

1. Med. Klinik der Technischen Universität München  
Deutsches Herzzentrum München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

# Die Bedeutung der p38-MAP-Kinase für die Thrombozyten-induzierten chemotaktischen Veränderungen in Endothelzellen

Christiane E. Thielen

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. apl. Prof. Dr. M. P. Gawaz
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 04.11.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.05.2004 angenommen.

*Meinen lieben Eltern gewidmet*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1	Bedeutung der Thrombozyten für die Atherogenese	9
1.2	Thrombozyten	11
1.2.1	Morphologie	11
1.2.2	Aktivierung und Sekretion	13
1.3	Endothel	14
1.3.1	Morphologie	14
1.3.2	Interaktion von Thrombozyten und Endothel	14
1.3.3	Adhäsionsrezeptoren und Sekretionsprodukte	16
1.4	Signalwege bei der endothelialen Bildung von MCP-1 und ICAM-1	18
1.5	Zielsetzung	21
<b>2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	Reagenzien und Antikörper	23
2.2	Zelllinien	24
2.3	Plättchenisolation	25
2.4	Koinkubation von Endothelzellen und Plättchen	26
2.5	Adhäsion und Chemotaxis von Monozyten	26
2.6	MCP-1-Bestimmung im ELISA	27
2.7	Durchflusszytometrie	28
2.8	p38-MAP-Kinaseassay und Immunoblot	29
2.9	Transfektion und Luziferaseassay	30
2.10	Immunofluoreszenzmikroskopie	31
2.11	Statistische Analyse	31
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
3.1	Einfluss von aktivierten Plättchen auf Endothelzellen	32

<b>3.1.1</b>	<b>Plättchen-induzierte Sekretion von endotheliale MCP-1 im Zeitverlauf</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Zeitlicher Verlauf der Plättchen-induzierten Expression von endotheliale ICAM-1</b>	<b>34</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Bedeutung aktivierter Plättchen für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Wirkung von Kinaseinhibitoren auf Plättchen-induzierte Effekte in Endothelzellen</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Sekretion von endotheliale MCP-1</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Bedeutung des p38-Kinaseinhibitors SB203580 für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Wirkung der p38-MAP-Kinase auf die Plättchen-vermittelte Transkription von MCP-1 in Endothelzellen</b>	<b>42</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch Plättchen</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Plättchen-induzierte Kerntranslokation der p38-MAP-Kinase</b>	<b>42</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Einfluss des p38-Kinaseinhibitors SB203580 auf die Plättchen-induzierte Transkription von endotheliale MCP-1</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Überexpression von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten in Endothelzellen</b>	<b>46</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Wirkung von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die Transkription von endotheliale MCP-1</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Einfluss von dominant-negative p38-MAPK-Mutanten auf die MCP-1-Sekretion in Endothelzellen</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Rolle der Plättchenadhäsion bei der Atherogenese</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Plättchen-induzierte Chemokintranskription wird durch die p38-MAP-Kinase vermittelt</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Studienbeschränkungen</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Potentielle therapeutische Konsequenzen der vorliegenden Arbeit</b>	<b>56</b>

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>70</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (nach 31)</i>	12
<i>Tab. 2: Thrombozytäre Membranglykoproteine (nach 30)</i>	15
<i>Tab. 3: Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsrezeptoren</i>	16
<i>Abb. 1: Die drei MAP-Kinase-Kaskaden</i>	20
<i>Abb. 2: Plättchen-induzierte Sekretion von endotheliale MCP-1 im Zeitverlauf</i>	33
<i>Abb. 3: Plättchen-induzierte Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Endothelzellen</i>	35
<i>Abb. 4: Monozytenadhäsion an Endothelzellen</i>	37
<i>Abb. 5: Einfluss aktivierter Plättchen auf die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen</i>	38
<i>Abb. 6: Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Expression von MCP-1 durch Endothelzellen</i>	40
<i>Abb. 7: Bedeutung des p38-MAP-Kinaseinhibitors SB203580 für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen</i>	41
<i>Abb. 8: Plättchen-induzierte p38-Kinaseaktivität in Endothelzellen</i>	43
<i>Abb. 9: Plättchen-induzierte Kerntranslokation von p38 in Endothelzellen</i>	44
<i>Abb. 10: Einfluss des p38-Kinaseinhibitors SB203580 auf die Plättchen-induzierte Transkription von endotheliale MCP-1</i>	45
<i>Abb. 11: Wirkung von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die Transkription von endotheliale MCP-1</i>	47
<i>Abb. 12: Einfluss von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die MCP-1-Sekretion in Endothelzellen</i>	48
<i>Abb. 13: Induktion inflammatorischer Gene durch transiente Thrombozyten-Endothelzellinteraktion</i>	55

## Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-citrat dextran
ATF-2	Activating Transcription Factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
CTP	Cytidintriphosphat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular related kinase
FACS	Fluorescent activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GP	Glykoprotein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
PBS	Phosphat-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
rhIL-1 $\beta$	rekombinantes humanes Interleukin-1 $\beta$
SDS-PAGE	Sodiumdodezylsulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
vWF	von-Willebrand-Faktor

## 1 Einleitung

Die Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess, auf dessen Boden kardiovaskuläre Krankheiten mit ihren Komplikationen Myokardinfarkt, Apoplex und Embolie oder Thrombose der peripheren Gefäße entstehen (19, 47, 63, 75, 76, 88). Wenngleich Objekt intensiver Forschung und Weiterentwicklung diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, stellt die Atherosklerose auch heute noch die Grundlage für die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt dar (10, 19, 47, 63).

Hinter der Entstehung atherosklerotischer Läsionen verbergen sich hochspezifische zelluläre und molekulare Mechanismen, die im Sinne einer Inflammation als Antwort auf eine Funktionsstörung im Bereich der Endothelzelle verstanden werden (47, 74, 75, 76). Ursprünglich nahm man an, dass der initiale Schritt in der Atherogenese die Gefäßwandläsion mit Denudation des Endothels ist („response-to-injury-hypothesis“) (74). Die vergangenen drei Dekaden haben zu einer Erweiterung dieser Hypothese geführt. Neben einer Zerstörung der Endothelstruktur kann auch eine Funktionsstörung des strukturell intakten Endothels Ausgangskorrelat des chronisch inflammatorischen Prozesses darstellen. Verschiedene Reize und Noxen, bei deren Entstehung auch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren Hyperlipidämie, Hypertension, Diabetes mellitus und Nikotinabusus eine entscheidende Rolle spielen, können zu einer Funktionsstörung der Endothelzelle führen (25, 89, 76, 63). Im Blut zirkulierende Thrombozyten vermögen, an das strukturell oder funktionell gestörte Endothel zu adhären und durch Aktivierung der Endothelzellen weitere Schritte im Prozess der Atherogenese einzuleiten. Inzwischen weiß man jedoch, dass Thrombozyten im aktivierten Zustand auch an strukturell und funktionell intaktes Endothel adhären und mit diesem interagieren (8, 28). Durch die Interaktion von Thrombozyten und Endothel werden die Endothelzellen aktiviert und inflammatorische Prozesse generiert (56). Die aktivierte Endothelzelle verändert ihre adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften; sie exprimiert Adhäsionsmoleküle (1, 24, 42) und sezerniert Chemokine (1, 73, 90). Dadurch wird die Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten, vorwiegend Monozyten, begünstigt. Es findet eine Transmigration der Entzündungszellen in die Intima statt, wo es zur Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und durch Aufnahme von Lipiden zu Schaumzellen kommt (47,

63, 76). Es entsteht die sogenannte Frühläsion („fatty streak“), die eine Ansammlung von Schaumzellen, aktivierten T-Zellen und glatten Muskelzellen darstellt (47). Durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Substanzen und prokoagulatorische Faktoren vermittelt, kommt es zu einer weiteren Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen sowie zu einer Adhäsion, Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten. Schließlich entsteht eine fibröse Kappe, bestehend aus Lipiden, Leukozyten und Zellbestandteilen. Dadurch formiert sich die sogenannte komplexe Spätläsion, die das Gefäßlumen nach innen stenosiert und im Gegensatz zu der Frühläsion irreversibel ist (47, 74). Im weiteren Verlauf kann es durch Degradation von Matrixbestandteilen, insbesondere von Kollagen, und durch Verdünnung der fibrösen Kappe zu einer Plaque-Instabilität kommen, begleitet von der Freisetzung prokoagulatorischer Faktoren. Kommt es im Folgenden zu einer Plaqueruptur, kann es rasch zu der Bildung eines das Gefäßlumen akut verschließenden Thrombus kommen und somit zu den Komplikationen Myokardinfarkt, Apoplex oder Embolie der peripheren Gefäßen führen (47, 48, 76).

## **1.1 Bedeutung der Thrombozyten für die Atherogenese**

Aktivierte Thrombozyten verändern die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen und spielen dadurch eine entscheidende Rolle in der frühen Atherogenese (55, 76).

Eine der frühesten sichtbaren atherosklerotischen Veränderungen im Bereich der Gefäßwand ist die intimale Lipideinlagerung. Ein zentraler Auslösemechanismus für die Intimaveränderung ist die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Monozyten. Nachfolgend kommt es zu einer Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und Bildung von Schaumzellen sowie zu einer Migration glatter Muskelzellen in die Gefäßwand. Es entsteht eine atherosklerotische Veränderung.

Im ruhenden Zustand zirkulieren die Thrombozyten im Gefäßsystem, ohne mit dem Endothel zu interagieren. In Bereichen von Gefäßwandläsionen oder Funktionsstörungen des Endothels kann es durch die Adhäsion von Thrombozyten zu der Einleitung von

Gerinnungsprozessen kommen. Im aktivierten Zustand vermögen die Thrombozyten auch direkt an intakte Endothelzellen zu adhären (8, 28). Besonders in Bereichen veränderter Flusseigenschaften, wie sie in Gefäßaufzweigungen vorkommen, können aktivierte Thrombozyten am Endothel adhären, zu einer Freisetzung proinflammatorischer Substanzen und zu einer Aktivierung der Endothelzellen führen. Die Mechanismen, die bei der Rekrutierung und Adhäsion von zirkulierenden Thrombozyten an die Endothelzelle beteiligt sind, sind vielfältig und komplex. Eine wesentliche Rolle spielen das Glykoprotein (GP) IIb-IIIa und die Kollagenrezeptoren, insbesondere das Glykoprotein (GP) Ib-V-IX und das Glykoprotein (GP) VI (4, 14, 58, 65).

Im aktivierten Zustand setzen Thrombozyten eine Vielzahl proinflammatorischer Substanzen wie Wachstumsfaktoren und Cytokine frei, die in hohen Konzentrationen in den Thrombozyten gespeichert sind. Große Bedeutung für den Prozess der Atherogenese kommen hierbei dem Zytokin IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta) (26, 37) und dem Rezeptor CD40L (39) zu, welche zu einer Aktivierung der Endothelzelle führen. Die aktivierte Endothelzelle induziert über die Transkription inflammatorischer Gene die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen und Chemokinen, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen. Angelockt durch Chemokine adhären Entzündungszellen, insbesondere Monozyten, über Adhäsionsmoleküle wie das ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“) oder VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1“) an den Endothelzellen (64). Das für die Atherogenese bedeutendste Chemokin ist das MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“), welches zu der Gruppe der C-C-Chemokine gehört. Es führt zu einer Chemotaxis und Transmigration von Monozyten durch das Endothel (51). Im Subendothel findet die Differenzierung der rekrutierten und an die Endothelzelle adhärenen Monozyten in Makrophagen und nach der Phagozytose oxidierter LDL-Partikel die Bildung von Schaumzellen statt. Es kommt zu der Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Im weiteren Verlauf der Atherogenese werden, vermittelt durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen angeregt, und es kommt zu einer zunehmenden Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an die Stelle des wachsenden atherosklerotischen Plaques (47).

Somit sind die Thrombozyten bei dem Wachstum der atherosklerotischen Läsion in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, aber auch bei den initialen

Entstehungsmechanismen des atherosklerotischen Plaques in der frühen Atherogenese von zentraler Bedeutung.

## 1.2 Thrombozyten

### 1.2.1 Morphologie

Thrombozyten kommt eine wesentliche Bedeutung bei den physiologischen Vorgängen der Hämostase, aber auch bei den pathophysiologischen Mechanismen der arteriellen Thromboseentstehung und der Atherogenese zu.

Die Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und zirkulieren mit einer Gesamtzahl von 150 000 bis 300 000 / $\mu$ l im peripheren Blut. Nach einer physiologischen Überlebenszeit von sieben Tagen werden sie im Retikuloendothelialen System von Leber und Milz abgebaut. Als sogenannte anukleäre Zellen besitzen sie keinen Zellkern und sind nur sehr eingeschränkt zu einer Neusynthese von Proteinen fähig. Mit einem Durchmesser von 2 bis 4  $\mu$ m sind sie wesentlich kleiner als die übrigen Blutzellen und haben im ruhenden Zustand eine diskoide Form. Nach Aktivierung kommt es zu einer Formveränderung mit Ausstülpung der Plasmamembran und Bildung von Pseudopodien. Die Thrombozyten weisen eine komplexe Ultrastruktur auf, die in vier Zonen unterteilt werden kann (31, 82):

1. Die *periphere Zone* wird von der Zytoplasmamembran gebildet, die integrierte Proteine enthält, welche unter anderem Rezeptoren für Adhäsionsproteine wie Fibrinogen oder vWF (von-Willebrand-Faktor) darstellen.
2. Die *strukturelle Zone* besteht aus dem Zytoskelett, welches aus Mikrotubuli und anderen Strukturproteinen wie Aktin und Myosin aufgebaut ist und für die Formgebung des Thrombozyten verantwortlich ist.
3. In der *Zone der Organellen* sind drei verschiedene Granula enthalten (Tabelle 1). In den dichten Granula sind ATP, ADP, Kalziumionen und Serotonin vorhanden, die für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten unerlässlich sind. Die überwiegend vorkommenden  $\alpha$ -Granula beinhalten eine Reihe von Proteinen,

welche die Adhäsion und die Aggregation der Thrombozyten fördern, des Weiteren Zytokine, welche inflammatorische Prozesse begünstigen, sowie Wachstumsfaktoren und Koagulationsfaktoren. Die lysosomalen Granula enthalten, ähnlich wie Lysosome anderer Zellen, hydrolytische Enzyme. Die Inhaltsstoffe der Granula werden nach Aktivierung des Thrombozyten in einem von Kalziumionen abhängigen Mechanismus freigesetzt.

4. Die vierte Zone ist *das Membransystem*. Sie besteht aus dem offenen kanalikulären sowie aus dem dichten tubulären System und ist maßgeblich am Thrombozytenmetabolismus und an der Thrombozytenaktivierung beteiligt.

**Tab. 1:** *Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (nach 31)*

Dichte Granula	$\alpha$ -Granula	Lysosome
ATP	<b>Enzyme</b>	$\alpha$ -Arabinside
ADP	$\alpha_1$ -Antitrypsin	$\beta$ -Galactosidase
Ca <sup>2+</sup>	$\alpha_2$ -Makroglobulin	$\beta$ -Glucuronidase
Serotonin		N-Acetylglucosaminidase
Guaninnukleotide	<b>adhäsive Proteine</b>	Kollagenase
	Fibrinogen, Fibronectin	
	Vitronectin	
	von-Willebrand-Faktor	
	Glykoprotein IIb-IIIa	
	<b>Wachstumsfaktoren</b>	
	Platelet-derived growth factor	
	Epidermal growth factor	
	Endothelial growth factor	
	Transforming growth factor	
	<b>zytokinähnliche Proteine</b>	
	Interleukin 1	
	CD40-Ligand (?)	
	Plättchenfaktor 4	
	<b>Koagulationsfaktoren</b>	
	Plasminogen, Fibrinogen	
	Protein S, Faktor V und XI	
	PAI-1	

## 1.2.2 Aktivierung und Sekretion

Die Thrombozytenaktivierung mit Degranulation und Freisetzung der Granulainhaltsstoffe ist ein bedeutender initialer Trigger für die Adhäsion an und Aktivierung von Endothelzellen sowie dem nachfolgenden inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand. Die Aktivierung der Thrombozyten ist ein komplexer Vorgang und läuft in mehreren Schritten ab (31):

1. Veränderung metabolischer Mechanismen mit Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumionen
2. Formveränderung durch Ausbildung von Pseudopodien
3. Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und Veränderung der Membranphospholipidorientierung
4. Sekretion

Kalziumionen spielen bei der Thrombozytenaktivierung eine bedeutende Rolle. Nach Erreichen einer bestimmten Kalziumionenkonzentration werden während der Aktivierung des Thrombozyten die Granulainhaltsstoffe freigesetzt, ein Prozess, der als Sekretion oder Degranulation bezeichnet wird. Zunächst erfolgt die Degranulation der dichten Granula, dann der  $\alpha$ -Granula und zuletzt der Lysosome. Die freigesetzten Stoffe verstärken einerseits den Aktivierungsvorgang und rekrutieren andererseits weitere Thrombozyten aus der Zirkulation, um diese zur Aggregation anzuregen (72). Die  $\alpha$ -Granula setzen unter anderem die proinflammatorischen Faktoren Interleukin-1 und CD40L frei, die durch Veränderung der adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften der Endothelzellen erheblich an der Entzündungsreaktion beteiligt sind (39).

Ruhende Thrombozyten können kein lösliches Fibrinogen binden. Durch das Freilegen der Bindungsstelle für Fibrinogen im Bereich des Glykoprotein (GP) IIb-IIIa-Rezeptors während der Thrombozytenaktivierung kann lösliches, plasmatisches Fibrinogen gebunden werden. Hierdurch kommt es zu der Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Glykoproteinrezeptoren der Thrombozyten (primäre Aggregation) (14, 29, 31). Diese sind zunächst locker miteinander verbunden und werden erst nach Degranulation der Thrombozyten irreversibel miteinander verbunden (sekundäre Aggregation).

