von Thrombozyten durch Perfusion über Fractalkine-transfizierte CHO Zellen gegenüber Mock-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Diese Versuche verdeutlichen, mehr noch als die Versuche mit immobilisiertem und löslichem Fractalkine, die Bedeutung der Fractalkine-induzierten

Thrombozytenaktivierung für die folgende Leukozytenrekrutierung unter Flussbedingungen mit hohen Scherkräften.

Fractalkine stellt damit neben SDF-1 α und MDC ein weiteres Chemokin dar, für das eine unmittelbare Wirkung auf Thrombozyten beim Menschen beschrieben ist. Für SDF-1 α und MDC gilt ebenso, dass eine zusätzliche Stimulation mit ADP oder Thrombin die Thrombozytenaktivierung potenziert. Diese beobachteten Effekte stellen einen wichtigen Baustein für die Bedeutung der Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen dar, eine Domäne, die bisher Leukozyten vorbehalten war. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der Rezeptor für Fractalkine von unserer Gruppe bereits im Vorfeld erstmals auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (Schäfer A, Schulz C 2004).

Es wurde bereits beschrieben, dass Plättchen und Leukozyten zur Anlagerung neigen, besonders an Orten von Gefäßverletzungen. Andererseits sind zirkulierende PLA ein wichtiger Marker für Inflammation im Körper (Gawaz 1994). Darüber hinaus kann eine gegenseitige Anlagerung von Thrombozyten und Leukozyten die Funktion dieser Zellen beeinflussen. An Thrombozyten gebundene Leukozyten können leichter auf Endothelzellen rollen, adhären und transmigrieren. So ist für Neutrophile gezeigt worden, dass sie in Gegenwart von Thrombozyten leichter an entzündlichem Endothel und Endothel- bzw. Intimaläsionen adhären (Hirafuji M 1991; Merhi Y 1997). Die Ergebnisse der Dissertation zeigen, dass Fractalkine nicht nur die thrombozytenabhängige-Leukozytenadhäsion induziert, sondern auch eine signifikante PLA-Formation in Vollblut induziert. Dieser Effekt konnte durch einen spezifischen Anti-Fractalkine Antikörper und durch einen Antikörper gegen P-Selektin aufgehoben werden. Ebenso konnte in Flusskammerversuchen die Adhäsion von Leukozyten an Fractalkine-exprimierende CHO-Zellen durch einen Antikörper gegen P-Selektin signifikant reduziert werden. Zusammengenommen sind dies Belege dafür, dass die durch lösliches Fractalkine induzierte Formation von PLA über P-Selektin vermittelt wird und (neben der direkten Adhäsion von Leukozyten an bereits adhärente Thrombozyten) eine wichtige Rolle für die Fractalkine-induzierte Leukozytenakkumulation auf entzündlich verändertem Endothel spielen könnte.

5.3 Mögliche Bedeutung von Fractalkine für die Atherogenese

Atherosklerose ist eine der wesentlichen gesundheitlichen Bürden der westlichen Welt. Sie fordert in zivilisierten Nationen jährlich die meisten Todesopfer und die Therapie ihrer Folgeerscheinungen verursacht hohe Kosten für die Gesundheitssysteme weltweit (Libby P 2002). So verheerend die Krankheit für die Erkrankten ist, so gering sind die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Läsionsinitiation sowie über die krankheitsunterhaltenden und -fördernden Prozesse. Es gab vor kurzem einen Paradigmenwandel hin zur Übereinkunft, bei der Atherosklerose handle es sich um einen inflammatorischen Prozess (Libby P 2002).