## **1.3 Endothel**

### **1.3.1 Morphologie**

Das Endothel ist maßgeblich für die Erhaltung der Struktur und Funktion der Gefäßwand. Es kontrolliert die Gefäßpermeabilität, den Gefäßtonus, die Thrombusbildung sowie die Fibrinolyse und ist an inflammatorischen Prozessen beteiligt (88). Das Endothel kleidet das Gefäßlumen nach innen aus und liegt dem Subendothel auf, mit dem es zusammen die Intima, die innerste Schicht der Gefäßwand, bildet. Die Media besteht aus glatten Muskelzellen und aus der extrazellulären Matrix, die vorwiegend Kollagene vom Typ I und III sowie Fibronectin und Laminin enthält. In der Adventitia befinden sich Fibroblasten, extrazelluläre Matrix sowie Blut- und Lymphgefäße (83). Unter physiologischen Bedingungen bildet das Endothel eine antiadhäsive und antithrombogene Barriere zwischen den zirkulierenden Blutzellen und der Gefäßwand (92). Veränderungen des normalen Endothelzell-Metabolismus können zur Aufhebung der antiadhäsiven Barriere führen und über eine Plättchenadhäsion die Bildung atherosklerotischer Veränderungen einleiten (6, 13).

### **1.3.2 Interaktion von Thrombozyten und Endothel**

Verschiedene Reize können zu einer Aktivierung der Endothelzelle und einer Veränderung ihrer adhäsiven Eigenschaften führen. So kann es einerseits durch eine Gefäßwandläsion oder Funktionsstörung der Endothelzelle zu einer Adhäsion noch ruhender Thrombozyten kommen, andererseits können aktivierte Thrombozyten auch direkt am Endothel adhäreren und zu einer Aktivierung der Endothelzelle führen (8, 28). Die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren spielen hier in zweifacher Hinsicht eine Rolle. Sie sind zum einen an der Bildung endothelschädigender Noxen beteiligt und sind zum anderen ein maßgeblicher Faktor bei der Thrombozytenaktivierung. Der Adhäsionsvorgang von Thrombozyten an die Endothelzelle wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine, welche Bestandteile von Plasma oder extrazellulärer Matrix binden, vermittelt. Thrombozyten weisen etliche membranständige Glykoproteine auf, die nach ihrer

Molekularstruktur in Integrine, Selektine, Rezeptoren vom Immunoglobulintyp und leuzinreiche Glykoproteine unterteilt werden (Tabelle 2) (30, 36). Die initiale Kontaktphase wird durch Interaktion des thrombozytären Glykoproteins (GP) Ib-V-IX mit kollagenimmobilisiertem von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin vermittelt, die beide auf aktivierten Endothelzellen exprimiert werden (29). Der von-Willebrand-Faktor wird von der aktivierten Endothelzelle in das Subendothel sezerniert, wo er Bestandteile der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen, binden und somit den Kontakt zwischen Thrombozyten und Endothel herstellen kann. Über Interaktion der Kollagen- ( $\alpha_2\beta_1$ ), der Fibronektin- ( $\alpha_5\beta_1$ ), der Laminin- ( $\alpha_6\beta_1$ ) und der Vitronektin-Rezeptoren ( $\alpha_V\beta_3$ ) mit den entsprechenden Komponenten der extrazellulären Matrix wird die Thrombozytenadhäsion stabilisiert (28, 29, 30, 31, 36). Zudem vermitteln der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa und, wie in vergangener Zeit zunehmend beschrieben, das GPVI die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel (8, 55, 58).

**Tab. 2: Thrombozytäre Membranglykoproteine (nach 30)**

elektrophoretische Klassifizierung	Klassifizierung	Ligand
<b>leuzinreiche Glykoproteine</b>		
GPIb-V-IX (CD42)		von Willebrand Faktor
<b>Integrine</b>		
GP $\alpha$ V-IIIa (CD51/CD61)	$\alpha_V\beta_3$	Vitronektin
GPIIb-IIIa (CD41/CD61)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin
GPIa-IIa (CD49b/CD29)	$\alpha_2\beta_1$	Kollagen, Laminin
GPIc-IIa (CD49e/CD29)	$\alpha_5\beta_1$	Fibronektin
GPIc'-IIa (CD49f/CD29)	$\alpha_6\beta_1$	Laminin
<b>Selektine</b>		
P-Selektin (CD62P)		PSGL-1, Sialyl Lewis X
<b>Immunoglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren</b>		
ICAM-2 (CD102)		Fibrinogen
PECAM-1 (CD31)		CD31(homophil), GAGs, $\alpha_V\beta_3$ , SHP-2
GPVI (p62)		Kollagen

Der Adhäsionsvorgang verstärkt die Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Formveränderung, Sekretion der Speichergranula, Aggregation von Thrombozyten und Aktivierung der Endothelzelle.

### 1.3.3 Adhäsionsrezeptoren und Sekretionsprodukte

Der Interaktion zwischen aktivierten Endothelzellen und Leukozyten kommt eine entscheidende Bedeutung bei Inflammation und Atherogenese zu. Vermittelt wird die Leukozyten-Endothelinteraktion durch Adhäsionsrezeptoren, Zytokine und Chemokine, die von der Endothelzelle bei Aktivierung exprimiert oder sezerniert werden. Ähnlich wie die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren lassen sich die endothelialen Adhäsionsrezeptoren in mehrere Gruppen einteilen (Tabelle 3) (50).

**Tab. 3: Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsrezeptoren**

Klassifizierung	Expression	Ligand
<b>Rezeptoren vom Immunoglobulintyp</b>		
ICAM-1 (CD54)	Endothelzellen, Monozyten, u.a	LFA-1, Mac-1, CD43
ICAM-2 (CD102)	Endothelzellen, Lymphozyten u.a.	LFA-1
ICAM-3 (CD50)	Leukozyten	LFA-1
VCAM-1 (CD106)	Endothelzellen, Makrophagen u.a	VLA-4
<b>Selektine</b>		
E-Selektin (CD62E)	Endothelzellen	Sialyl-Lewis X
P-Selektin (CD62)	Endothelzellen, Thrombozyten	Sialyl Lewis X
L-Selektin (CD62L)	Lymphozyten, Monozyten	CD34, CD162
<b><math>\beta_2</math>-Integrine</b>		
LFA-1 (CD11a/CD18)	Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile, Makrophagen	ICAM-1,-2,-3
Mac-1 (CD11b/CD18)	Monozyten, Makrophagen u.a.	ICAM-1, Fibrinogen, C3bi

Initial adhären Leukozyten nur lose am Endothel, gefolgt von einer stabilen Leukozytenadhäsion und Transmigration von Leukozyten in das Subendothel. Für die initiale Adhäsion sind Selektine verantwortlich, die nur eine geringe Bindungsaffinität aufweisen und hauptsächlich durch Stimulation der Endothelzelle mit Zytokinen wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) und IL-1 sowie durch Stimulation mit Thrombin exprimiert werden. Dabei wird das P-Selektin, welches in der Endothelzelle gespeichert wird, bei Aktivierung rasch auf der Oberfläche exprimiert, während das E-Selektin erst durch Neusynthese von der aktivierten Endothelzelle gebildet wird (88).

Die darauffolgende stabile Adhäsion wird durch Adhäsionsrezeptoren vom Immunoglobulintyp vermittelt. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei das ICAM-1, welches Ligand für LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen-1“) und Mac-1, zwei auf allen Arten von Leukozyten vorhandenen  $\beta_2$ -Integrinen, ist. ICAM-1 kommt nicht nur in Endothelzellen vor, sondern ist auch in anderen Zellen wie Fibroblasten, Monozyten, Lymphozyten und Epithelzellen zu finden. Es wird in geringem Maße konstitutiv auf der Endothelzelloberfläche exprimiert und kann durch Stimulation mit Zytokinen wie dem IL-1 $\beta$  erheblich gesteigert werden (94). Die durch die Aktivatoren initiierte Expression von ICAM-1 wird vornehmlich auf transkriptioneller Ebene reguliert. Bisher konnten verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem NF- $\kappa$ B („nuclear factor- $\kappa$ B“), Ap-1 und Sp-1, im ICAM-1-Gen beschrieben werden (94). Neben dem ICAM-1 sind auch das VCAM-1 und PECAM-1 („platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“) an dem Adhäsionsvorgang von Leukozyten an das Endothel beteiligt (11, 42, 60).

Eines der für die Chemotaxis und Transmigration von Leukozyten bedeutendsten Chemokine ist das MCP-1. Chemokine stellen eine Gruppe von proinflammatorischen, chemotaktischen Zytokinen dar, die aufgrund der Anordnung von Zysteinmotiven in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Während die Gruppe der C-x-C-Chemokine, zu denen Interleukin-8 oder Plättchenfaktor-4 zählen, vorwiegend Neutrophile anziehen, wirken C-C-Chemokine wie MCP-1 oder RANTES („regulated on activation normal T cell expressed and secreted“) vor allem auf Monozyten chemotaktisch. MCP-1 wird in Endothelzellen, Monozyten, glatten Muskelzellen und Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener Aktivatoren wie IL-1 gebildet (73, 81). Untersuchungen zeigen, dass die Expression von

MCP-1 sowohl spezifisch für den Stimulus als auch spezifisch für das Gewebe bzw. die Zelle ist. Die Transkription von MCP-1 wird unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und Sp-1 reguliert. Für NF- $\kappa$ B sind zwei Bindungsstellen (A1 und A2) in der distalen „enhancer“-Region (bp -2640/-2632 bis -2612/-2603) beschrieben, die vorwiegend für die induzierte Aktivität benötigt wird. Die Bindungsstelle für Sp-1 (GC box) ist in der proximalen „promoter“-Region (bp -64/- 59) lokalisiert und scheint für die basale Aktivität von Bedeutung zu sein (90, 91). Auch eine Beteiligung der MKK6/p38-MAP-Kinase bei der Regulation der Genexpression von MCP-1 wird beschrieben (33, 77).

#### **1.4 Signalwege bei der endothelialen Bildung von MCP-1 und ICAM-1**

Die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zytoplasma und schließlich in den Zellkern zum Ort der Genexpression wird durch ein Netzwerk miteinander interagierender Signalwege vermittelt. Bei diesen Prozessen werden häufig Proteinkinasen aktiviert, die Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und die Expression von Genen induzieren.

Innerhalb der Proteinkinasen hat die Familie der MAP-Kinasen (Mitogen-Aktiviert-Protein-Kinasen) besonderes Interesse geweckt. Die MAP-Kinasen regulieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und sind für die Induktion einer Vielzahl transmembraner Signale für Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod verantwortlich (35, 78, 80). MAP-Kinasen sind eine in vielen Zellen vorhandene Gruppe von Prolin-gesteuerten Kinasen, denen die Phosphorylierung eines Serin- und/oder Threonin-Prolin-Motives ihrer Substrate gemeinsam ist. Sie stehen am Ende einer ganzen Kaskade von aufeinanderfolgenden Proteinkinasen. Die Kaskaden setzen sich aus drei sequentiell hintereinandergeschalteten Proteinkinasen zusammen. Am Anfang der Kaskade steht eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MEKK), die eine weitere MAP-Kinase-Kinase (MEK) durch Phosphorylierung aktiviert. Durch die spezifische Phosphorylierung sowohl von Threonin als auch Tyrosin innerhalb eines in allen MAP-Kinasen vorkommenden Threonin-X-Tyrosin Motives (X bedeutet eine beliebige Aminosäure) vermag die MAP-Kinase-Kinase die in der

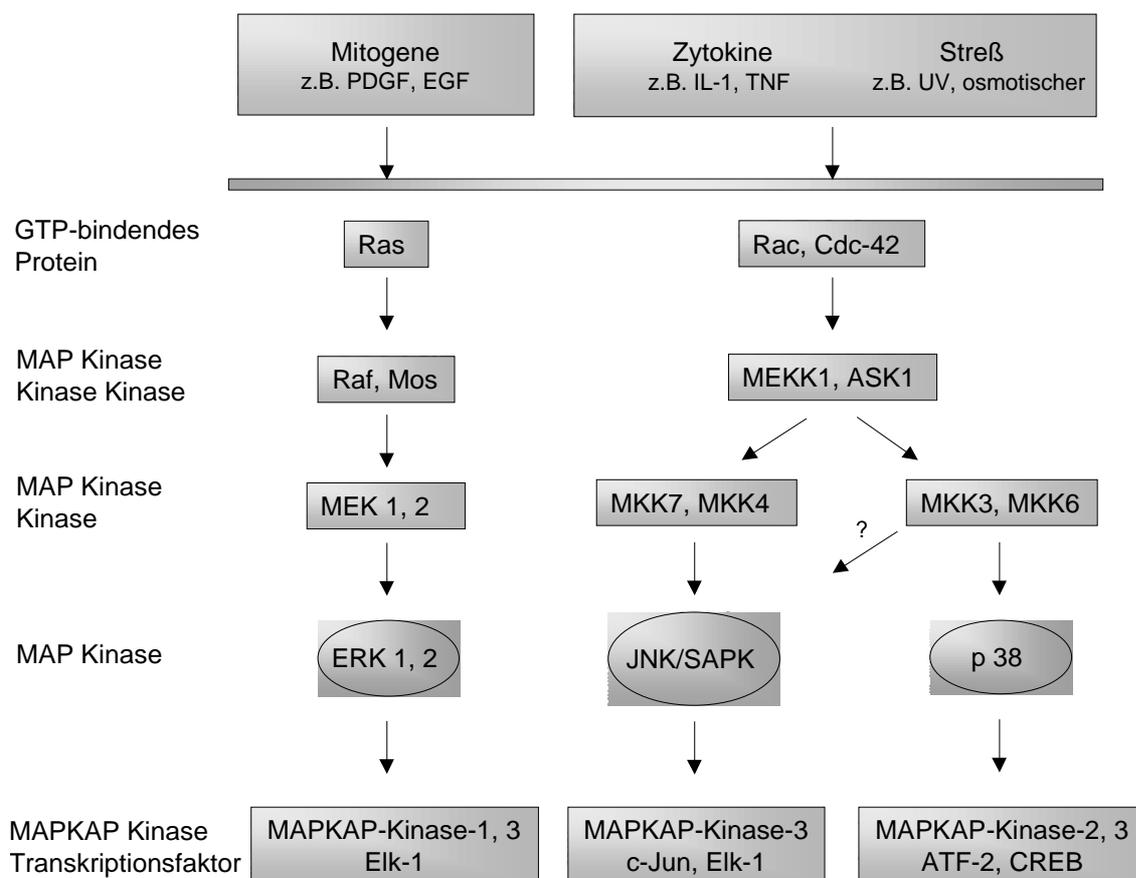
Kaskade folgende MAP-Kinase zu aktivieren (15, 20, 79). In den letzten Jahren sind im wesentlichen drei MAP-Kinasen beschrieben worden (44):

1. „extracellular signal-regulated MAP-kinase“ (ERK/MAP-Kinase)
2. „c-jun N terminal-kinase“/ „stress-activated protein-kinase“ (JNK/SAPK)
3. p38 MAP-Kinase

Es sind eine Reihe von Mechanismen bekannt, die die Spezifität der verschiedenen MAP-Kinasen gewährleisten und ein Überlappen der Signalwege verhindern (96). Die ERK/MAP-Kinase, bestehend aus den zwei Isoformen ERK1 und ERK2, sind ausschließlich bei durch Mitogene (z.B. Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF) vermittelten Signalwegen beteiligt. ERK/MAP-Kinasen werden durch Aktivierung flussaufwärts gelegener Kinasen aktiviert und regulieren Transkriptionsfaktoren, welche bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Während es detaillierte Informationen über die durch ERK/MAP-Kinase-induzierte zelluläre Antwort gibt, sind die am Ende der p38-MAP-Kinase und JNK/SAPK stehenden Reaktionen noch weitgehend ungeklärt. JNK/SAPK und die p38-MAP-Kinase werden vorwiegend durch inflammatorische Zytokine und zellulären Stress stimuliert und sind bei Apoptose und protektiven Mechanismen involviert (45).

Die MAP-Kinase p38 ist insbesondere an der Regulation von inflammatorischen Prozessen beteiligt. Unter anderem ist eine Beteiligung bei der Zytokin-vermittelten Expression von TNF, IL-1, IL-6 und GM-CSF („granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor“) sowie VCAM-1 und MCP-1 in verschiedenen Zellen beschrieben (3, 5, 17, 22, 46, 67, 77). Neben Zytokinen wie IL-1 und TNF sind auch diverse andere Stimuli wie physikochemischer Stress, z.B. Hyperosmolarität und UV-Licht sowie Endotoxine als Induktoren der p38-Kinase (20, 43, 52, 70) bekannt. Der p38-Kinasesignalweg ist dabei stimulus- und zellspezifisch. Aufgrund ihrer Eigenschaft, spezifische Inhibitoren von Zytokinen, die CSAID („cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs“), zu binden, wird die p38-MAP-Kinase auch als CSAID-bindendes-Protein (CSBP) bezeichnet. Es sind mehrere Isoformen der p38-Kinase bekannt (p38  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$  und  $\delta$ ) (20). Durch zweifache Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin in der Sequenz Thr<sup>180</sup>-Gly-Tyr<sup>182</sup> innerhalb einer bestimmten Kinase-Untereinheit durch die MAP-Kinase-Kinasen MKK3, MKK4 und MKK6 wird p38 aktiviert (20, 70). Die MAP-Kinase-Kinasen werden durch die höherliegenden

MAP-Kinase-Kinase-Kinasen aktiviert, wobei eine Beteiligung von ASK-1, TAK-1 und MLK-3 postuliert wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass p38 durch Phosphorylierung etliche Transkriptionsfaktoren (CREB, ATF1, ATF2, CHOP, MEF-2C) oder weitere Proteinkinasen (Mapkap-2, Mapkap-3 und Mnk1/2), welche die Genexpression steuern, zu aktivieren vermag (15, 20, 61, 79, 80). Durch diese Kaskade verschiedener sequentiell hintereinandergeschalteter Proteinkinasen wird eine Amplifizierung und Spezifizierung der Signalübertragung in den Zellkern gewährleistet.