Atherosklerose und Atherogenese spielen sich primär an arteriellen Gefäßen ab. Es stellt sich daher die Frage, wie eine Leukozytenrekrutierung (die für Unterhaltung eines inflammatorischen Prozesses obligatorisch ist) unter hohen arteriellen Scherraten möglich ist. Die ganz überwiegende Mehrheit bisher veröffentlichter Arbeiten über möglichen Adhäsionsmolekülen für eine Leukozytenrekrutierung untersuchten jedoch unter venösen Flussbedingungen. In der vorliegenden Dissertation wurde ausschließlich mit arteriellen Scherkräften im *in vitro* Modell der Flusskammer gearbeitet. Dies stellt die Voraussetzung für den Anspruch dar, man experimentiere näherungsweise im atherosklerotischen Kontext. Mit Hilfe dieses Modells konnten wir erstmals zeigen, dass auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen exprimiertes Fractalkine die Aktivierung von adhärenenten Thrombozyten induziert. Diese Thrombozytenaktivierung geht einher mit einer vermehrten thrombozytären P-Selektin-Expression, welche wiederum die nachfolgende Rekrutierung von Leukozyten einleitet.

Fractalkine (CX₃CL1) ist ein Chemokin, welches in menschlichen atherosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert wird (Greaves DR 2001). In zwei Studien konnte in Mäusemodellen eine Reduktion der atherosklerotischen Läsionsformation durch Deletion des Fractalkine-Rezeptors (CX₃CR1) erreicht werden (Combadiere C 2003; Lesnik P 2003).

Der genaue Mechanismus mit dem Fractalkine die atherosklerotische Inflammation unterhält war bisher jedoch unklar. In der vorliegenden Dissertation wird erstmals gezeigt, dass Fractalkine in einem P-Selektin anhängigen Mechanismus in Verbindung mit adhärenenten, aktivierten Thrombozyten zu einer vermehrten

Rekrutierung von Leukozyten an inflammatorisches Endothel führt. Diese Ergebnisse liefern wichtige damit Einblicke in die Rekrutierung von Leukozyten unter arteriellen Flussbedingungen im Allgemeinen, da dieses Feld bisher nur sehr unzureichend verstanden war.

Darüber hinaus wird dem Molekül P-Selektin erneut eine wichtige Rolle für die Atherogenese zugesprochen, ein Faktor, der in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Leukozytenadhäsion ganz wesentlich von der Interaktion von Leukozyten und thrombozytärem und endotheliale P-Selektin abhängig ist (Dole V 2005). Konsequenterweise konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Abwesenheit von P-Selektin zu einer reduzierten und verzögerten atherosklerotischen Läsionsformation führt (Dong ZM 1998). In knochenmarkstransplantierten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass thrombozytäres P-Selektin eine entscheidende Rolle für die atherosklerotische Plaqueentstehung spielt (Burger PC 2003). Eine mögliche Adhäsion zwischen Thrombozyten und Leukozyten ist die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 vermittelt (Larsen E 1989). Die Verbindung von Thrombozyten und Leukozyten vermittelt eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten am Endothel und führt zu einer Makrophagenakkumulation in der Gefäßwand (Dole VS 2005; Burger PC 2003; Huo Y 2003).

Die in der Dissertation vorgestellten Resultate ermöglichen eine weitere Einsicht in die Mechanismen, der Fractalkine-vermittelten Progression der Atherosklerose. Es wird ein schlüssiger Mechanismus über die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten präsentiert, der eine wichtige Rolle in der arteriellen Läsionsformation *in vivo* spielen könnte. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass es durch eine cholesterinsenkende und somit mittelbar anti-inflammatorische Therapie mittels HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statinen) nicht nur zu einer reduzierten Plaqueformation, sondern auch zu einer reduzierten Expression von Fractalkine bzw. des Rezeptors (CX₃CL1 und CX₃CR1) kommt.

Um eine Krankheit wirkungsvoll therapieren zu können, ist ein profundes Verständnis der Pathophysiologie bis hin zur molekularen Ebene von überragender Wichtigkeit. Einblicke in die Pathophysiologie der Atherogenese liefern wichtige Voraussetzungen für Verständnis der Erkrankung sowie potenzielle zukünftige Therapieverfahren. Dies erklärt die Wichtigkeit von Grundlagenforschung für mögliche, spätere klinische

Anwendungen, so wird zum Beispiel an so genannten Scavenger Proteinen gearbeitet, die Fractalkine in seiner pro-inflammatorischen Funktion inhibieren sollen.

5.4 Studienbeschränkungen

Es ist davon auszugehen, dass Thrombozyten die ersten Zellen darstellen, die im Bereich von Prädilektionsstellen für atherosklerotische Laesionen lokal rekrutiert werden (Massberg 2002). In dieser Phase sind die Endothelzellen morphologisch intakt, aber dysfunktionell. Die Rolle des Chemokins Fractalkine für Manifestation der Atherosklerose über den hier beschriebenen Mechanismus dürfte daher insbesondere initial bedeutsam sein, also im Rahmen der initialen Bildung von Läsionen. Letztendlich muss diese Frage aber noch abschließend geklärt werden.

Fractalkine induziert eine Aktivierung von Thrombozyten und triggert die PLA Formation, jedoch keine Thrombozytenadhäsion. Eine Leukozytenadhäsion wird durch Fractalkine vermittelt und durch die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten verstärkt, bzw. erst ermöglicht. Ein mögliches Modell geht von der Fractalkine-induzierten Aktivierung der im Fluss befindlichen Thrombozyten und den bereits an weiteren Adhäsionsmolekülen adhärenen Thrombozyten aus, die dann konsekutiv die Leukozytenrekrutierung fördern.

Eine Einschränkung muss auch bezüglich der verwendeten Methodik gemacht werden, denn es handelt sich bei der verwendeten Flusskammer um reine *in vitro* Modelle. Sie liefern zwar wertvolle Einblicke unter gut reproduzierbaren und standardisierbaren experimentellen Flussbedingungen, es handelt sich dabei aber nur näherungsweise um natürliche Vorgänge. Um physiologischere Aussagen treffen zu können, müssen jedoch *in vivo* Untersuchungen beispielsweise bei Mäusen folgen. Das Gleiche gilt natürlich für die verwendeten durchflusszytometrischen Messungen.

6. Zusammenfassung

Das membrangebundene Chemokin Fractalkine (CX₃CL1) wird auf zahlreichen Zelltypen exprimiert, dazu gehören unter anderem entzündlich veränderte Endothelzellen. Fractalkine wird so beispielsweise auf atherosklerotischen Plaques exprimiert.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, die Rolle des Chemokins Fractalkine für die Rekrutierung von Leukozyten an entzündlich veränderte Endothelzellen unter arteriellen Scherkräften, wie sie in atherosklerotisch erkrankten Arterien vorzufinden sind, zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVEC), die mit TNF- α und INF- α stimuliert wurden, CX₃CL1 exprimieren und Leukozytenakkumulation unter arteriellen Flussbedingungen fördern. Ein blockierender Antikörper gegen CX₃CL1 reduzierte die Leukozytenadhäsion unter arteriellen Flussbedingungen um 40%, ebenso wie ein Antikörper gegen CX₃CR1. Dies belegt, dass Fractalkine die Leukozytenadhäsion an entzündete Endothelzellen unter arteriellen Scherraten fördert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten zwingend notwendig für die Rekrutierung von Leukozyten an entzündlich verändertes Endothel unter arteriellen Flussraten waren, da eine Blockade der Thrombozytenadhäsion mittels Antikörper gegen GPIIb α und α IIb β 3 Integrin auch die Leukozytenadhäsion reduzierte. Thrombozyten exprimieren den Fractalkine-Rezeptor (CX₃CR1) und die vorliegende Arbeit zeigt in durchflusszytometrischen Experimenten, dass eine Degranulation und folgende Oberflächenexpression von P-Selektin durch lösliches und membranständiges Fractalkine induziert wird. Hierdurch induziert Fractalkine eine direkte Thrombozyten-Leukozyten Interaktion. Durch die Verwendung von stabilen Fractalkine-Transfektanten konnte in der vorliegenden Dissertation ferner gezeigt werden, dass die durch Fractalkine induzierte Expression von P-Selektin auf Thrombozyten wichtig für die Leukozytenadhäsion auf inflammatorischem Endothel unter arteriellen Flussbedingungen ist.