**Abb. 1: Die drei MAP-Kinase-Kaskaden**

*Durch eine Kaskade von sequentiell hintereinandergeschalteten Kinasen regulieren die MAP-Kinasen Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen, die für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose verantwortlich sind. Im Wesentlichen sind drei MAP-Kinase-Kaskaden beschrieben. Zu diesen zählen der ERK/MAP-Kinase-Signalweg, der vorwiegend durch Mitogene aktiviert wird, sowie der p38-MAP-Kinase-Signalweg und der JNK/SAPK-Signalweg, die beide durch Stress und Zytokine aktiviert werden.*

Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel Familie kommen in nahezu allen Zellen vor und regulieren zahlreiche Gene, die an Inflammation, Immunreaktionen und Zellwachstum beteiligt sind. Charakteristischerweise setzen sich die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie aus zwei Untereinheiten zusammen und bilden somit Homo- oder Heterodimere (16, 85). Am häufigsten findet man den NF- $\kappa$ B-Komplex aus den Untereinheiten p50 (p105) und p65 zusammengesetzt. Anders als die meisten Transkriptions-Aktivatoren ruht NF- $\kappa$ B im Zytoplasma, wo es sich an Inhibitoren (I $\kappa$ B- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\epsilon$ , Bcl-3 sowie p105 (I $\kappa$ B- $\gamma$ ) und p100 (I $\kappa$ B- $\delta$ )) gebunden im inaktiven Zustand befindet. Eine Vielfalt von Substanzen, unter anderem Zytokine, führen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B (85). Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung und Ubiquitin-Konjugierung von I $\kappa$ B, gefolgt von der Dissoziation des Inhibitors und der Translokation des nun aktivierten NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Im Zellkern interagiert das NF- $\kappa$ B-Dimer mit  $\kappa$ B-Elementen in „promoter“- und „enhancer“-Regionen und kontrolliert somit die Transkription der entsprechenden Gene. Es sind eine Reihe von NF- $\kappa$ B-regulierten Genprodukten beschrieben, die maßgeblich bei der Atherogenese eine Rolle spielen. Insbesondere wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als ein wesentlicher Signaltransduktor bei der Thrombozyten-vermittelten Genexpression von MCP-1 und ICAM-1 in Endothelzellen, einem bedeutenden Prozess in der frühen Atherogenese, beschrieben (2, 9, 16, 29, 88).

## **1.5 Zielsetzung**

Obwohl ursprünglich nur an Stellen durchbrochener Gefäßwandintegrität vermutet, wurde inzwischen gezeigt, dass Thrombozyten im aktivierten Zustand auch an intaktes Endothel zu adhären vermögen (8, 28). Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel und der darauffolgenden inflammatorischen Antwort könnte ein wesentlicher Mechanismus in der frühen Atherogenese darstellen. Bei Aktivierung setzen Thrombozyten aus ihren Granula eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren, z.B. Wachstumsfaktoren und Cytokine frei. Von besonderer Bedeutung sind hierbei das Zytokin IL-1 $\beta$  und der Rezeptor CD40L, welche zur Aktivierung der Endothelzellen führen und die Transkription

einer Reihe inflammatorischer Gene, unter anderem MCP-1, induzieren. MCP-1 gehört zu der Gruppe der Chemokine und zieht Monozyten an den Ort der Inflammation. Die Chemotaxis und Transmigration von zirkulierenden Monozyten durch die Endothelzellschicht ist wesentliche Voraussetzung für die Transformation der Monozyten in Makrophagen, welches als bedeutender Schritt in der frühen Atherogenese eingebunden ist. Die Mechanismen, welche an der Thrombozyten-induzierten Expression von MCP-1 in Endothelzellen beteiligt sind, wurden bisher nur unzureichend untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung der Thrombozytenadhäsion auf die Transkription von MCP-1 in Endothelzellen zu eruieren und hierbei beteiligte Signalwege zu charakterisieren. Im einzelnen sollen die folgenden Punkte in der Arbeit untersucht werden:

1. Aktivierte Thrombozyten vermögen an intaktem Endothel zu adhären und über eine Aktivierung der Endothelzelle die Expression von MCP-1 und ICAM-1 mit konsekutiver Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten einzuleiten. Innerhalb welcher Zeitspanne es zu einer relevanten, Thrombozyten-vermittelten Aktivierung der Endothelzelle und Generierung atherosklerotischer Prozesse kommt, ist letztlich nicht klar. Unter anderem soll in dieser Arbeit daher der zeitliche Verlauf der Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen hinsichtlich der Bildung von ICAM-1 und MCP-1 auch auf funktioneller Ebene beleuchtet werden.
2. Endothelzellen bilden das Chemokin MCP-1 unter dem Einfluss extrazellulärer Stimuli, wie z.B. Zytokine. Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) sind wichtige Mediatoren Zytokin-vermittelter Genaktivierung. Diese Arbeit untersucht den Einfluss verschiedener Proteinkinasen auf die Thrombozyten-induzierte Expression von MCP-1 sowie die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten.
3. Insbesondere will diese Arbeit die Bedeutung der p38-MAP-Kinase als Signalweg innerhalb der Thrombozyten-induzierten Gen- und Proteinexpression von MCP-1 und folglich der Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten sondieren und die Stellung der p38-MAP-Kinase in der Atherogenese begründen.

## 2 Methoden

### 2.1 Reagenzien und Antikörper

Das Zellkulturmedium M199, fötales Kälberserum (FCS), Glutamin, Penizillin, Streptomycin, PBS („phosphat-buffered saline“), EDTA (Ethylen-Diamin-tetra-Azetat) und Trypsin-EDTA wurden von der Firma Sigma bezogen. Das Wachstumsmedium für die Endothelzellen wurde bei PromoCell, das Zellkulturmedium RPMI 1640 bei der Firma GIBCO bestellt. Für das Zellwachstum wurden Zellkulturflaschen und Mikrotiterplatten über die Firma Greiner erworben, für die Migrationsversuche wurden Mikrotiterplatten und Einsätze der Firma Falcon verwendet.

Für die Stimulation der Endothelzellen wurde das rekombinante humane Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) von der Firma Calbiochem, die Reagenzien Natriumzitat, Zitronensäure, Glucose, Natriumchlorid, Natriumbikarbonat, Kaliumchlorid, Rinderserumalbumin (BSA), HEPES, Salzsäure und  $\alpha$ -Thrombin von der Firma Sigma, sowie Hirudin von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Die Kinaseinhibitoren SB203580, PD98059, Wortmannin und Rapamycin wurden von New England BioLabs, Dimethylsulfoxid (DMSO) von der Firma Sigma erworben. Glycerin, Glycin, Tween 20, Mercaptoethanol, Triton X-100, Paraformaldehyd, Methanol, Natrium-tetra-Pyrophosphat, Natriumfluorid, Natrium-ortho-Vanadat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Aprotinin wurden bei der Firma Sigma bestellt, Sodiumdodezylsulfat (SDS) und Polyacrylamid bei der Firma BioRad. Das Klenowfragment der DNA-Polymerase, sowie Deoxynukleosid-Triphosphate wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP von NEN Life Science Products.

Für den Kinaseassay wurde der polyklonale Antikörper anti-p38-MAP-Kinase, der sowohl die nichtphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form der p38-MAP-Kinase erkennt und das Substrat ATF-2 („activating transcription factor-2“), alle von der Firma Santa Cruz, verwendet. Der sekundäre peroxidasekonjugierte anti-Ziege IgG für den Immunoblot wurde von der Firma Dianova bezogen. Der FITC-markierte Antikörper anti-ICAM-1 (CD54) wurde bei der Firma Immunotech, LDS-751 wurde bei der Firma Exciton, Inc. bestellt, der

polyklonale Antikörper anti-MCP-1 von der Firma Biermann. Für weitere Bestimmungen von MCP-1 wurde ein ELISA der Firma R&D Systems verwendet. Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz SuperFect® der Firma Quiagen durchgeführt. Die p38-dominant-negativen Plasmide pCDN-CSBP2 (D168A) und pCDN-CSBP2 (T180E, Y182E) sowie der Vektor pCDN wurden von Smith Kline zur Verfügung gestellt. Für den Luziferaseassay wurde das Reporterkonstrukt pGLneo-MCP-1 freundlicherweise von Dr. Teizo Yoshimura (NIH Frederick, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Immunofluoreszenzmikroskopie wurden der Antikörper anti-p38 und der phosphospezifische Antikörper anti-Phospho-p38 eingesetzt.

In einigen Versuchen wurden die Kinaseinhibitoren SB203580 (10 µg/ml), PD98059 (10 µg/ml), Wortmannin (100 nM) oder Rapamycin (20 ng/ml) verwendet. Der Kinaseinhibitor SB203580 gehört zu der Gruppe der bityklischen Pyridin-Imidazole und inhibiert spezifisch die Aktivität der p38-MAP-Kinase (18, 20, 49). PD98059 hemmt spezifisch die ERK1- und ERK2-MAP-Kinase durch Blockierung der flussaufwärts gelegenen MEK1 und MEK2. Wortmannin hemmt die PI3-Kinase und somit die Phosphorylierung der p70S6-Kinase, während Rapamycin ein Inhibitor der p60S6-Kinase ist.

Um eine Kontamination der Zellen oder Reagenzien mit Endotoxinen auszuschließen, wurden die Zellkulturüberstände am Ende eines Experimentes mit dem „chromogenic limulus amoebocyte“ Lysatassay der Firma Schulz getestet.

## **2.2 Zelllinien**

Primäre Endothelzellkulturen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden durch Kollagenasebehandlung von Nabelschnurvenen nach der Methode von Jaffe gewonnen (26, 27). Hierfür wurden Nabelschnurvenen für zehn Minuten bei 37°C mit Kollagenase (50 µg/ml) verdaut und die abgelösten Endothelzellen nach dreimaligem Waschen in komplettem Zellkulturmedium (M199, Sigma) für acht Minuten bei 400g zentrifugiert. So gewonnene Zellen aus drei bis sechs Nabelschnurvenen wurden zusammengegeben und in Wachstumsmedium für Endothelzellen, dem 2% FCS, 1 µg/ml Hydrokortison, 0,1 µg/ml

Epidermalem Wachstumsfaktor, 1.0 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor, 50 µg/ml Gentamycin, 2.5 µg/ml Amphotericin B (alle von PromoCell) beigegeben waren, in Zellkulturflaschen angezüchtet. Jeden zweiten Tag wurden die Endothelzellen anhand ihrer charakteristischen Morphologie (Pflastersteinrelief), ihrer Adhärenz, Konfluenz und Kontaminationsfreiheit beurteilt und das Zellkulturmedium gewechselt. Bei Konfluenz wurden die Endothelzellen mit Trypsin (1 U/ml) und EDTA (0,5 mmol/L) abgelöst und im Verhältnis eins zu zwei verdünnt in Zellkulturflaschen angezüchtet. Nach zwei bis vier Passagen wurden die Zellen als konfluente Monolayers für Experimente verwendet.

Die immortale endotheliale Zelllinie ECV-304 (American Tissue Culture Collection), wurde in komplettem Zellkulturmedium M199 unter Zugabe von 10% FCS, 2 mmol/l Glutamin, 100 mg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage auf Morphologie, Adhärenz, Konfluenz und Kontaminationsfreiheit überprüft und ein Medienwechsel durchgeführt. Konfluierende Zellen wurden mit Trypsin (1 U/ml) und EDTA (0,5 mmol/L) abgelöst und verdünnt in Zellkulturflaschen weiterkultiviert oder in Napfplatten für die Versuche angezüchtet.

Die menschliche Myelo-Monozyten-Zelllinie HL60 (German collection of Microorganisms and Cell Cultures) wurde in RPMI 1640 unter Zusatz von 10% FCS, 1% Natriumpyruvat, 1mM L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin (GIBCO) in Zellkulturflaschen kultiviert.

### **2.3 Plättchenisolation**

Humane Plättchen wurden aus 20 ml Vollblut von gesunden, nicht-rauchenden Probanden, welche keine Medikamente mit Einfluss auf die Plättchenfunktion einnahmen, aus der Kubitalvene gewonnen (26, 27). Das Blut wurde sofort mit ACD- (Acid-Citrat Dextran) Lösung (85 mmol/l Natriumzitat, 70 mmol/l Zitronensäure, 110 mmol/l Glucose) im Verhältnis eins zu fünf antikoaguliert. Nach Zentrifugation bei 160g für 20 Minuten wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes des plättchenreichen Plasmas (PRP) abpipettiert, mit Tyrodes Puffer pH 6,5 (150 mmol/l Natriumchlorid, 12 mmol/l

Natriumhydrogenkarbonat, 2.5 mmol/l Kaliumchlorid 1 mmol/l Magnesiumchlorid, 1mg/ml BSA, 5.5 mmol/l Glukose) im Verhältnis eins zu eins verdünnt und bei 650g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die sedimentierten Plättchen vorsichtig mit 500 µl Tyrodes Puffer pH 6.5 resuspendiert und mit 500 µl Tyrodes Puffer pH 7.4 verdünnt. Die Plättchenzahl wurde im Zellzählgerät (Sysmex) quantifiziert. Durch Verdünnung der gewonnenen Plättchen mit Tyrodes pH 7.4 wurde eine Plättchenzahl von  $4 \times 10^8$ /ml erreicht. Die Plättchen wurden 20 Minuten mit 2 U/ml  $\alpha$ -Thrombin vorstimuliert und anschließend mit 5 U/ml Hirudin antagonisiert, um eine direkte Wirkung des  $\alpha$ -Thrombin auf die Endothelzellen ausschließen zu können.

#### **2.4 Koinkubation von Endothelzellen und Plättchen**

Für die meisten Experimente wurden 24-Napf-Mikrotiterplatten mit Endothelzellen beschichtet und nach Inkubation als konfluente Monolayers verwendet. Nach einem einmaligen Waschschrift mit Kompletmedium wurde zunächst ein Volumen von 250 µl komplettes Zellkulturmedium zu jedem Well gegeben. Die Stimulation erfolgte danach entweder durch Zugabe von 250 µl der Suspension mit den  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen (endgültige Plättchenzahl  $2 \times 10^8$ /ml) oder nach Zugabe von 250 µl Tyrodes pH 7,4 mit rhIL-1 $\beta$  (Endkonzentration 100 pg/ml). Die Inkubation erfolgte in Anwesenheit von 1 mmol/l Kalziumchlorid für die jeweils vorgesehene Stimulations-Zeitdauer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.5 Adhäsion und Chemotaxis von Monozyten**

Für den Adhäsionsassay wurden primäre Endothelzellen (HUVEC) in 24-Napf-Mikrotiterplatten 24 Stunden vor dem Experiment ausgelegt. Die Endothelzellen wurden für die jeweils vorgesehene Zeit mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit 100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  stimuliert. Anschließend wurden die aktivierten Endothelzellen (HUVEC)

mehrmals vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 Minuten ohne Aktivatoren wurden die zuvor zweimal in Adhäsionsmedium (serumfreies RPMI 1640, 25 mM HEPES) gewaschenen Myelo-Monozytenzellen (HL60) ( $2 \times 10^6$ /ml) zu den Endothelzellmonolayern gegeben. Nach fünf Stunden Koinkubation mit den HL60 Zellen wurden die Endothelzellen (HUVEC) vorsichtig gewaschen, um nichtadhärente Monozyten zu beseitigen. Die Monozytenadhäsion wurde am Lichtmikroskop durch Auszählen in 10x „high power fields“ quantifiziert. In einigen Experimenten wurden die Endothelzellmonolayer vor der Stimulation für 60 Minuten mit den Kinaseinhibitoren SB203580 (10 µg/ml) und PD98059 (10 µg/ml) vorinkubiert.

Um den Effekt der Plättchen-induzierten Aktivierung von Endothelzellen auf die Chemotaxis von Monozyten zu untersuchen, wurden Mikrotiterplatteneinsätze (8.0 µm Porengröße) wie beschrieben (59) verwendet. Zuvor wurden die in 24-Napf-Mikrotiterplatten kultivierten Endothelzellen 60 Minuten mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit 100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  stimuliert. Nach mehrmaligem vorsichtigem Waschen mit PBS wurden die Endothelzellen ohne Aktivatoren für weitere 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Einsätze in die Mikrotiterplatten eingelegt und HL60 Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) auf die Membranoberfläche der Einsätze gebracht. Somit wurde eine physikalische Trennung der Monozyten von den Endothelzellen erreicht. Nach einer Inkubation von fünf Stunden wurde die Chemotaxis durch Auszählen der Monozyten auf dem Endothelzellmonolayer wie oben beschrieben im Lichtmikroskop quantifiziert. In einigen Experimenten wurden die Endothelzell vor der Stimulation 60 Minuten mit den Kinaseinhibitoren SB203580 (10 µg/ml) und PD98059 (10 µg/ml) vorinkubiert.

## **2.6 MCP-1-Bestimmung im ELISA**

Bei einigen Versuchen war die Bestimmung des Proteins MCP-1 vorgesehen. In dem Experiment zum Zeitverlauf der Bildung von MCP-1 wurden HUVEC für die vorgesehene Zeit mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit 100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  stimuliert und anschließend bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden mit Medium inkubiert. Der

Überstand von den stimulierten oder unstimulierten Endothelzellen wurde abgenommen und für zehn Minuten bei 1000g zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt.

In einem weiteren Experiment wurden HUVEC mit den Kinaseinhibitoren SB203580, PD98059, Rapamycin oder Wortmannin für sechzig Minuten vorinkubiert und anschließend mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit 100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  für weitere sechzig Minuten stimuliert. Nach einer darauffolgenden vierstündigen Inkubation mit Medium wurde der Überstand abgenommen, bei 1000g zentrifugiert und bei -70°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentrationen des MCP-1 wurden mittels eines ELISA (Quantikine Kit<sup>®</sup> R&D-Systems) gemessen. Das Detektionslimit lag bei 5 pg/ml.

## **2.7 Durchflusszytometrie**

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von ICAM-1 im Zeitverlauf wurden primäre Endothelzellen (HUVEC) zeitlich gestaffelt mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit 100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  stimuliert und bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden mit Medium inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die HUVEC mit 50  $\mu$ g/ml des FITC-markierten Antikörpers anti-ICAM-1 (CD54-FITC) für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem DNA-Farbstoff LDS-751 (10  $\mu$ g/ml) ebenfalls für 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss sowie eine Fixierung mit 2% Paraformaldehyd (27). Als unspezifische Kontrolle wurde ein irrelevanter FITC-markierter Antikörper verwendet. Die Endothelzellen wurden anhand ihrer Verteilung im Vorwärtsstreulicht und der LDS-Fluoreszenz identifiziert.

Die Durchflusszytometrie wurde auch für die Bestimmung des MCP-1 nach der Transfektion von HUVEC mit den dominant-negativen Plasmiden CSBP2 (D168A), CSBP2 (T180E, Y182E) bzw. dem Kontrollplasmid pCDN benutzt. Die Transfektion mit diesen Plasmiden wird in einem folgenden Kapitel erläutert werden. Nach der Transfektion wurden die Endothelzellen für 60 Minuten mit  $2 \times 10^8$ /ml  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit

100 pg/ml rhIL-1 $\beta$  stimuliert und weitere vier Stunden ohne Aktivatoren inkubiert. Danach wurden die HUVEC mit dem polyklonalen Antikörper anti-MCP-1 für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert, anschließend für weitere 20 Minuten mit dem Farbstoff LDS-751 gefärbt und in 4% Paraformaldehyd fixiert.

## **2.8 p38-MAP-Kinaseassay und Immunoblot**

6-Napf-Mikrotiterplatten wurden mit HUVEC bis zum Erreichen eines konfluierenden Monolayers beschichtet. Nach Stimulation für die vorgesehene Zeit mit rhIL-1 $\beta$  oder  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen wurden die HUVEC in kaltem PBS einmal gewaschen und zehn Minuten bei 4°C mit einem Lyse-Puffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 10 mM Natrium-Pyrophosphat, 10 mM Natriumfluorid, 1 mM Natrium-ortho-Vanadat, 1mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml Aprotinin) inkubiert. Nach Ablösen wurde der so gewonnene zytosolische Extrakt für zehn Minuten bei 8000g zentrifugiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand wurden gleiche Proteinmengen mit 30  $\mu$ l A-Agarose und 0,5  $\mu$ g/ml polyklonalem Antikörper anti-p38-MAP-Kinase drei Stunden bei 4°C inkubiert. Es folgten ein Waschschriff der Proben mit Puffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerin, 10 mM Pyrophosphat) sowie ein Waschschriff mit Puffer B (20 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M Natrium-ortho-Vanadat, 1 mM DDT). Um die Kinasereaktion zu verfolgen, wurde danach jede Probe mit 40  $\mu$ l Puffer B in Anwesenheit von 2  $\mu$ g des p38-Kinasesubstrates ATF-2, 50  $\mu$ M unmarkiertem ATP und 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lämmli-Puffer (65 mM Tris/HCl, 3% SDS, 30% Glycerin, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol) unterbrochen und das phosphorylierte ATF-2 nach Auftrennung in 12.5% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Autoradiographie dargestellt.

Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen des p38-Kinaseproteins aufgetragen worden sind, wurde ein Immunoblot wie beschrieben (53) durchgeführt. Nach Auftrennung in 12% SDS-PAGE wurden die aus dem zytosolischen Extrakt gewonnenen Proteine im Wet-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Papier übertragen. Der Proteintransfer wurde nachfolgend mit

5% nichtfetter Milch, TBS, 0,5% Tween 20 geblockt und mit dem Antikörper anti-p38-MAPK über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift (1% nichtfette Milch, PBS, 0,5% Tween 20) wurden die Proteine mit einem zweiten „horseradish“ Peroxidase-konjugiertem anti-Ziege IgG inkubiert und die Antikörperbindung im Röntgenfilm unter Verwendung des Immunoblot Chemiluminescent Reagent Plus<sup>®</sup> dargestellt.

## **2.9 Transfektion und Luziferaseassay**

Für die Bestimmung der MCP-1-Promoteraktivität wurde eine Reporteranalyse durchgeführt, bei der die Transkription von „firefly“-Luziferase unter Kontrolle des MCP-1-„promoters“ stand. Hierfür wurde das Reporterplasmid pGLneo-MCP-1, welches die proximale „promoter“-Region und die distale „enhancer“-Region des humanen MCP-1-Genes enthält, verwendet. Das Reporterplasmid pGLneo-MCP-1 wurde zwei Stunden lang zusammen mit dem Renilla-Luziferase-kodierenden Kontrollplasmid (pRL-TK, Promega) und den p38-dominant-negativen Plasmiden kotransfiziert. Anschließend wurden die HUVEC, wie oben beschrieben, nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit rhIL-1 $\beta$ - oder  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen für die vorgegebene Zeit stimuliert und nach Absaugen des Überstandes mit „passive lysis buffer“ (Promega) 15 Minuten lang bei Raumtemperatur lysiert. Die Luziferaseaktivität der Zelllysate wurde mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup>-Reporterassay (Promega) gemessen.

Um den Einfluss von dominant-negativen p38-Konstrukten auf die Endothelzellen zu untersuchen, wurden Primäre Endothelzellen (HUVEC) in 24-Napfplatten mit den dominant-negativen p38-Konstrukten pCDN-CSBP2 (D168A) und pCDN-CSBP2 (T180E, Y182E) transfiziert. Bei den dominant-negativen Plasmiden waren an der Stelle 168 bzw. an den Stellen 180 und 182 jeweils eine Aminosäure ausgetauscht und die Plasmide mit einem Flag-Epitop gekennzeichnet. Als Kontrollplasmid diente der Vektor pCDN. Für die transiente Transfektion wurden subkonfluente Endothelzellen in 24-Napfplatten mit 2  $\mu$ g DNA und einem polykationischen Transfektionsreagenz (Superfect<sup>®</sup>, Quiagen) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die HUVEC mit rhIL-1 $\beta$ - oder  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten

Plättchen für sechzig Minuten stimuliert. Die transgene p38-Proteinexpression wurde im Immunoblot unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers anti-p38-MAP-Kinase (Stratagene, Klon C2), welcher sowohl die nicht- als auch die phosphorylierte Form des p38 erkennt, und des monoklonalen anti-flag-Antikörpers untersucht.

Um die Wirkung der Negativmutanten auf die MCP-1-Bildung zu untersuchen, wurden HUVEC für 24 Stunden mit den CSBP2-Plasmiden oder dem Kontrollvektor pCDN transfiziert und anschließend 60 Minuten mit aktivierten Thrombozyten stimuliert. Nach weiterer vierstündiger Inkubation in Medium erfolgte für 20 Minuten die Färbung der HUVEC mit dem polyklonalen Antikörper anti-MCP-1. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend die MCP-1-Bildung bestimmt.

## **2.10 Immunofluoreszenzmikroskopie**

Primäre Endothelzellen (HUVEC) wurden auf Deckgläsern, die mit 5 µg/ml Vitronectin bedeckt waren, bei 4°C über Nacht kultiviert und anschließend eine Stunde mit 5% BSA in PBS bei Raumtemperatur geblockt. Stimulierte und unstimulierte HUVEC wurden mit 2% Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur 30 Minuten fixiert und zweimal mit 2% Glyzin in PBS gewaschen. Danach wurden die HUVEC mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert und 60 Minuten lang mit dem polyklonalen Antikörper anti-p38-MAP-Kinase oder mit dem phosphospezifischen Antikörper anti-Phospho-p38-MAP-Kinase gefärbt.

## **2.11 Statistische Analyse**

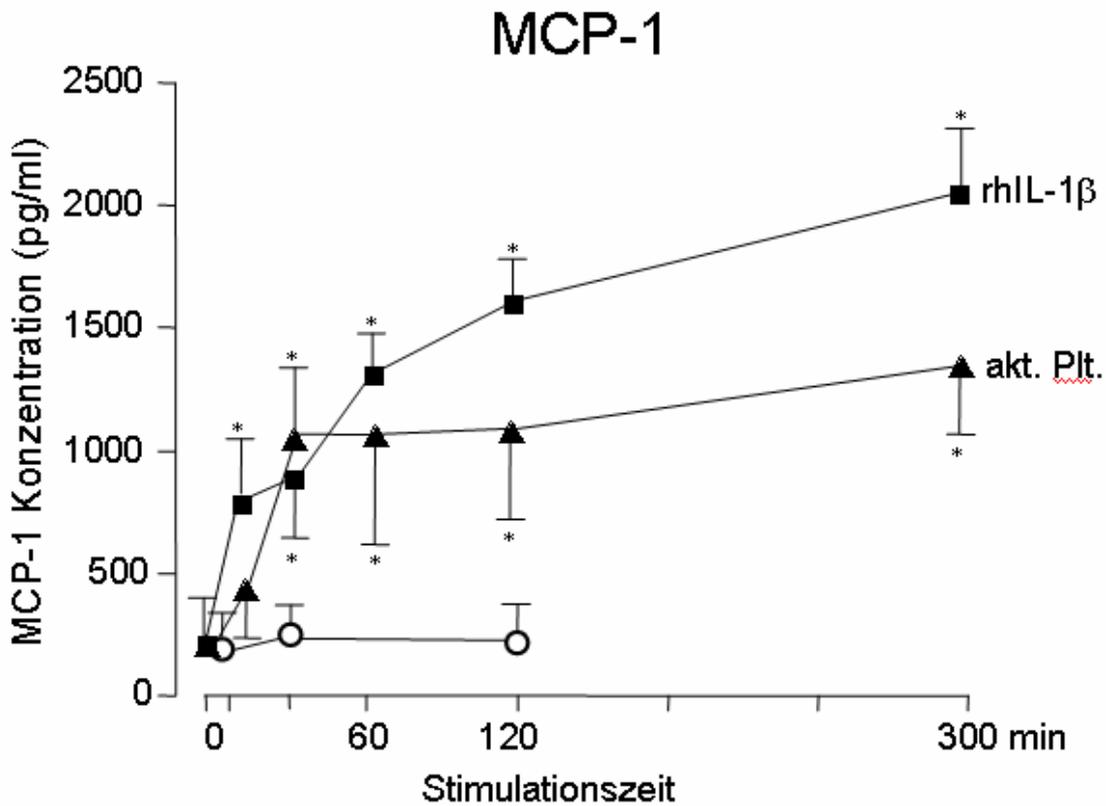
Für die statistische Analyse wurde der Student-t-Test für normalverteilte Werte durchgeführt. Ein Wert  $p < 0,01$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Einfluss von aktivierten Plättchen auf Endothelzellen**

##### **3.1.1 Plättchen-induzierte Sekretion von endotheliale MCP-1 im Zeitverlauf**

Für die Bestimmung Plättchen-induzierter MCP-1-Sekretion durch Endothelzellen wurden konfluente Monolayer von Primären Endothelzellen (HUVEC) für 10, 30, 60, 120 oder 300 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) koinkubiert. Zur Kontrolle wurden Endothelzellen mit dem rekombinanten humanen Zytokin Interleukin- $1\beta$  (rhIL- $1\beta$ ) (100 pg/ml) nach dem gleichen Zeitschema koinkubiert. IL- $1\beta$  ist ein hochwirksames, inflammatorisches Zytokin, welches durch eine Vielzahl von Zellen produziert wird und zahlreiche biologische Effekte ausübt. Es spielt dabei unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Atherogenese und ist ein Aktivator der MCP-1-Bildung in Endothelzellen (68). In Bereichen atherosklerotischer Plaques zeigen sich erhöhte Mengen von MCP-1 vorwiegend in Endothelzellen und subendothelialen Makrophagen (84). Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit wurden die Plättchen oder das rhIL- $1\beta$  durch Medium ersetzt und die Endothelzellen bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden inkubiert. Anschließend wurde im Überstand der Endothelzellen die MCP-1-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als Basal- und Ausgangswert wurde die MCP-1-Konzentration unstimulierter, über fünf Stunden mit Medium inkubierter Endothelzellen gemessen. Transiente Inkubation der Endothelzellen mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen für 30 Minuten führte bereits zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1-Sekretion. Die MCP-1-Konzentration stieg im weiteren Verlauf nur noch geringfügig an (Abb. 2). Der Zeitverlauf der rhIL- $1$ -induzierten endothelialen Sekretion von MCP-1 verhielt sich ähnlich dem der Plättchen-induzierten MCP-1-Sekretion und zeigte bereits nach 30 Minuten Stimulation einen signifikanten Anstieg. Im weiteren Verlauf stieg jedoch die IL- $1\beta$ -vermittelte Sekretion von MCP-1 im Vergleich zur Plättchen-induzierten MCP-1-Sekretion etwas stärker an (Abb. 2). Die Inkubation mit unstimulierten Plättchen führte dagegen zu keiner bedeutenden Sekretion von MCP-1 (Abb. 2).

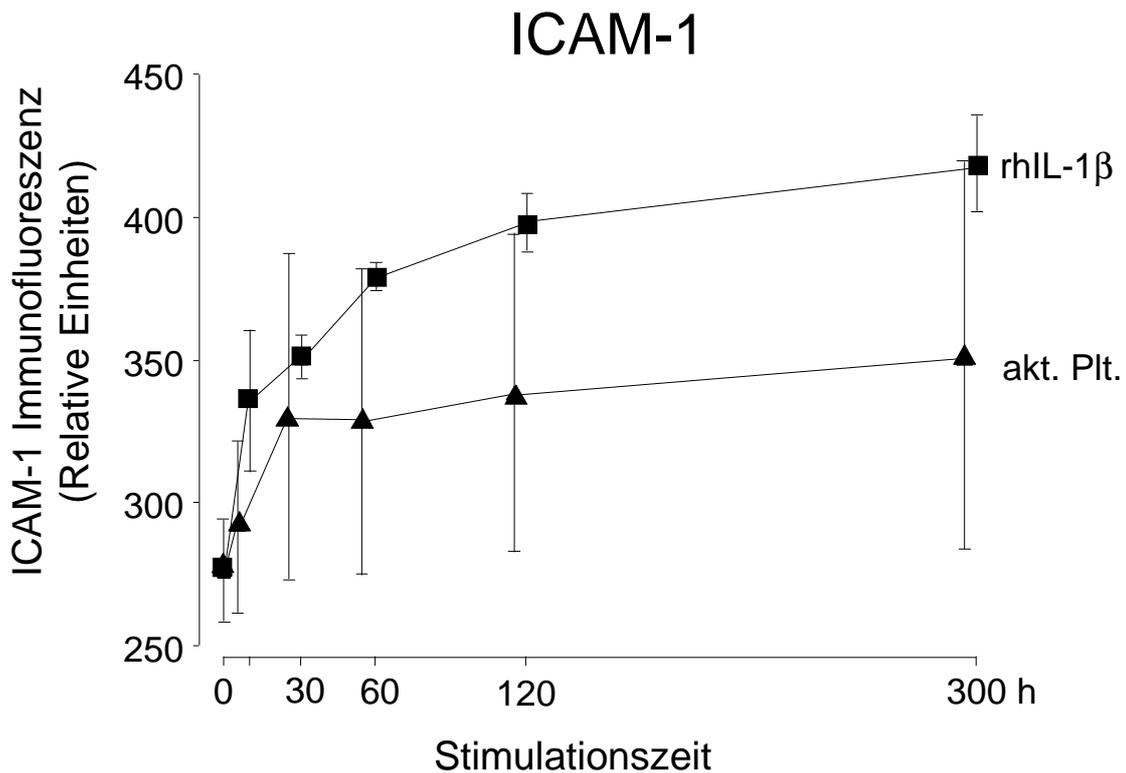


**Abb. 2:** *Plättchen-induzierte Sekretion von endotheliale MCP-1 im Zeitverlauf*

*Konfluierende HUVEC wurden über einen definierten Zeitraum von 10, 20, 30, 60, 120 oder 300 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8/ml$ ) koinkubiert und anschließend mit Medium jeweils bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden weiterinkubiert. Aus dem gewonnenen Überstand wurde die MCP-1-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente die Stimulation mit rhIL-1 $\beta$  über die gleichen Zeiträume und den Basalwert begründete die Koinkubation von HUVEC mit ruhenden Plättchen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zu den unstimulierten Plättchen sind bei  $p < 0,01$  mit \* gekennzeichnet.*

### **3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Plättchen-induzierten Expression von endothelialelem ICAM-1**

In Bereichen atherosklerotischer Plaques oder an Orten, die für atherosklerotische Läsionen prädisponieren, finden sich erhöhte Mengen von ICAM-1 (41, 69). Für die Bestimmung der Plättchen-induzierten Oberflächenexpression von ICAM-1 an Endothelzellen wurden konfluente Monolayer von Primären Endothelzellen (HUVEC) für 10, 30, 60, 120 oder 300 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) koinkubiert. Zur Kontrolle wurden Endothelzellen mit dem rekombinanten humanen Zytokin rhIL-1 $\beta$  (100 pg/ml) nach dem gleichen Zeitschema koinkubiert. Interleukin-1 $\beta$  ist ein bedeutender Aktivator der Expression von ICAM-1 in Endothelzellen. Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit wurden die Plättchen oder das rhIL-1 $\beta$  durch Medium ersetzt und die Endothelzellen bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden inkubiert. Anschließend wurde nach Färbung und Ablösen der Endothelzellen die Oberflächenexpression von ICAM-1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Basal- und Ausgangswert wurde die ICAM-1-Konzentration unstimulierter, über fünf Stunden mit Medium inkubierter Endothelzellen gemessen. Der Zeitverlauf der Plättchen-induzierten Expression von ICAM-1 verhielt sich ähnlich dem der Plättchen-induzierten endothelialen Sekretion von MCP-1 und zeigte bereits nach 30 Minuten Stimulation einen signifikanten Anstieg. Die ICAM-1-Konzentration stieg im weiteren Verlauf nur noch geringfügig an (Abb. 3). Die Stimulation mit rhIL-1 $\beta$  führte ebenso bereits nach 30 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der endothelialen Expression von ICAM-1.