Es kann zusammengefasst werden, dass Fractalkine, welches von inflammatorischen Endothelzellen exprimiert wird, eine Expression von P-Selektin auf bereits adhärenen Thrombozyten induziert und dadurch die Akkumulation von Leukozyten unter arteriellen Flussbedingungen fördert, ein Prozess der wichtig für die Ausbildung von atherosklerotischer Läsionen ist.

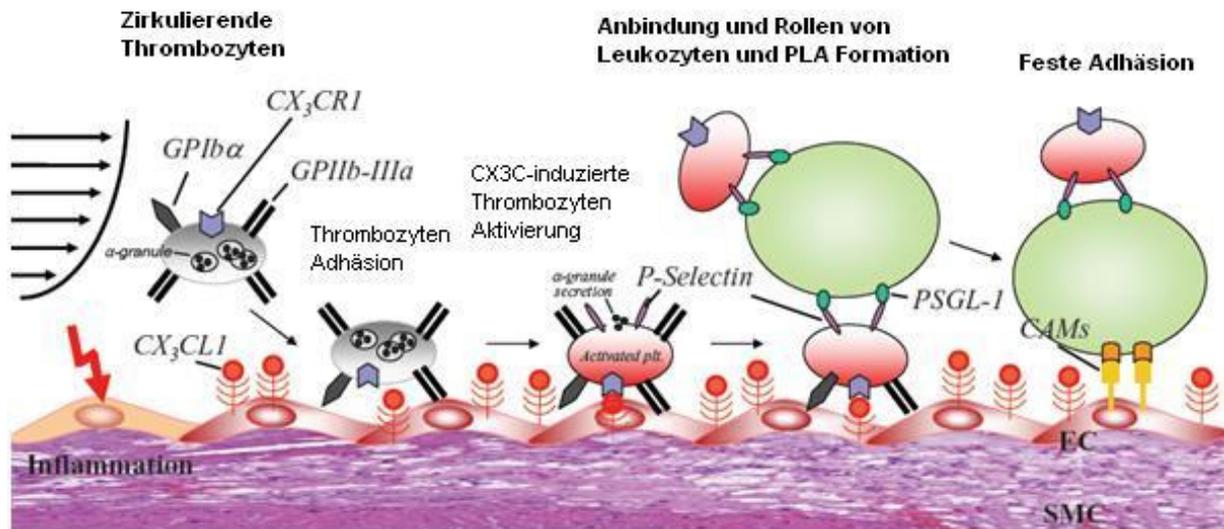


Abbildung 26: Im Prozess der Atherogenese kommt es zur Expression von Fractalkine (CX_3CL1) auf inflammatorisch alteriertem Endothel. Thrombozyten adhären mittels beschriebenen Rezeptoren, wie $GPIb$ und $GPIIb-IIIa$ auf aktivierten Endothelzellen und werden über Fractalkine aktiviert, sodass sie P -Selektin aus ihren α -Granula auf ihrer Oberflächenmembran exprimieren. Über die Expression von P -Selektin wird eine Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten (PLA) vermittelt, wobei die Verbindung zwischen P -Selektin auf Thrombozyten und $PSGL-1$ auf Leukozyten zustande kommt. Sobald Thrombozyten und Leukozyten Aggregate bilden, wird ein Rollen und Anbinden auf aktiviertem Endothel ermöglicht, welches dann über Fractalkine und andere Adhäsions-Rezeptoren wie $ICAM-1$ und $VCAM-1$ vermittelt werden.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000;86:131-138
- (2) Abi-Younes S, Si-Tahar M, Luster D. The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thromb Res* 2001;101:279-289
- (3) Abrams C SS. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost.* 1991;65:467-73
- (4) Andrews RK, Lopez JA. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:91-105
- (5) Ashman N, Macey MG, Fan SL, Azam U. Increased platelet - monocyte aggregates in and cardiovascular disease in end stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2088-96
- (6) Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973;52:741-744
- (7) Bainton DF. Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils. Aus: Beutler E, Coller B, Kipps TJ (Hrsg.): *Williams Hematology* (5. Auflage). New York, McGraw-Hill 1995
- (8) Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-644
- (9) Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochem Biophys Acta* 1983;736:57-66
- (10) Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Mechanisms involved in platelet procoagulant response. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:195-207
- (11) Bizzozzero J. Über einen Formbestandteil des Blutes und die Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Virchows Arch Pathol Anat* 1882;90:261
- (12) Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998;187:329-39
- (13) Brand K, Page S, Rogler S. Activated transcription factor nuclear factor - kappa B is present in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1996;97:1715-22
- (14) Burger PC, Wagner DD. Platelet P - Selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003;101:2661-2666
- (15) Butcher EC. Leukocyte - endothelial cell recognition: three or more steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-1036

- (16) Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane Glycoproteins. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principals and clinical practice (3.Auflage). Philadelphia: JB Lippincott Company 1994