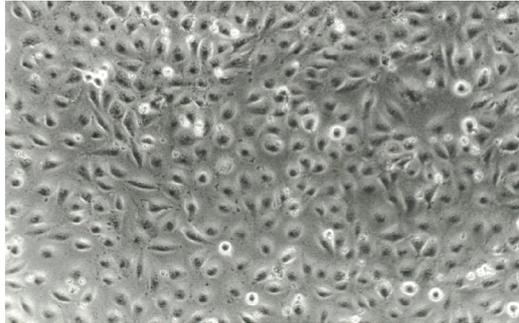
**Abb. 3:** *Plättchen-induzierte Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Endothelzellen*

Konfluierende HUVEC wurden über einen definierten Zeitraum von 10, 20, 30, 60, 120 oder 300 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) koinkubiert und anschließend mit Medium jeweils bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden weiterinkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die stimulierten Endothelzellen mit anti-ICAM-1-FITC für 20 Minuten gefärbt und die Expression von ICAM-1 in der Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle diente die Stimulation mit rhIL-1 $\beta$  über die gleichen Zeiträume. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

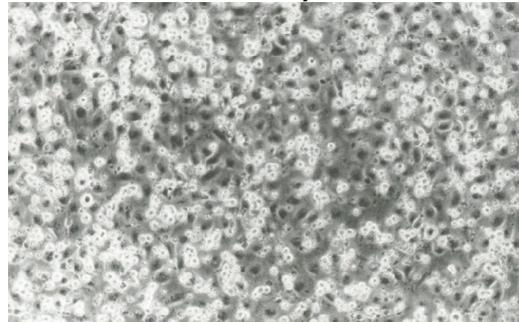
### **3.1.3 Bedeutung aktivierter Plättchen für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen**

Aktivierete Plättchen erhöhen die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften von Endothelzellen. Um die Bedeutung der Plättchen-induzierten, endothelialen Sekretion von MCP-1 und der Expression von ICAM-1 auf funktioneller Ebene zu erfassen, wurde die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen untersucht. Hierfür wurden konfluierende HUVEC mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) für sechzig Minuten stimuliert und nach weiteren sechzig Minuten Inkubation mit Medium für fünf Stunden mit Monozyten koinkubiert. Durch mehrere sorgfältige Waschschrirte wurden nichtadhärente Monozyten abgewaschen und anschließend die adhärenren Monozyten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. In den Versuchen zur Evaluierung der Chemotaxis wurden vor der Inkubation mit den Monozyten Mikrotiterplatteneinsätze eingebracht, um eine physikalische Trennung der Monozyten von den Endothelzellen zu gewährleisten. Als Kontrolle dienten mit Interleukin-1 $\beta$ -stimulierte Endothelzellen und die Basalwerte begründeten Messungen mit unstimulierten Endothelzellen. Die Chemotaxis von Monozyten an durch Plättchen aktivierte Endothelzellen war im Vergleich gegenüber der Chemotaxis von Monozyten an unstimulierten Endothelzellen um nahezu das Dreieinhalbfache erhöht ( $p < 0,01$ ) (Abb. 4, 5A). Interleukin-1 $\beta$ -stimulierte Endothelzellen zeigten einen Anstieg der Monozytenchemotaxis um das Zweieinhalbfache (Abb. 4, 5A). Die direkte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen, die mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) vorinkubiert waren, war um das Zweieinhalbfache erhöht im Vergleich gegenüber der Adhäsion an unstimulierte Endothelzellen ( $p < 0,01$ ) (Abb. 4, 5B). Die Vorinkubation mit Interleukin-1 $\beta$  vermochte einen Anstieg der Adhäsion von Monozyten um das Dreifache hervorzurufen (Abb. 4, 5B).

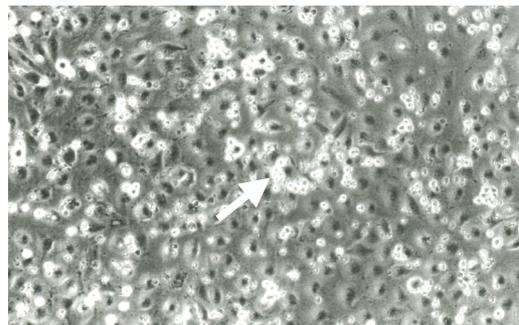
unstimuliert



rhIL-1 $\beta$

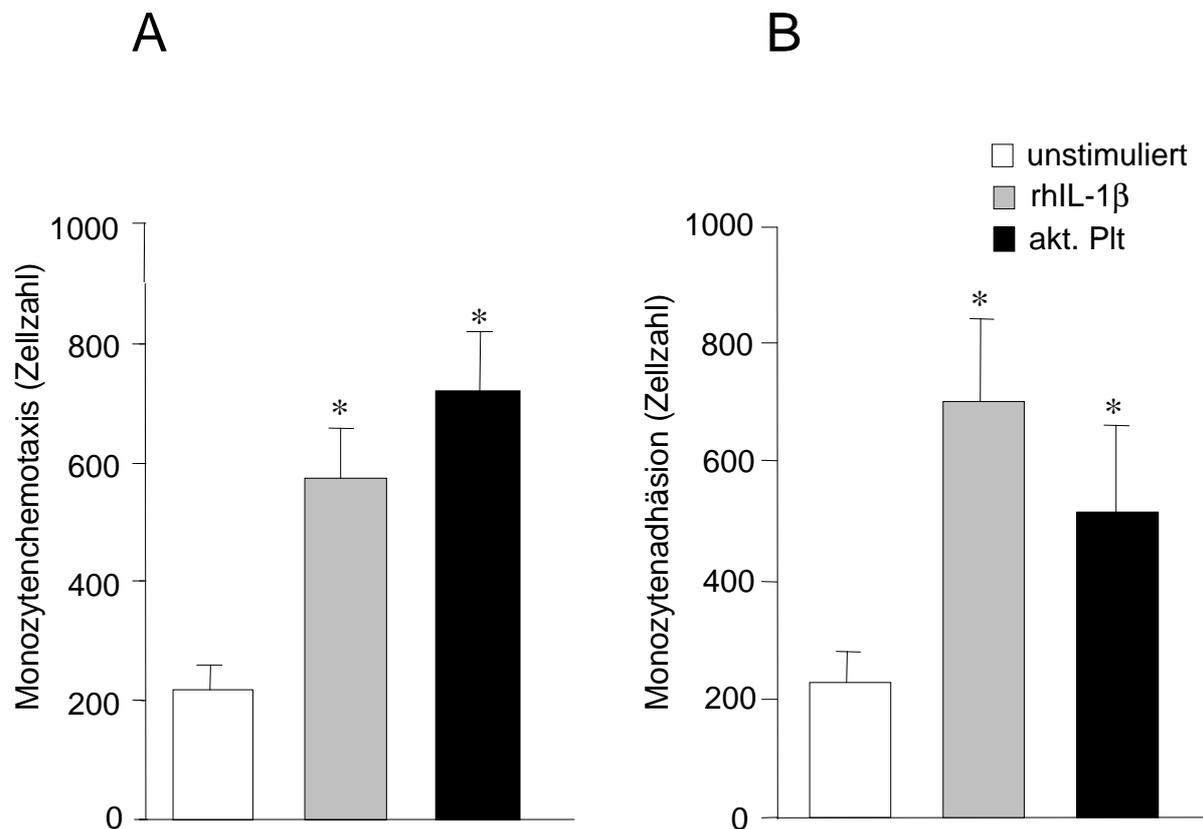


akt. Plättchen



**Abb. 4:** *Monozytenadhäsion an Endothelzellen*

*Konfluierende Endothelzellen (HUVEC) wurden mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) sechzig Minuten inkubiert. Anschließend wurden die aktivierten Endothelzellen in mehreren Schritten gewaschen und mit Monozyten für fünf Stunden koinkubiert. Danach wurden in weiteren vorsichtigen Waschschrinen die nichtadhärenten Monozyten abgewaschen und die an den Endothelzellen adhärierenden Monozyten (Pfeil) im Lichtmikroskop betrachtet.*



**Abb. 5:** *Einfluss aktivierter Plättchen auf die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen*

*Konfluierende HUVEC wurden nach sechzigminütiger Stimulation mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) für weitere sechzig Minuten mit Medium inkubiert und für den Adhäsionsassay anschließend mit Monozyten für weitere fünf Stunden koinkubiert. Für den Chemotaxisassay wurden die Endothelzellen nach der Stimulation und Inkubation in Medium mit Monozyten koinkubiert, die durch Mikrotiterplatteneinsätze physikalisch von den Endothelzellen getrennt waren. Anschließend wurden die durch die Einsätze gewanderten, adhärenen Monozyten (A), bzw. die adhärenen Monozyten (B) ausgezählt. Als Kontrolle dienten mit rhIL-1 $\beta$  stimulierte Endothelzellen, und als Basalwerte wurden unstimulierte Endothelzellen verwendet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Mit \* sind signifikante Unterschiede zu den unstimulierten Zellen bei  $p < 0,01$  gekennzeichnet.*

## **3.2 Wirkung von Kinaseinhibitoren auf Plättchen-induzierte Effekte in Endothelzellen**

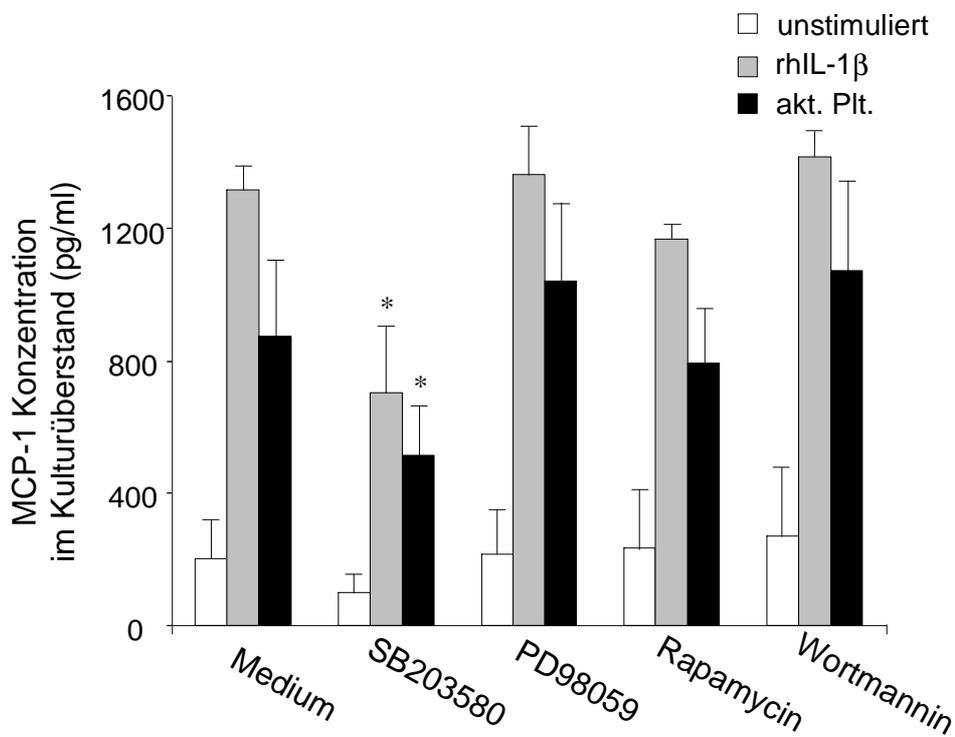
### **3.2.1 Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Sekretion von endotheliale MCP-1**

Subkonfluente Endothelzellen (HUVEC) wurden sechzig Minuten mit den Kinaseinhibitoren SB203580, PD98059, Rapamycin oder Wortmannin vorinkubiert und anschließend sechzig Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) oder mit rhIL-1 $\beta$  (100 pg/ml) stimuliert. Nach der Stimulation wurde der Überstand abgenommen, die Endothelzellen weitere vier Stunden bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden mit Medium inkubiert und die endotheliale Sekretion von MCP-1 im Zellüberstand bestimmt. Der p38-MAP-Kinaseinhibitor SB203580 führte zu einer signifikanten Reduktion der Plättchen-induzierten MCP-1-Sekretion um 40-50% im Vergleich zu unbehandelten Endothelzellen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 6). Die übrigen Kinaseinhibitoren, die getestet wurden, zeigten keinen hemmenden Effekt auf die Plättchen-induzierte Sekretion von MCP-1 (Abb. 6).

### **3.2.2 Bedeutung des p38-Kinaseinhibitors SB203580 für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen**

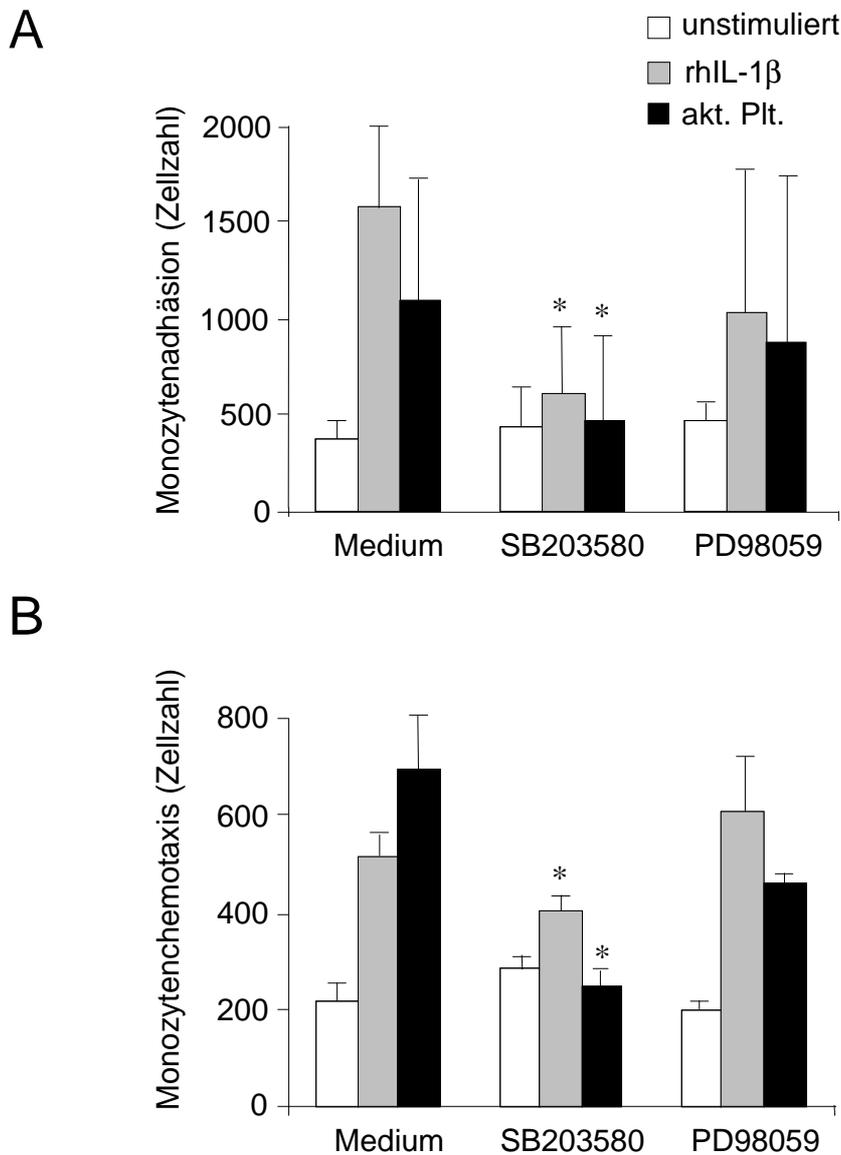
Um den Einfluss des p38-MAP-Kinaseinhibitors SB203580 auf funktioneller Ebene zu beschreiben, wurden die Plättchen-induzierte Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen untersucht. Hierfür wurden die Endothelzellen (HUVEC) mit den Kinaseinhibitoren SB203580 und PD98059 sechzig Minuten vorinkubiert, anschließend sechzig Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) oder mit rhIL-1 $\beta$  (100 pg/ml) stimuliert und nach erneuter sechzigminütiger Inkubation ohne Aktivatoren für fünf Stunden mit Monozyten koinkubiert. Zur Bestimmung der Chemotaxis wurden die Monozyten durch Mikrotiterplatteneinsätze von den Endothelzellen physikalisch getrennt. Nach mehrmaligem vorsichtigem Abwaschen nichtadhärenter Zellen wurde die Chemotaxis

und Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen durch Auszählen bestimmt. Ähnlich der Hemmung der MCP-1-Sekretion wurde durch Vorinkubation der Endothelzellen mit dem p38-MAP-Kinaseinhibitor SB203580, nicht aber mit dem Kinaseinhibitor PD98059 eine signifikante Reduktion der Plättchen-induzierten Monozytenadhäsion an Endothelzellen um nahezu 50% erreicht (Abb. 7A). Ähnliche Wirkung zeigte der Kinaseinhibitor SB203580 auch auf die Plättchen-induzierte Chemotaxis von Monozyten mit einer signifikanten Hemmung um mehr als 50% (Abb. 7B).



**Abb. 6:** *Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Expression von MCP-1 durch Endothelzellen*

*Konfluente HUVEC-Monolayer wurden für sechzig Minuten mit den Kinaseinhibitoren SB203580, PD98059, Rapamycin oder Wortmannin vorinkubiert und anschließend mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) für weitere sechzig Minuten stimuliert. Nach weiterer vierstündiger Inkubation mit Medium erfolgte die MCP-1-Bestimmung im Überstand mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zu der Probe ohne Inhibitoren sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).*



**Abb. 7: Bedeutung des p38-MAP-Kinaseinhibitors SB203580 für die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen**

Nach Vorinkubation mit SB203580 und PD98059 wurden konfluierende HUVEC mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen für sechzig Minuten koinkubiert und eine weitere Stunde mit Medium inkubiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation in Medium wurden die stimulierten Endothelzellen für fünf Stunden mit Monozyten koinkubiert und die auf den Endothelzellen ahärenten (A), bzw. die durch Mikrotiterplatteneinsätze gewanderten und adhärenen (B) Monozyten ausgezählt. Mittelwert und Standardabweichung von drei Experimenten sind dargestellt. Signifikante Unterschiede zu der Probe ohne Inhibitoren sind bei  $p < 0,01$  mit \* gekennzeichnet.

### **3.3 Wirkung der p38-MAP-Kinase auf die Plättchen-vermittelte Transkription von MCP-1 in Endothelzellen**

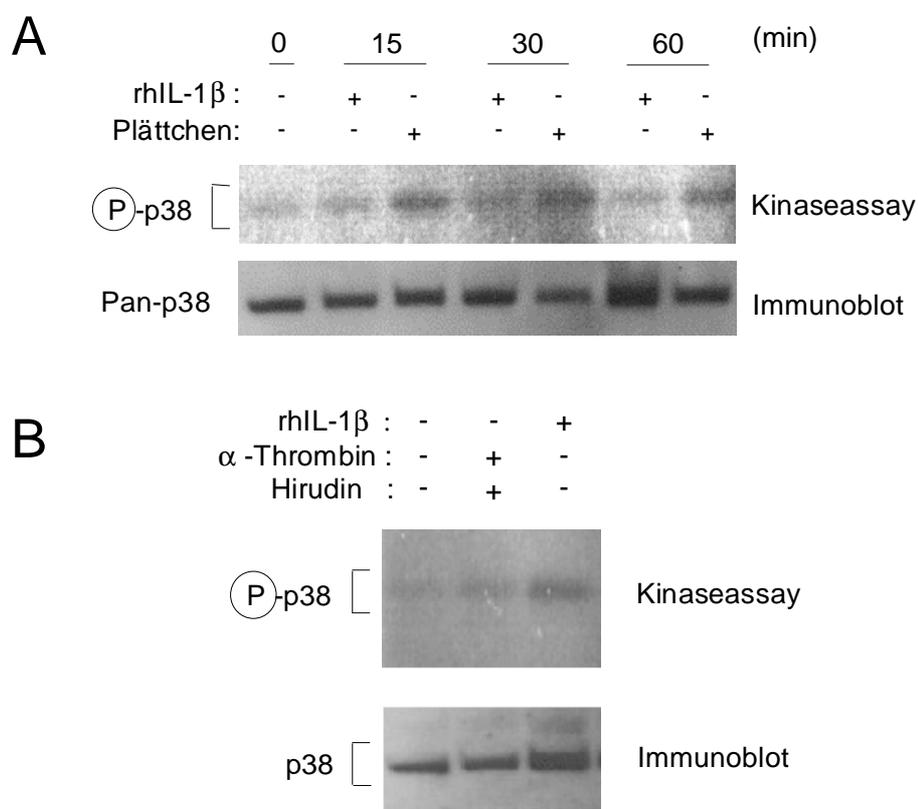
#### **3.3.1 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch Plättchen**

Die p38-MAP-Kinase wird durch zweifache Phosphorylierung der Aminosäuren Tyrosin und Threonin aktiviert (70). Die Bestimmung der p38-Phosphorylierung ist eine bewährte Methode, um die Aktivität der p38-MAP-Kinase zu messen. Für die Bestimmung der Plättchen-induzierten Aktivierung der endogenen p38-MAP-Kinase in Endothelzellen wurden HUVEC für 15, 30 und 60 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) oder mit dem rekombinanten humanen Zytokin rhIL-1 $\beta$  (100 pg/ml) stimuliert und die Aktivität der p38-MAP-Kinase in einem Immunkomplex-Kinaseassay bestimmt. Bereits fünfzehn Minuten Koinkubation mit aktivierten Plättchen führte zu einer Zunahme der p38-MAP-Kinaseaktivität in Endothelzellen. Diese nahm nach sechzigminütiger Koinkubation wieder ab. Stimulation der Endothelzellen mit rhIL-1 $\beta$  führte ebenso zu einer Verstärkung der p38-Kinaseaktivität, wenngleich auch in geringerem Maße (Abb. 8A). Die konstante Dichte der p38-Bande im Immunoblot wies gleiche Mengen an Gesamtprotein in den Proben nach. Die höhere Aktivität der p38-Kinase nach Stimulation ist daher nicht auf größere Proteinmengen zurückzuführen (Abb. 8B).

#### **3.3.2 Plättchen-induzierte Kerntranslokation der p38-MAP-Kinase**

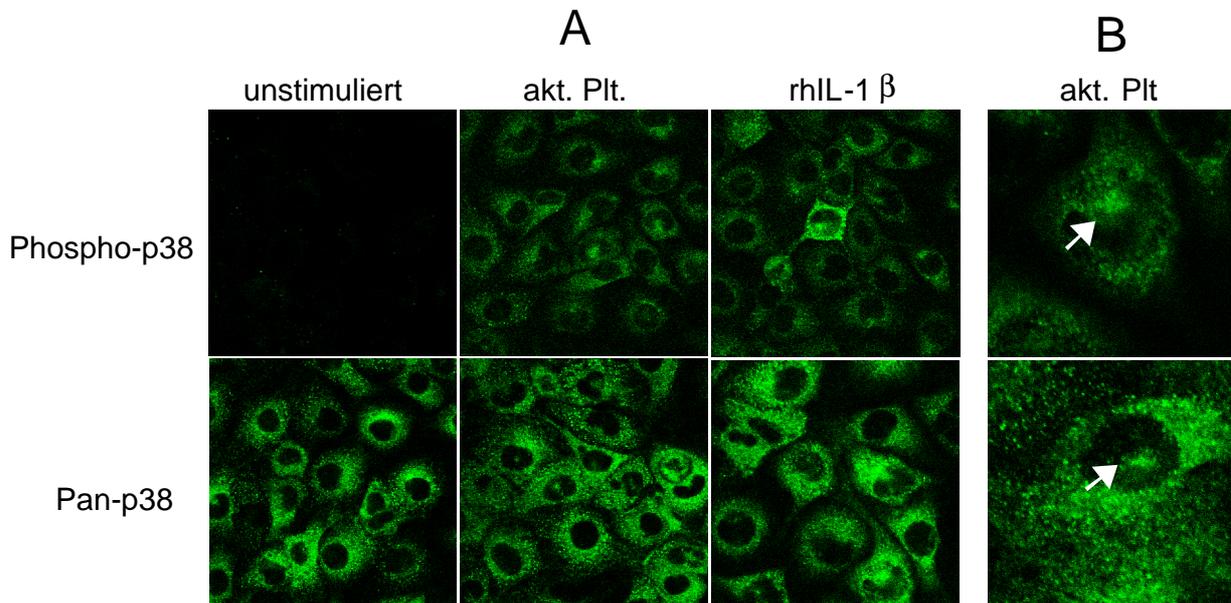
Mitglieder der MAP-Kinase-Familie werden nach Aktivierung in den Zellkern transloziert und wirken dort auf die Genregulation (43). Um zu zeigen, dass aktivierte Plättchen zu einer Aktivierung und Kerntranslokation der p38-MAP-Kinase führen, erfolgte eine Immunofluoreszenz-Färbung von Endothelzellen (HUVEC) mit einem Antikörper, der nur die phosphorylierte Form der p38-Kinase erkennt. In einem weiteren Versuch wurde eine Immunofluoreszenz-Färbung mit einem Pan-p38-Antikörper durchgeführt, der sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der p38-MAP-Kinase erkennt.

Während in unstimulierten Endothelzellen kein phosphoryliertes p38 zu erkennen war, führte die Koinkubation von Endothelzellen mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) für fünfzehn Minuten zu einer erhöhten Immunreaktivität gegenüber der phosphorylierten p38-MAP-Kinase sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Abb. 9). Verwendung des Pan-p38-Antikörpers zeigte in unstimulierten Endothelzellen eine Immunfluoreszenz-Färbung im Zytoplasma, die nach Stimulation mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen vermehrt und zusätzlich auch im Zellkern zu sehen war (Abb. 9).



**Abb. 8:** *Plättchen-induzierte p38-Kinaseaktivität in Endothelzellen*

Konfluente Monolayer mit HUVEC wurden unstimuliert gelassen oder für 15, 30 oder 60 Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit rhIL-1 $\beta$  stimuliert. Nach Immunopräzipitation der Proben wurde die Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch Autoradiographie des phosphorylierten ATF2, einem Substrat der p38-MAP-Kinase, visualisiert (A). Als Kontrolle dienten HUVEC, die mit  $\alpha$ -Thrombin und Hirudin oder mit rhIL-1 $\beta$  stimuliert wurden (B). Um gleiche Mengen des p38-Proteins zu garantieren, wurde jeweils ein Immunoblot durchgeführt (unterer Balken).



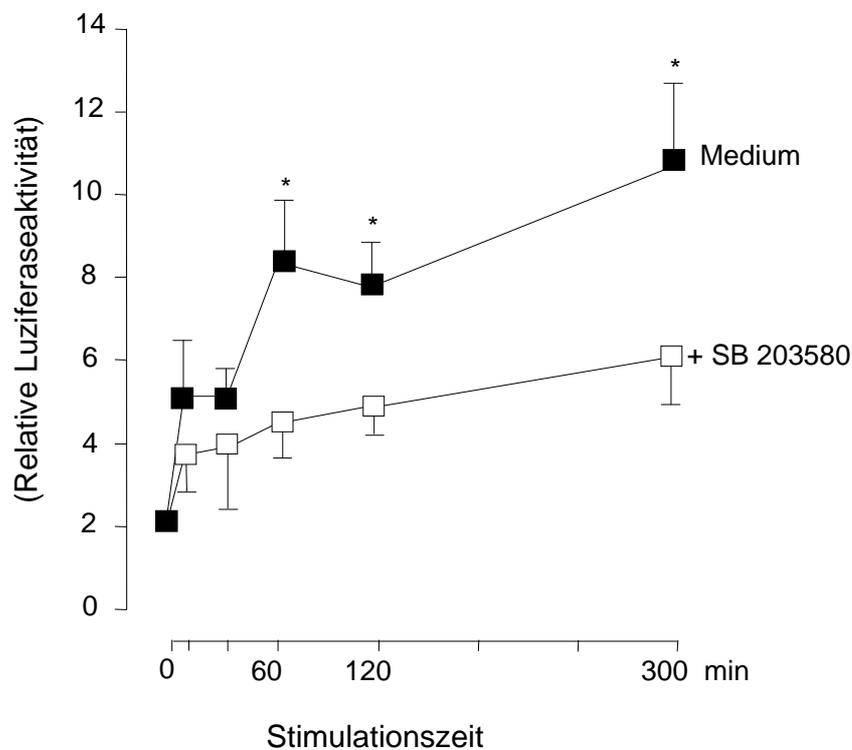
**Abb. 9:** *Plättchen-induzierte Kerntranslokation von p38 in Endothelzellen*

*HUVEC wurden mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit rhIL-1 $\beta$  für 15 Minuten inkubiert, und die subzelluläre Lokalisation der p38-MAP-Kinase wurde durch Immunfluoreszenz nach Färbung mit einem phosphospezifischen p38-Antikörper und mit einem Pan-p38-Antikörper dargestellt.*

### 3.3.3 Einfluss des p38-Kinaseinhibitors SB203580 auf die Plättchen-induzierte Transkription von endotheliale MCP-1

Um die Rolle der p38-MAP-Kinase bei der Regulation des MCP-1 auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden Endothelzellen (HUVEC) mit einem MCP-1-Luziferase-Plasmidkonstrukt transfiziert, welches die „enhancer“-Region zwischen –2742 und –2513 sowie die „promoter“-Region zwischen –107 und +60 des menschlichen MCP-1-Genes enthält (49, 51, 90). Nach zweistündiger Transfektion der Endothelzellen (HUVEC) mit dem MCP-1-Plasmidkonstrukt wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden in Medium inkubiert und danach mit oder ohne dem spezifischen p38-Kinaseinhibitor SB203580 für sechzig Minuten vorinkubiert. Schließlich wurden die HUVEC mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) für 10, 30, 60, 120 und 300 Minuten stimuliert und jeweils bis zu einer

Gesamtdauer von fünf Stunden in Medium inkubiert. Danach wurde die Luziferaseaktivität mit dem Dual-Luziferase-Reporterassay quantitativ bestimmt. Bei Vorinkubation der HUVEC mit dem Kinaseinhibitor SB203580 wurde eine 50%ige Reduktion der Plättchen-induzierten MCP-1-„promoter“-Aktivität erreicht. Eine Verringerung der Plättchen-induzierten MCP-1-Luziferaseaktivität war bereits nach kurzer Stimulationszeit detektierbar (Abb. 10).



**Abb. 10:** Einfluss des p38-Kinaseinhibitors SB203580 auf die Plättchen-induzierte Transkription von endotheliale MCP-1

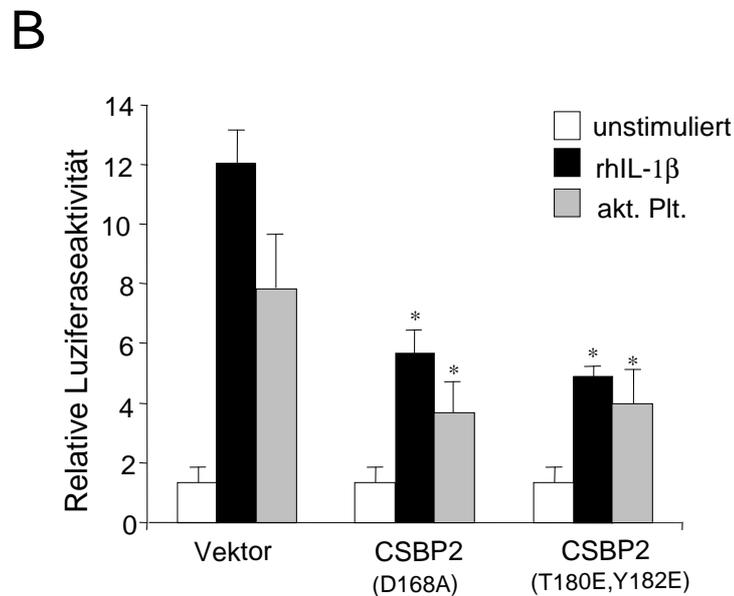
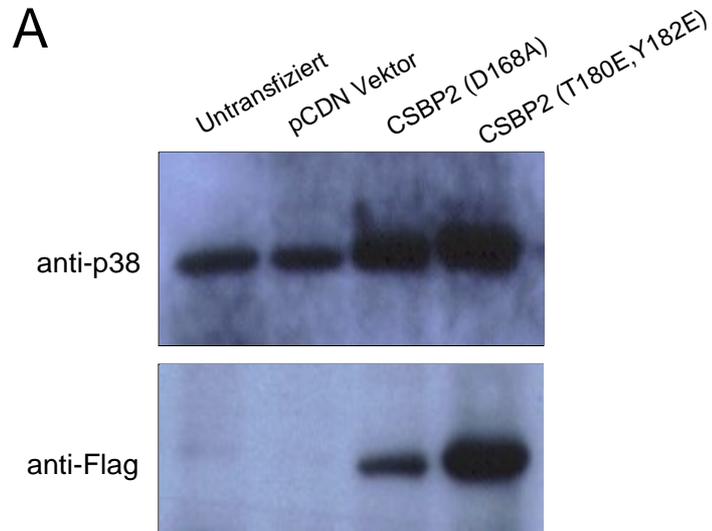
HUVEC wurden mit einem MCP-1-Luziferasekonstrukt und mit dem Kontrollplasmid pRL-TK kotransfiziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation in Medium wurden die Endothelzellen entweder unbehandelt belassen oder mit dem p38-MAP-Kinaseinhibitor SB203850 sechzig Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die HUVEC mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen oder mit rhIL-1 $\beta$  für 10, 30, 60, 120 oder 300 Minuten stimuliert und jeweils bis zu einer Gesamtdauer von fünf Stunden mit Medium weiter inkubiert. Danach wurde die Luziferaseaktivität mit dem Dual-Luziferase-Reporterassay quantitativ bestimmt.

### **3.4 Überexpression von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten in Endothelzellen**

#### **3.4.1 Wirkung von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die Transkription von endotheliale MCP-1**

Dominant-negative Mutanten der p38-MAP-Kinase hemmen die Aktivierung der p38-MAP-Kinase-Kaskade und die MCP-1-„promoter“-abhängige Transkription in Endothelzellen (31). Um die Bedeutung der Form des p38-Motives auf die Plättchen-induzierte MCP-1-Promoteraktivität zu untersuchen, wurden subkonfluente Endothelzellen (HUVEC) mit den Flag-markierten p38-dominant-negativen Mutanten pCDN-CSBP2 (D168A), CDN-CSBP2 (T180E, Y182E) oder dem Kontrollvektor pCDN für vierundzwanzig Stunden kotransfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Endothelzellen 60 Minuten mit aktivierten Thrombozyten oder mit rhIL-1 $\beta$  stimuliert und die Luziferaseaktivität unter Kontrolle des MCP-1-„promoters“ mittels Luminometermessung quantifiziert.

Die p38-Proteinexpression sowie die Detektion der Flag-markierten p38-Mutanten in den Endothelzellen erfolgte im Immunoblot unter Verwendung eines anti-p38-Antikörpers und eines anti-Flag-Antikörpers (Abb. 11A). Die Überexpression beider p38-dominant-negativer Mutanten resultierte in einer bedeutenden Reduktion der MCP-1-Transkription um nahezu 50% ( $p < 0,01$ ) (Abb. 11B).

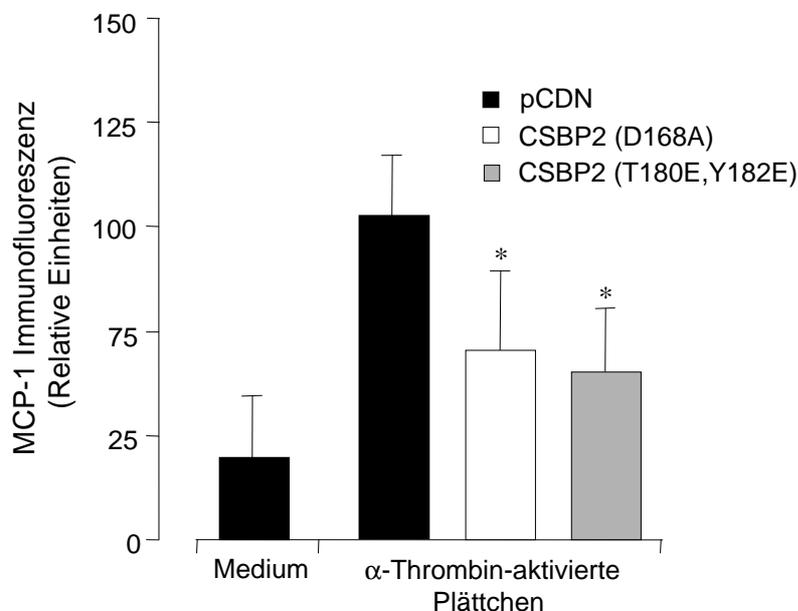


**Abb. 11:** *Wirkung von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die Transkription von endotheliale MCP-1*

Um die Rolle der p38-Kinase bei der MCP-1-„promoter“-abhängigen Transkription zu untersuchen, wurden HUVEC mit den p38 dominant-negativen Mutanten CSBP2 (D168A), CSBP2 (T180E, Y182E) oder dem Kontrollplasmid pCDN transfiziert. Zur Darstellung der transgenen p38-Expression und der transfizierten, Flag-markierten CSBP-dominant-negativen Mutanten erfolgte ein Immunoblot (A). Nach Stimulation mit aktivierten Thrombozyten oder IL-1 $\beta$  wurde die Luziferaseexpression unter Kontrolle des MCP-1-„promoters“ bestimmt. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Messungen sind dargestellt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Basalwerten der unstimulierten Proben sind als ( $p < 0,01$ ) (B) gekennzeichnet.