- (17) Colman RW, Hirsch J, Mader VJ, Salzman EW. Overview of Hemostasis. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principals and clinical practice (3.Auflage). Philadelphia: JB Lippincott Company 1994
- (18) Combadière C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debré P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 2003;107:1009-1016
- (19) Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. Cloning, chromosomal localization and RNA expression of a human β -chemokine receptor like gene. *DNA Cell Biol* 1995;14:673-680
- (20) Damås JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2567-2572
- (21) Davies MJ. Mechanisms of thrombosis in atherosclerosis. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principals and clinical practice (3.Auflage). Philadelphia: JB Lippincott Company 1994
- (22) Dewald B, Thelen M, Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J Biol Chem* 1988;263:16179-16184
- (23) Diacovo TG RSBJBDST. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:146-157
- (24) Dickfeld T, Lengyel E, May AE. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte - chemoattractant protein - 1 via a p38 mitogen- activated protein kinase mediated pathway. *Cardiovasc Res.* 2001;49:189-199
- (25) Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 2005;106:2334-2339
- (26) Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998;102:145-152
- (27) Douglas SD, Ho W. Morphology of monocytes and macrophages. Aus: Beutler E, Coller B, Kipps TJ (Hrsg.): *Williams Hematology* (5. Auflage). New York, McGraw-Hill 1995

- (28) Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T. Changes in surface expression of platelet membrane glykoprotein and progression of heart transplant vasculopathy. *Circulation* 2000;102:890-897
- (29) Ferguson JJ. Safe use of platelet GP IIb/IIIa inhibitors. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl D:D40-51
- (30) Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*. 1986;315:983-989
- (31) Flier JS, Underhill LH. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992;78:401-405
- (32) Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, Chieppa M, Allavena P, Ruco L, Girolomoni G, Sinigaglia F, Vecchi A, Mantovani A. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 2001;107:1173-1181
- (33) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glykoproteinligand-1 (PSGL-1) is expressed on activated platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413-1422
- (34) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes (Part 1). *N Engl J Med* 1992;326:242-250
- (35) Fuster V, Badimon JJ. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes (Part 2). *N Engl J Med* 1992;326:310-318
- (36) Gawaz M, Bogner C. Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet - leukocyte interaction during hemodialysis. *J Clin Investig* 1994;72:424-429
- (37) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;96(6):1809-1818
- (38) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T. Activated platelets induce secretion of monocyte chemotactic protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-1171
- (39) Gawaz M, Brand K, Dickfeld T. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2000; 148: 75-85
- (40) Gawaz M. Platelets in primary hemostasis. *Aus: Blood Platelets*. Thieme Verlag. Stuttgart, New York 2001
- (41) Gawaz M NFSA. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999;99:E1-E11

- (42) Gear AR, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 2001;97:937-945
- (43) Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104:503-516
- (44) Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H. CX3C-Chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and-independent mechanisms. *J Immunol* 2000;164,4313-4320
- (45) González P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, Cubero GI, Cortina A, Coto E. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun.* 2001;2:191-195
- (46) Greaves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Hertualla S. Linked Chromosomes 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:923-929
- (47) Guyer DA, Moore KL, Lynam EB, Schammel CM, Rogelj S, McEver RP, Sklar LA. P - selectin glycoprotein ligand - 1 (PSGL - 1) is a ligand for L - selectin in neutrophil aggregation. *Blood* 1996;88: 2415-2421
- (48) Henn V, Slupsky JR, Gräfe M. CD40 ligand on activated platelets trigger an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594
- (49) Hicks AE, Nolan SL, Ridger VC, Hellewell PG, Norman KE. Recombinant P - selectin glycoprotein ligand - 1 directly inhibits leukocyte rolling by all three selectins in vivo: complete inhibition of rolling is not required for anti - inflammatory effect. *Blood* 2003;101: 3249-3256
- (50) Hirafuji M SH. Platelet-leukocyte interaction in adhesion to endothelial cells induced by platelet-activating factor in vitro. *Br J Pharmacol.* 1991;103:1333-1338
- (51) Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of α -granule proteins. *Semin Hematol* 1985; 22:151
- (52) Huo Y, Schober A, Forlow SB. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003; 9: 61-67
- (53) Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-530

- (54) Kaur J, Woodman RC, Ostrovsky L, Kubes P. Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF-kB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:784-795.
- (55) Kay NE, Douglas SD. Morphology of lymphocyte and plasma cell. Aus: Beutler E, Coller B, Kipps TJ (Hrsg.): *Williams Hematology* (5. Auflage). New York, McGraw-Hill 1995
- (56) Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14:44S-54S
- (57) Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996;88:1525-1541
- (58) Kuziel WA, Dawson TC, Quinones M. CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis* 2003;167:25-32
- (59) Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-312
- (60) Leung LLK. Molecular mechanism of platelet aggregation. *Ann Rev Med.* 1986;37:179-186
- (61) Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling leukocytes. *Immunol Rev* 2002;186:8-18
- (62) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874
- (63) Lucas A, Bursill CA, Guzik TJ. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 2003;108:2498-2504
- (64) Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338:436-445
- (65) Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. *Nature* 1998;394:200-203
- (66) Mach F. The role of chemokines in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001;3:243-251
- (67) Mackie IJ, Neal CR. *The Platelet. Platelet - vessel wall interactions.* The Bloomsbury series in clinical science. Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1988
- (68) Massberg S, Brand K, Gruner S. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesions formation. *J Exp Med* 2002;196:887-896
- (69) Massberg S, Vogt F, Dickfeld T. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 2003;197:41-49

- (70) Massberg S, Schürzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, Gawaz M. Reduced platelet adhesion, attenuated atherosclerosis and increased resistance to focal cerebral ischemia in mice lacking GPIIb/IIIa. *Circulation* 2005;112:1180-1188
- (71) McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ. Res.* 2001;89:401-407
- (72) McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 2003;111:1241-1250
- (73) McEver RP. Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann New York Acad Sci* 1994;714:185-189
- (74) McEver RP. Regulation of function and expression of P - Selectins. *Agents Actions Suppl* 1995;47:117-119
- (75) McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2001;86:746-756
- (76) Merhi Y, Provost P, Guidoin R. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1185-1191
- (77) Metha P, Metha J. Platelet function studies in coronary artery disease: evidence for enhanced platelet microthrombus formation activity in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1979;43:757-760
- (78) Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P- Selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;104:1533-1537
- (79) Mickelson JK, Lakkis NM, Hughes BJ. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345-353
- (80) Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 2001;97:1925-1929
- (81) Moore KL. Structure and function of P - selectin glycoprotein ligand - 1. *Leuk Lymphoma* 1998;29:1-15