### 3.4.2 Einfluss von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die MCP-1-Sekretion in Endothelzellen

Die Bedeutung der p38-MAP-Kinase für die Plättchen-induzierte Expression von MCP-1 wurde in einem weiteren Experiment überprüft. Endothelzellen (HUVEC) wurden mit den p38-dominant-negativen Mutanten pCDN-CSBP2 (D168A), CDN-CSBP2 (T180E, Y182E) oder dem Kontrollvektor pCDN transfiziert, anschließend für sechzig Minuten mit  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen ( $2 \times 10^8$ /ml) stimuliert, und nach der Färbung mit anti-MCP-1 wurde die MCP-1-Bildung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die p38-MAPK-Mutanten vermochten im Vergleich zu dem Kontrollvektor signifikant die Plättchen-vermittelte Bildung von MCP-1 durch Endothelzellen um nahezu 50% zu hemmen (Abb. 12).



**Abb. 12:** Einfluss von dominant-negativen p38-MAPK-Mutanten auf die MCP-1-Sekretion in Endothelzellen

Um die MCP-1-Proteinexpression zu bestimmen, wurden HUVEC mit den p38-Negativmutanten CSBP2 (D168A), CSBP2 (T180E, Y182E) oder dem Kontrollplasmid pCDN transfiziert und anschließend mit Thrombin-aktivierten Thrombozyten für sechzig Minuten stimuliert. Nach weiteren vier Stunden und Färbung mit anti-MCP-1 wurde die endotheliale MCP-1-Sekretion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Messungen sind dargestellt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Proben mit dem Kontrollvektor sind als ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Rolle der Plättchenadhäsion bei der Atherogenese

Thrombozyten spielen bei der Bildung atherosklerotischer Plaques in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, aber auch bei den initialen Entstehungsmechanismen in der frühen Atherogenese eine zentrale Rolle und sind dadurch maßgeblich an den daraus entstehenden Komplikationen Myokardinfarkt, Apoplex und Embolie der peripheren Gefäße beteiligt.

Wenngleich die Entstehung und der Beginn der Atherosklerose eines der bedeutendsten Elemente bei therapeutischen und prophylaktischen Ansätzen darstellt, sind die initialen Mechanismen, welche die Bildung atherosklerotischer Plaques evozieren, nur ansatzweise bekannt. Ein bedeutender Mechanismus in der frühen Atherogenese ist weniger die Denudation des Endothels als vielmehr eine Funktionsstörung der strukturell intakten Endothelzelle. Diese führt zu einer Aktivierung der Endothelzelle mit Änderung ihrer adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften und konsekutiv zu einer Monozyteneinwanderung in die Gefäßwand (76). Die pathophysiologischen Vorgänge, welche zu einer Funktionsstörung des Endothels führen, und der initiale Auslöser, welcher die Monozytenmigration in das Subendothel zu dem Ort der entstehenden Inflammation veranlasst, sind jedoch bislang nur unzureichend bekannt. Thrombozyten vermögen an dysfunktionalem Endothel sowohl *in vitro* (8, 28) als auch *in vivo* (23, 56, 57) zu adhären. Es kommt zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die daraufhin proinflammatorische Inhaltsstoffe ihrer Granula freisetzen, unter anderem Chemokine und Wachstumsfaktoren. Jedoch nicht nur strukturell oder funktionell gestörtes Endothel bildet eine Grundlage für die Adhäsion von Thrombozyten und die Einleitung weiterer inflammatorischer Prozesse. Auch an intaktem Endothel vermögen Thrombozyten im aktivierten Zustand über verschiedene Mechanismen zu adhären und mit diesem zu interagieren (8, 28, 56).

Die vorliegende Arbeit soll die Hypothese stützen, dass bereits eine kurzzeitige Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit intakten Endothelzellen die adhäsiven und die

chemotaktischen Eigenschaften der Endothelzelle verändert, die Monozytentransmigration fördert und somit die Entstehung der Atherosklerose begünstigt (23, 54, 55, 57).

Es werden eine Vielzahl von endothelialen Adhäsionsrezeptoren und thrombozytären Glykoproteinen im Hinblick auf die spätere Monozytenrekrutierung und Atherogenese beschrieben. Hierbei spielen das thrombozytäre Adhäsionsmolekül P-Selektin (24, 40, 56, 66), das thrombozytäre Glykoprotein GPIIb/IIIa, welches über den vWF mit dem Endothel interagiert (62, 87), sowie die Bindung von Thrombozyten über das Glykoprotein IIb-IIIa an immobilisiertes und an die Endothelzelloberfläche gebundenes Fibrinogen (55) in unterschiedlichem Maße eine entscheidende Rolle. Es ist wahrscheinlich, dass aktivierte Thrombozyten über ihre Adhäsionsrezeptoren kurzzeitig in engem Kontakt mit dem intakten Endothel kommen, daraufhin in hohen Konzentrationen die in den Granula gespeicherten Zytokine in ihre thrombogene Umwelt freisetzen und somit eine bedeutende ICAM-1-Expression und MCP-1-Sekretion durch die Endothelzellen induzieren.

Unter den von den Thrombozyten freigesetzten Zytokinen sind bei der Atherogenese das Chemokin Interleukin-1 $\beta$  sowie der Rezeptor CD40L, welche wirksame Auslöser von inflammatorischen Reaktionen in Endothelzellen sind, von besonderer Bedeutung. Durch diese proinflammatorischen Faktoren vermittelt, kommt es in den Endothelzellen zu einer verstärkten Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“) sowie zu der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“). Die Monozytenchemotaxis sowie die Adhäsion und Transmigration von Monozyten, vermittelt durch ICAM-1 und MCP-1, ist der erste wesentliche Schritt in der Entstehung atherosklerotischer Plaques.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass bereits eine kurzzeitige Interaktion von 10 bis 60 Minuten zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen ausreichend ist, um die Transkription und die Synthese von ICAM-1 und MCP-1, dem wichtigsten chemotaktischen Faktor für Monozyten (51), in Endothelzellen anzuregen. Die lokale, von den Plättchen induzierte endotheliale Expression von ICAM-1 sowie Sekretion von MCP-1 und die folgende Akkumulation und Transmigration von Monozyten könnten ein wichtiger Auslöser der atherogenen Reaktion in der Gefäßwand sein. Die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle scheint einem zeitlichen Verlauf unterworfen zu sein und vorwiegend in den frühen Stadien der Atherosklerose verstärkt nachweisbar zu sein (97).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass bereits eine transiente, kurzzeitige Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit menschlichen Endothelzellen zu einer verstärkten Sekretion von MCP-1 und Chemotaxis von Monozyten sowie zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 und Adhäsion der Monozyten an das aktivierte Endothel führt. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Orte verstärkter Akkumulation von Thrombozyten an die Gefäßwand, z.B. Orte veränderten Flusses wie die Karotisbifurkation, besondere Prädilektionsstellen für die Adhäsion und Transmigration von Monozyten und somit der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen bedeuten.

Inzwischen festigen eine Reihe weiterer Arbeiten die vorliegenden Ergebnisse und belegen auch *in vivo* den Einfluss von aktivierten Thrombozyten auf die Monozytenrekrutierung und Entwicklung atherosklerotischer Prozesse in der Gefäßwand. Erst kürzlich konnten Hou et al. die Bedeutung aktivierter Thrombozyten bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen *in vivo* darstellen (40). Zirkulierende aktivierte Thrombozyten setzen durch P-Selektin-vermittelte Interaktion mit Monozyten und Endothelzellen proinflammatorische Zytokine, unter anderem das „regulated on activation normal T cell expressed and secreted“ (RANTES) und den Plättchenfaktor-4 (PF4), frei. Durch diese proinflammatorischen Faktoren induziert, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von endothelialen Monozytenintegrinen, wie z.B. VCAM-1, mit konsekutiver Monozytenrekrutierung und Exazerbation von atherosklerotischen Läsionen (40). Die hierbei beschriebene P-Selektin-vermittelte Thrombozytenadhäsion ist ein transients Vorgang, der die Hypothese stützt, dass bereits ein kurzzeitiger Kontakt zwischen Thrombozyten und Endothelzellen ausreicht, um zu einer wesentlichen Monozytenrekrutierung zu führen. Während die Arbeit von Huo et al. insbesondere den Einfluss der Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit bereits atherosklerotisch verändertem Endothel auf die Weiterentwicklung der Atherosklerose aufzeigt, beschreiben Massberg et al. eine wesentliche Funktion der Thrombozyten-Endothelinteraktion bereits für die Initiierung atherosklerotischer Läsionen (55). Mit ihrer Arbeit konnten Massberg et al. *in vivo* zeigen, dass schon vor Beginn sichtbarer atherosklerotischer Veränderungen aktivierte Thrombozyten unter anderem über die Glykoproteine GPIIb/IIIa und GPIIb-IIIa an das Endothel adhären und nach Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Oberflächenrezeptoren zur Monozytenrekrutierung und Formation atherosklerotischer Läsionen führen (55). Auch Theilmeier et al. belegen in ihrer

Arbeit, dass Thrombozyten an besonders exponierten Stellen, vermittelt durch vWF, GPIb $\alpha$  und P-Selektin, an das Endothel adhäreren, noch bevor atherosklerotische Läsionen nachweisbar sind (87).

Auch äußere Bedingungen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, wie z.B. Flusseigenschaften, sind für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen von Bedeutung. Methia et al. beschreiben in ihrer Arbeit die Rolle des GPIb $\alpha$  und seines Liganden vWF für die Thrombozyten-induzierte Monozytenrekrutierung und Bildung atherosklerotischer Läsionen insbesondere an Stellen gestörter Flusseigenschaften (62). Weitere Arbeiten lassen vermuten, dass GPIIb-IIIa vor allem in Abwesenheit von „shear-stress“ bei der Plättchenadhäsion eine Rolle spielt (8), während das P-Selektin offensichtlich unter hohem „shear-stress“ die Plättchenadhäsion vermittelt (87).

#### **4.2 Plättchen-induzierte Chemokintranskription wird durch die p38-MAP-Kinase vermittelt**

Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) sind zentrale Signalmoleküle innerhalb intrazellulärer Signalwege, welche die Genexpression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in aktivierten Endothelzellen regulieren. Eine Vielzahl von proinflammatorischen Substanzen, insbesondere Zytokine wie z.B. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , induzieren in Zellen den p38-MAP-Kinase-Signalweg. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten über eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges in Endothelzellen zu einer gesteigerten Expression von MCP-1 führen.

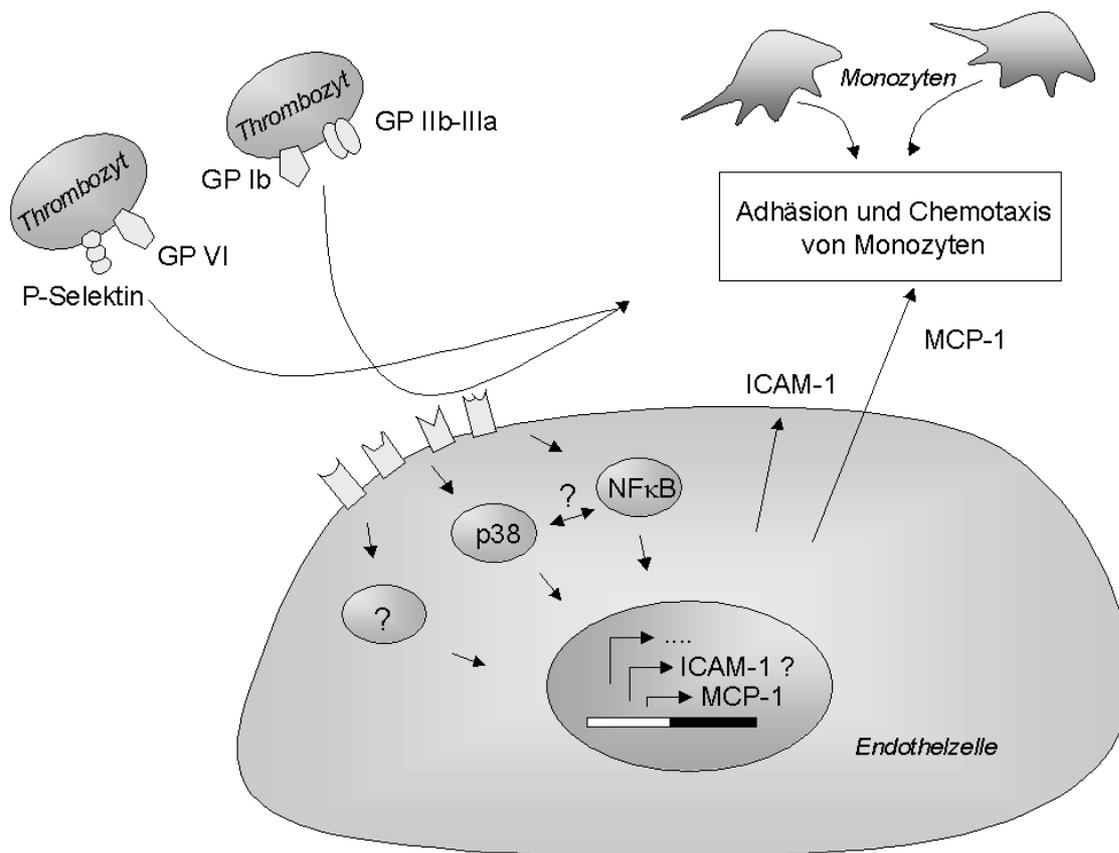
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine Hemmung der Plättchen-induzierten MCP-1-Sekretion sowie der Adhäsion und Chemotaxis von Monozyten durch den spezifischen p38-MAP-Kinase Inhibitor SB203580. Des Weiteren wird in den Versuchen dieser Arbeit gezeigt, dass die p38-MAP-Kinase bereits nach kurzer Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit humanen Endothelzellen (HUVEC) durch Phosphorylierung aktiviert wird. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die Kerntranslokation der

aktivierten Form der p38-MAP-Kinase nach Induktion des Signalweges durch aktivierte Thrombozyten dargestellt werden.

Wie bereits in einer Arbeit von Goebler et al. berichtet, basiert die Regulation der TNF-induzierten Expression von MCP-1 über den p38-MAP-Kinase-Signalweg in menschlichen Nabelschnurzellen hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene (33). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass eine kurzzeitige, transiente Interaktion von aktivierten Plättchen mit Endothelzellen zu einer Induktion der MCP-1-„promoter“-Aktivität führt und dass dieser Prozess durch den p38-spezifischen Inhibitor SB203580 gehemmt werden kann. Die Thrombozyten-vermittelte Transkription und Synthese von MCP-1 konnten durch den Inhibitor SB203580 nahezu um 50% im Vergleich zu den ungehemmten Proben verringert werden. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, die p38-MAP-Kinase sei annähernd zur Hälfte bei den Signalwegen Plättchen-induzierter Expression von MCP-1 beteiligt. Dieses korreliert mit Ergebnissen anderer Arbeiten, welche einen ähnlichen Anteil der p38-MAP-Kinase an Zytokin-vermittelter Expression von MCP-1 bzw. Il-1 postulieren. Goebler et al. fanden eine 50-60%ige Hemmung der TNF-induzierten Sekretion von MCP-1 in Endothelzellen (33) durch spezifische p38-Kinaseinhibitoren. Einige Zeit später wurden die Ergebnisse auch durch die Arbeit von Marin et al. (54) gestützt. Marin et al. konnten die Beteiligung der p38-MAP-Kinase an der Thrombin-vermittelten Expression von MCP-1 und IL-8 durch Endothelzellen nachweisen und fand eine 40-60%ige Hemmung der Zytokinbildung durch den spezifischen p38-Kinaseinhibitor. Um eine mögliche Beteiligung weiterer MAP-Kinasen bei der Plättchen-induzierten Expression von MCP-1 in Endothelzellen zu eruieren, wurden Endothelzellen vor der Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren weiterer Proteinkinasen, insbesondere der „extracellular-signal-regulated-MAP-kinase“ (ERK/MAP-Kinase) (PD98059), behandelt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass weitere Signalwege, die zu einer vollständigen, durch Plättchen-induzierten MCP-1-Genexpression führen, außerhalb dieser MAP-Kinasen zu suchen sind.

Weiterhin offen bleibt die Frage nach der Lokalisation der p38-verantwortlichen Region auf dem MCP-1-„promoter“. Während die basale MCP-1-„promoter“-Aktivität von einer proximalen „promoter“-Region, die eine SP-1-Bindungsstelle enthält, abhängig ist, wird die Zytokin-induzierte MCP-1-„promoter“-Aktivität vorwiegend durch ein weiter distal

befindliches „enhancer“-Element mit zwei Bindungsstellen und durch eine weiter proximal gelegene NF- $\kappa$ B- (Nuklear Faktor- $\kappa$ B) Bindungsstelle vermittelt (79, 91). Kürzlich wurde gezeigt, dass aktivierte Plättchen zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B führen (26, 27). Bislang ist noch nicht geklärt, inwiefern die Aktivierung der p38-MAP-Kinase mit dem NF- $\kappa$ B-System in Endothelzellen interagiert, obwohl bereits eine Rolle der p38-MAP-Kinase bei der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression in verschiedenen anderen Zellen beschrieben wurde (61, 79, 95). Wesselborg et al. demonstrierten, dass eine Hemmung der p38-MAP-Kinase durch den spezifischen Inhibitor SB203580 oder durch die dominant-negativen Mutanten der MAPK-Kinase-6, einem Aktivator der p38-MAP-Kinase, die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression reguliert. Die DNA-Bindungsaktivität blieb jedoch davon unbeeinflusst (95). Eine kürzlich publizierte Arbeit von Goebler et al. postuliert die Beteiligung von mindestens drei unabhängigen Signalwegen bei der Expression von MCP-1 in Endothelzellen. Goebler et al. zeigten, dass bei der Sekretion von MCP-1 in Endothelzellen eine Aktivierung sowohl des NF- $\kappa$ B-Signalweges als auch der p38-MAP-Kinase und der Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase C (PC-PLC) beteiligt ist. Dabei beschreiben Goebler et al. in ihrer Arbeit eine direkte Regulation der transkriptionellen Aktivität des NF- $\kappa$ B im Transkriptionskomplex durch p38- und durch PC-PLC-abhängige Signalwege (31). Im Folgenden werden eine Vielzahl von Untersuchungen unumgänglich sein, um die Frage nach weiteren Signalwegen und nach der Stellung der p38-MAP-Kinase innerhalb der Signalkaskaden bei der Thrombozyten-vermittelten Chemokintranskription in Endothelzellen vollständig zu beantworten (Abb. 13).