- (82) Moore S. The role of platelets in their early stages of atherosclerosis. Aus: Kessler JS (Hrsg): Platelets and atherosclerosis (3.Auflage). Springer Verlag, Heidelberg 1990
- (83) Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. Trends Immunol.2003;24:327-334
- (84) Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, May A, Mössmer G, Schömig A. Prospective evaluation of hemostatic predictors of subacute stent thrombosis after coronary Palmaz - Schatz stenting. J Am Coll Cardiol 1996;27:15-21
- (85) Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin - stimulated platelets. Circulation 1997;95: 2387-2394
- (86) Osterud B. A global view on the role of monocytes and platelets in atherogenesis. Thromb Res 1997;85: 1-22
- (87) Ott I, Neumann FJ, Gawaz M. Increased neutrophil platelet adhesion in patients with unstable angina. Circulation 1996;94:1239-1242
- (88) Packham MA, Mustard JF. The role of platelets in the development of atherosclerosis. Sem Hematol 1986;23: 8-26
- (89) Peters-Golden M, Brock TG. 5-lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids 2003;69:99-109
- (90) Pitchford SC, Momi S, Giannini S, Casali L, Spina D, Page CP, Gresele P. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. Blood 2005;105:2074-2081
- (91) Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, Khalapyan TZ, Wolfe ML, Fairman R, Mitchell M, Carpenter J, Golden MA, Cines DB, Sachais BS. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. Thromb Haemost 2003;90:1112-1120
- (92) Plow EF, Ginsberg MH. Molecular basis of platelet function. Aus: Hematology: Basic principles and Practice (2. Auflage). Hoffman R Benz EJ Shattil SJ (Hrsg.). Churchill Livingstone, New York 1995
- (93) Raport CJ, Schweickart VL, Eddy RL Jr, Shows TB, Gray PW. The orphan G - protein coupled receptor - encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. Gene 1995;163:295-299
- (94) Reinhardt PH, Kubes P. Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. Blood 1998;92:4691-4699

- (95) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1997;336:973-979
- (96) Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 1992;79:1201-1205
- (97) Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991;78:1760-1769
- (98) Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. The glykoprotein Ib-IX-V complex is a counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999;190:803-814
- (99) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
- (100) Ross R. Atherosclerosis-- an Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126
- (101) Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344-348
- (102) Sarma J, Laan CA, Alam S. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:2166-2167
- (103) Schäfer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, Ertl G, Walter U, Bauersachs J. Novel role of the membrane bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood* 2004;103:407-412
- (104) Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:50-178
- (105) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314
- (106) Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P - selectin deficient mice. *Blood* 1996;87:1238-1242
- (107) Szalai C, Duba J, Prohászka Z, Kalina A, Szabó T, Nagy B, Horváth L, Császár A. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease. Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 - 2518 G/G genotype in CAD Patients. *Atherosclerosis* 2001;158:233-239
- (108) Tan P, Lusinskas FW, Homer-Vanniasinkam S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:373-389