**Abb. 13:** *Induktion inflammatorischer Gene durch transiente Thrombozyten-Endothelzellinteraktion*

Aktivierte Thrombozyten vermögen über verschiedene thrombozytäre Rezeptoren, bei denen das Integrin P-Selektin und die Glykoproteine GPIb, GPIIb-IIIa sowie GPVI eine entscheidende Rolle spielen, flüchtig an die Endothelzelle zu adhären. Durch die Interaktion vermag die aktivierte Endothelzelle über mehrere Signalwege die Genexpression proinflammatorischer Faktoren, die für die Rekrutierung und Adhäsion von Thrombozyten verantwortlich sind, zu steuern. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges, der entscheidend bei der Transkription und Sekretion von MCP-1 und konsekutiv bei der Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten beteiligt ist.

### **4.3 Studienbeschränkungen**

Die vorliegende Arbeit basiert auf Versuchen mit immortalen Endothelzellen und mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen, welches beides gut etablierte Methoden für *in vitro*-Studien sind. Die Arbeit gibt keinen Nachweis darüber, ob die durch aktivierte Plättchen induzierten inflammatorischen Prozesse im Bereich der Endothelzelle auch *in vivo* vorhanden sind. Systemische Thrombozytenaktivierung wurde in Zusammenhang mit den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus oder Diabetes mellitus beschrieben. Bei Personen mit diesen Risikofaktoren könnte ein erhöhter Aktivierungsgrad der Thrombozyten vorliegen und insbesondere im Bereich veränderter Flusseigenschaften, wie z.B. an Gefäßaufzweigungen, eine verstärkte Interaktion zwischen Thrombozyten und intakten Endothelzellen mit konsekutiver inflammatorischer Reaktion erlauben. Des Weiteren fand man kürzlich heraus, dass Thrombozyten in Bezug auf ihre Stimulation mit Kollagen und Thrombin durch LDL sensitiviert werden (34). Somit könnte LDL durch eine Sensitivierung der Thrombozyten ebenfalls zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-induzierten endothelialen MCP-1-Sekretion führen.

### **4.4 Potentielle therapeutische Konsequenzen der vorliegenden Arbeit**

Die Beteiligung von Thrombozyten an Funktionsstörung und Aktivierung von Endothelzellen, Monozytenadhäsion und Extravasion in der frühen Phase der Atherogenese noch vor jeglichen morphologischen Veränderungen der Gefäßwand wurde durch *in vitro* Versuche gezeigt und wird auch für *in vivo* Situationen postuliert.

Aktivierte Thrombozyten vermögen nicht nur selber mit Monozyten zu interagieren, sondern können auch die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen unterstützen, insbesondere unter bestimmten Flussverhältnissen (86). Die lokale Anreicherung und der erhöhte Aktivierungsgrad von Thrombozyten, wie sie in den Koronararterien herztransplantierte Patienten vorkommen, führt konsekutiv zu einer vermehrten Interaktion

der Thrombozyten mit der Gefäßwand und zu einer lokalen Freisetzung von proinflammatorischen und proliferativen Faktoren (21). Es kommt zu einer verstärkten Monozytenmigration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie zu einer beschleunigten Atherosklerose in den Transplantatgefäßen. Wie bereits beschrieben, gehen die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren mit systemischer Plättchenaktivierung einher. An Prädilektionsstellen, wie sie Gefäßaufzweigungen darstellen, kann es zu einer verstärkten Thrombozytenadhäsion an das intakte Endothel und zu einer Aktivierung inflammatorischer Gene wie MCP-1 und ICAM-1 kommen. Ein therapeutischer Ansatz könnte daher die Beeinflussung der durch aktivierte Thrombozyten induzierten Entzündungsvorgänge sein. Da Thrombozyten über verschiedene Wege aktiviert werden, vermag ein einzelnes antithrombozytäres Medikament keine wesentliche Reduktion der Plättchenaktivierung mit Degranulation und Freisetzung inflammatorischer Inhaltsstoffe zu erreichen. Es existieren eine Reihe antithrombozytärer Medikamente wie Aspirin, Thienopyridine oder Fibrinogenrezeptor-Antagonisten, welche die verschiedenen Wege der Plättchenaktivierung beeinflussen. Dennoch sind derzeit weder einzelne Medikamente noch Kombinationen von Medikamenten bekannt, die eine substantielle Reduktion der Thrombozytenaktivierung erreichen würden. Inhibierung der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion oder der durch Thrombozyten induzierten endothelialen Signalwege könnte daher ein weiterer therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Patienten sein. Dieses gilt insbesondere für solche mit erhöhtem Risiko für eine rasche Progression oder Entstehung der Atherosklerose, wie die oben beschriebenen Patientengruppen, oder für Patienten, die mit einem erhöhtem Risiko für Komplikationen, welche aus der Atherosklerose entstehen, rechnen müssen.

In dieser Arbeit und in weiteren Publikationen (71) wird gezeigt, dass eine Hemmung der induzierten MCP-1-Expression in Endothelzellen mit einer verminderten Transmigration und Adhäsion von Monozyten einhergeht. Über die Inhibierung der MCP-1-Sekretion kommt es auch zu einer Reduktion der Chemotaxis und Ansammlung von T-Lymphozyten (12), die für das Ausmaß von inflammatorischen Reaktionen bedeutend sind. Der p38-MAP-Kinase-Signalweg könnte daher über die Entstehung und Progression der Atherosklerose hinaus ein wesentliches Ziel bei der Kontrolle inflammatorischer Prozesse im Allgemeinen sein.

Thrombozyten kommt neben ihrer Bedeutung bei den Vorgängen der Hämostase und der arteriellen Thromboseentstehung auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu. Aktivierte Thrombozyten vermögen an Endothelzellen zu adhären und diese zu aktivieren. Die aktivierte Endothelzelle sezerniert Chemokine und exprimiert Adhäsionsmoleküle, die maßgeblich an Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen und somit bei den frühen Schritten der Atherogenese beteiligt sind. Eines der bei diesen Pathomechanismen bedeutendsten Chemokine ist das MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“), welches Monozyten an Stellen von inflammatorischen Prozessen zieht. Die zellulären Signalmechanismen, die hierbei beteiligt sind, sind jedoch bislang unzureichend bekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von aktivierten Thrombozyten auf die Expression von MCP-1 in Endothelzellen, und die hierbei beteiligten Signalwege.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass bereits eine kurzzeitige Interaktion von 10 bis 120 Minuten zwischen  $\alpha$ -Thrombin-aktivierten Plättchen mit Endothelzellen zu einer substantiellen Sekretion von MCP-1 und konsekutiv zur Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten führte. Die Signalwege, die bei der endothelialen Genexpression von MCP-1 mitwirken, sind vielfältig. Eine Beteiligung des NF- $\kappa$ B und der p38-MAP-Kinase sind bekannt. Durch Vorinkubation mit dem spezifischen p38-MAP-Kinaseinhibitor SB203580 konnte sowohl die Plättchen-vermittelte Sekretion von endothelalem MCP-1 als auch die Chemotaxis und die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen signifikant reduziert werden. In den Experimenten stellte sich eine durch  $\alpha$ -Thrombin-aktivierte Plättchen induzierte Aktivierung und Kerntranslokation der p38-MAP-Kinase in Endothelzellen dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die p38-MAP-Kinase die Transkription von Plättchen-induziertem endothelalem MCP-1 reguliert.

Diese Ergebnisse begründen, dass bereits die kurzzeitige Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit Endothelzellen über einen p38-MAPK-vermittelten Signaltransduktionsweg die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen verändern. Die p38-MAP-Kinase stellt damit einen bedeutenden Signalweg

bei den Thrombozyten-vermittelten Prozessen der frühen Atherogenese dar und könnte ein wesentlicher pharmakologischer Ansatzpunkt sein.

1. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interaction and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; 343: 831-836
2. Baeuerle P, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20
3. Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol* 1999; 162: 5367-5373
4. Baumgartner HR. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I: Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 1977; 37: 1-16
5. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996; 15: 1914-1923
6. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000; 89: 160-167
7. Berry S, Dawicki DD, Agarwal KC, Steiner M. The role of microtubules in platelets secretory release. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1012: 46-56
8. 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), alphavbeta3 integrin, and GPIIbalpha. *J Exp Med* 1998; 187: 329-339
9. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brand R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97: 1715-1722
10. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Eng J Med* 1997; 337: 1360-1369
11. Carlos TM, Schwartz B, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, Rosso M. Vascular-cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990; 76: 965-970

12. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3652-3656
13. Chen YP, O'Toole TE, Shipley T, Forsyth J, LaFlamme SE, Yamada K, Shattil SJ, Ginsberg M. "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 18307-18310
14. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 189-197
15. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 1995; 270: 14843-14846
16. Collins T. Biology of disease. Endothelial nuclear factor- $\kappa$ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508
17. Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, Page TH, Saklatvala J, Foxwell BM. T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *J Biol Chem* 1997; 272: 15023-15027
18. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Let* 1995; 364: 229-233
19. Davies MJ. The contribution of the thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thromb Res* 1996; 82: 1-32
20. Enselen H, Raingeaud J, Davis JR. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 1998; 273: 1741-1748
21. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Scharfl M, Pogatsa-Murray G, Hetzer R, Fleck E, Gawaz M. Changes in platelet membrane surface receptors in heart transplant vasculopathy. *Circulation* 2000; 102: 890-897
22. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 1998; 31: 152-161
23. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91: 1318-1324

24. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--part II: blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 1996; 335: 43-45
25. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250
26. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148: 75-85
27. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemoattractant protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98: 1164-1171
28. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. 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: 1809-1818
29. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999; 99: e1-e11
30. Gawaz MP. Platelet membrane glycoproteins. In: *Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases*. Gawaz MP. Thieme Verlag, Stuttgart, 2001: 30-41
31. dito: 4-24
32. Goebler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Brocker EB, Rapp UR, Ludwig S. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood* 2001; 97: 46-55
33. Goebler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Brocker EB, Rapp UR, Ludwig S. The MKKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 857-865

34. Hackeng CM, Huigsloot M, Pladet MW, Nieuwenhuis HK, van Rijn HJ, Akkerman JW. Low-density lipoprotein enhances platelet secretion via integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 239-247
35. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 808-811
36. Hawiger J. Platelet-vessel wall interactions. Platelet adhesion and aggregation. *Atherosclerosis Reviews*, 1990; 21: 165-181
37. Hawrylowicz CM, Santoro SA, Platt FM, Unanue ER. Activated platelets express IL-1 activity. *J Immunol* 1989; 143: 4015-4020
38. Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20: 2120-2130
39. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopolous I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594
40. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature Medicine* 2003; 9: 61-67
41. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999; 85: 199-207
42. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1591-1601
43. Jing Q, Xin SM, Cheng ZJ, Zhang WB, Zhang R, Qin YW, Pei G. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by oxidized LDL in vascular smooth muscle cells. Mediation via pertussis toxin-sensitive G proteins and association with oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Circ Res* 1999; 84: 831-839
44. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912
45. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokine. *Bioessays* 1996; 18: 567-577

46. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GPP, White JR, Adams JL, Young PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372: 739-746
47. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
48. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247: 349-358
49. Lisnock JM, Tebben A, Frantz B, O'Neill EA, Croft G, O'Keefe SJ, Li B, Hacker C, de Laszlo S, Smith A, Libby B, Liverton N, Hermes J, LoGrasso P. Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity. *Biochemistry* 1998; 37: 16573-16581
50. Loftus JC, Smith JW, Ginsberg M. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J Biol Chem* 1994; 269: 25235-25238
51. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein-1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 601-608
52. Ludwig S, Hoffmeyer A, Goebler M, Kilian K, Häfner H, Neufeld B, Han J, Rapp UR. The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 1917-1922
53. Maher P. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274: 17491-17498
54. Marin V, Farnarier C, Gres S, Kaplanski S, Su MS, Dinarello CA, Kaplanski G. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood* 2001; 98: 667-673
55. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 887-892
56. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia-reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92: 507-512

57. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999; 94: 3829-3838
58. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlhörer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vitro. *J Exp Med*. 2003; 197: 41-49
59. May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta2-integrins in vivo. *J Ex Med* 1998; 188: 1029-1037
60. McIntyre TM, Modur V, Prescott SM, Zimmermann GA. Molecular mechanism of early inflammation. *Thromb Haemost* 1997; 78: 302-305
61. McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 8488-8492
62. Methia N, Andre P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001; 98: 1424-1428
63. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988; 58: 249-261
64. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 842-851
65. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2 beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20: 2120-2130
66. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leucocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359: 848-851
67. Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Koster JF, Sluiter W. P38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 44-48

68. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70: 427-451
69. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; 140: 665-673
70. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Hans J, Ulevitch RJ, Davis R. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426
71. Randolph GJ, Furie MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol* 1995; 155: 3610-3618
72. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanism of platelet exocytosis: insights into the "secret" life of thrombocytes. *Blood* 2000; 96: 3334-3342
73. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136: 1229-1233
74. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180: 1332-1339
75. Ross R. Atherosclerosis: a defense mechanism gone away. *Am J Pathol* 1993; 143: 987-1002
76. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 115-126
77. Rovin BH, Wilmer WA, Danne M, Dickerson JA, Dixon CL, Lu L. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression by human mesangial cells. *Cytokine* 1999; 11: 118-126
78. Ruderman JV. MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 207-213

79. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehm K, Wesselborg S. Regulation of NF-kappaB activation by MAP kinase cascades. *Immunobiol* 1997; 198: 35-49
80. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735
81. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae COC, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; 144: 3034-3038
82. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 50-178
83. Staubesand J. Bau und Funktion der Blutgefäße (Vasa sanguina). In: Benninghoff. *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen.* Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.). Urban und Schwarzenberg, München, 15. Auflage, 1994: 653-685
84. Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 1993; 24: 534-539
85. Thanos D, Maniatis T. NF-kB: A lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532
86. Theilmeier G, Lenarts T, Remacle C, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoïd-endothelial cell interaction under shear stress. *Blood* 1999; 94: 2725-2734
87. Theilmeier G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood* 2002; 99: 4486-4493
88. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94: 295-314
89. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 1223-1229
90. Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant-protein-1 gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 31092-31099

91. Ueda A, Okuda S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF-kappaB and Sp-1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 1994; 153: 2052-2063
92. van Ijzendoorn SCD, Heemskerk JWM, Reutlingsperger CPM. Interactions between endothelial cells and blood platelets. *Endothelium* 1995; 3: 81-98
93. van Zanten GH, de Graf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* 1994; 93: 615-632
94. Vorarberger G, Schäfer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule I and analysis of its 5'-regulatory region. *J Immunol* 1991; 147: 2777-2786
95. Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K. Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 12422-12429
96. Weston C, Lambright DG, Davis RJ. MAP-kinase signaling specificity. *Science* 2002; 296: 2345-2347
97. Zibara K, Chignier E, Covacho C, Poston R, Canard G, Hardy P, McGregor J. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2288-2296

An dieser Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz, für die Bereitstellung des Themas. Er hat als Oberarzt der Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München den Anstoß für diese Promotion gegeben. Gleichzeitig stand er als engagierter Betreuer der Promotion stets mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite und hat durch seine zahlreichen Anregungen wesentlich am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt.

Mein Dank gebührt Kirsten Langenbrink, die als medizinisch-technische Assistentin mit ihrer fachkundigen Beratung und großartiger Mitarbeit zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern kooperierender Arbeitsgruppen, die durch ihre freundliche Zusammenarbeit wertvolle Hilfe geleistet haben.

Schließlich möchte ich meinen lieben Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken. Sie haben mir ein von materiellen Sorgen freies Studium ermöglicht und mir durch kostbare Kritik, Anerkennung und Lob unersetzlich bei dem Erreichen meiner Ziele beigestanden. Ihnen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

## 8 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Christiane Erna Thielen  
Geburt: 24.01.1975 in Darmstadt  
Familienstand: ledig  
Familie: *Vater*: Herbert Thielen, Physiker  
*Mutter*: Maria Thielen, Dipl.-Verwaltungswirtin  
*Schwester*: Ulrike Thielen, Studentin der Betriebswissenschaft  
*Schwester*: Regina Thielen, Studentin der Rechtswissenschaft

### Schulbildung

1982- 1986 Grundschule, *Gundernhausen*  
1986- 1994 Privates Gymnasium *Edith-Stein-Schule, Darmstadt*  
1994 Abitur

### Hochschulstudium

09/1994- 04/1997 Humanmedizin *Justus-Liebig Universität, Giessen*  
09/1995 Physikum  
04/1997- 05/2001 Humanmedizin *Technische Universität, München*  
08/1997 Erstes Staatsexamen  
04/2000 Zweites Staatsexamen  
05/2001 Drittes Staatsexamen

### Berufsausbildung

Praktisches Jahr:  
04- 08/2000 Pädiatrie, *Technische Universität, München*  
08- 12/2000 Herzchirurgie, Heart Institute, *University of Texas, Houston, TX, USA*  
12/2000- 04/2001 Innere Medizin, Kardiologie, *Technische Universität, München*

### **Studienbegleitende Tätigkeiten**

02- 03/1997	Chirurgie-Famulatur, <i>Universitätsklinik Giessen</i>
09-10/1997	Chirurgie-Famulatur, <i>Klinikum Josephinum, München</i>
04- 05/1998	Famulatur in der Kardiologie, <i>Deutsches Herzzentrum München</i>
08- 09/1998	Innere Medizin, Stamford Hospital, <i>Columbia University, N.Y., USA</i>

### **Berufspraxis**

06/2001- 12/20002	Ärztin im Praktikum, Fachbereich Innere Medizin, Kardiologie, <i>Deutsches Herzzentrum, München</i>
12/2002 bis heute	Assistenzärztin, Fachbereich Innere Medizin, Kardiologie, <i>Deutsches Herzzentrum, München</i>