- (109) Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T - cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP - 1 β . *Nature* 1993;361,79-82
- (110) Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy. Emerging platelet preeminence. *Circulation* 1998;97:211-218
- (111) Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24;34-40;
- (112) Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2131-2137
- (113) White G. Anatomy and structural organization of the platelet. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principals and clinical practice (3.Auflage). Philadelphia: JB Lippincott Company 1994
- (114) Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja LM. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989;80:198-205
- (115) Wong BW, Wong D, McManus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:332-338
- (116) Yang L, Furie BC, Furie, B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999;81:1-7
- (117) Zeiffer U, Schober A, Lietz M, Liehn EA, Erl W, Emans N, Yan ZQ, Weber C. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines. *Circ Res* 2004;94:776-784
- (118) Zwaginga JJ, Torres HI, Lammers J, Sixma JJ, Koenderman L, Kuijper PH. Minimal platelet deposition and activation in models of injured vessel wall ensure optimal neutrophil adhesion under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1549-1554

8. Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid citrate dextrose
ADP	Adenosin Diphosphat
ATP	Adenosin Triphosphat
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40Ligand
CHO	Chinese hamster ovary
CRP	C-reaktives Protein
CSF	colony stimulating factor
DCF	5 - carboxyfluoreszin diacetat succinimidyl ester
DTS	Dense tubular system
E	endothelium
EGF	epidermal growth factor
EM	Elektronenmikroskop
Ez	Endothelzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GF	growth factor
GP	Glykoprotein
HMWK	high molecular weight kallikrein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
INF	Interferon
L	leukocyte
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LDL	low density lipoprotein
LIBS	ligand induced binding sites
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	monocyte chemoattractant protein
mRNA	messenger ribonuclein acid
NF-kB	nuclear factor -kB
NKZ	Natürliche Killerzellen

P	platelet
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAI	plasminogen activator inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PF	platelet factor
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
RANTES	regulated on activation, normal T expressed and secreted
rh	recombinant human
RIPA	Radioimmunoprecipitation
SCS	Surface connected system
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TG	thromboglobuline
TGF	tumor growth factor
TNF	Tumor necrose factor
TNS	Tris NaCl Sarkosyl
TXA2	thromboxane A2
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand Faktor

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.	Seitenzahl
Abb. 1	6
Abb. 2	6
Abb. 3	20
Abb. 4	22
Abb. 5	34
Abb. 6	35
Abb. 7	42
Abb. 8	45
Abb. 9	46
Abb. 10	46
Abb. 11	47/48
Abb. 12	49
Abb. 13	50
Abb. 14	51
Abb. 15	52
Abb. 16	54
Abb. 17	55
Abb. 18	56
Abb. 19	57
Abb. 20	58
Abb. 21	59
Abb. 22	60
Abb. 23	61
Abb. 24	62
Abb. 25	63
Abb. 26	74

10. Tabellenverzeichnis

Tabellen Nr.	Seitenzahl
Tab. 1	7
Tab. 2	10
Tab. 3	16
Tab. 4	36

11. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, seine kompetente Führung und seine motivierende und hilfsbereite Betreuung bedanken.

Bei Herrn Dr. Christian Schulz möchte ich mich für die tatkräftige und aufmunternde Betreuung bei der täglichen Laborarbeit bedanken, sowie für die kritische Durchsicht der Ergebnisse.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Sandra Kerstan, Kirsten Langenbrick und Michael Lorenz bedanken, die mich bei den technischen Fragen der Laborarbeit unterstützten.

12. Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

<i>Name</i>	Moritz Stolla
<i>Geburtsort</i>	Bad Schwalbach
<i>Geburtstag</i>	06. August 1978
<i>Nationalität</i>	Deutsch
<i>Familienstand</i>	ledig

SCHUL- UND BERUFSBILDUNG

<i>1989-1999</i>	Elly-Heuss-Schule, Wiesbaden Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
<i>2000-2006</i>	Studium der Humanmedizin an der Ludwig - Maximilians - Universität München
<i>August 2002</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>August 2003</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>August 2005</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>November 2006</i>	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ERSATZDIENST

<i>August 1999 - Juni 2000</i>	Zivildienst in der Kardiologie des St.Josefshospitals in Wiesbaden
--------------------------------	---

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

<i>April 2004 - Oktober 2005</i>	Gefördertes Mitglied des Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft
----------------------------------	---