

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III, Schwerpunkt: Kardiologie und
Kreislaufkrankungen**

**Der Einfluss des löslichen
Junctional Adhesion Molecule A
auf die Thrombozytenfunktion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Schwartz, Jessica Katharina
(geb.: Schwanz)**

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Salih

Tag der Disputation: 12.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Hämostase	1
1.2 Physiologie der Thrombozyten und Thrombusbildung	2
1.2.1 Grundlagen.....	2
1.2.2 Initiierung	2
1.2.3 Extension.....	3
1.2.4 Stabilisierung	5
1.3 Pathogenese der Atherosklerose	6
1.4 Das Junctional Adhesion Molecule A (Jam-A)	8
1.5 Fragestellung	10
1.6 Grundlagen zu den durchgeführten Versuchen.....	10
1.6.1 Nachweis von Thrombozytenaktivierung & -degranulation mittels Anti- CD62P und Anti-PAC-1	10
1.6.2 Der Thrombozyten-Agonist ADP	12
1.6.3 Thrombozytenspreizung	12
1.6.4 Apoptose	14
1.6.5 Annexin V – Ein Detektor für frühe Apoptoseaktivität	15
1.6.6 TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) – Ein Marker für intaktes mitochondriales Membranpotenzial	16
1.6.7 Der Thrombozyten-Agonist TRAP	16
1.6.8 Thrombozyten-Monozyten-Aggregate	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Herstellung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP) aus Vollblut	19
2.1.1 Benötigte Materialien.....	19
2.1.2 Durchführung.....	19
2.2 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut / Herstellung gewaschener Plättchen	20
2.2.1 Benötigte Materialien.....	20

2.2.2	Zusammensetzung der selbst hergestellten Pufferlösungen	21
2.2.3	Vorbereitung	21
2.2.4	Durchführung	22
2.3	Monozytenisolation	23
2.3.1	Benötigte Materialien	23
2.3.2	Zusammensetzung des selbst hergestellten Monozytenmediums	23
2.3.3	Durchführung	24
2.4	Durchflusszytometrie (FACS): Aktivierung & Degranulation von Thrombozyten	25
2.4.1	Benötigte Materialien	25
2.4.2	Versuchsdurchführung	25
2.5	Aggregometrie: Optische Messung der Thrombozytenaggregation	26
2.5.1	Benötigte Materialien	26
2.5.2	Versuchsdurchführung	27
2.6	Flusskammer: Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen	29
2.6.1	Benötigte Materialien	29
2.6.2	Technik der Flusskammer	30
2.6.3	Vorbereitung der Deckgläschen	30
2.6.4	Durchführung des Flusskammerversuches	31
2.7	Konfokalmikroskopie / Fluoreszenzmessung: Thrombozytenspreizung	33
2.7.1	Benötigte Materialien	33
2.7.2	Zusammensetzung des selbst hergestellten Puffers	35
2.7.3	Vorbereitung	35
2.7.4	Durchführung für die Auswertung durch Konfokalmikroskopie	36
2.8	FACS-Analyse: Apoptosenachweis mittels Annexin V und TMRE (Tetramethylrhodaminethylester)	37
2.8.1	Benötigte Materialien	37
2.8.2	Durchführung	38
2.9	Flusskammer: Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen	39
2.9.1	Benötigte Materialien	39
2.9.2	Vorbereitung: Anlegen einer Endothelzellkultur (ECV-Zellen)	41
2.9.3	Beschichtung von Deckgläschen mit ECV-Zellen	42

2.9.4	Aktivierung der ECV-Zellen durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) 50 ng/ml und Interferon γ (IFN γ) 20 ng/ml	42
2.9.5	Durchführung des Flusskammerversuches	43
2.9.6	Flusskammerdurchläufe	44
2.10	FACS-Analyse: Nachweis von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten mit Hilfe von Anti-CD42b und Anti-CD14	44
2.10.1	Benötigte Materialien	44
2.10.2	Gewinnung von Monozyten aus einer Monozytenkultur	46
2.10.3	Durchführung	47
2.11	Zellkultur: Monozyten-Makrophagen-Differenzierung	48
2.11.1	Benötigte Materialien	48
2.11.2	Durchführung	49
2.12	Statistik	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Der Effekt von Jam-A auf die Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten	51
3.2	Der Einfluss von Jam-A in Kombination mit ADP auf die Thrombozytenaggregation	52
3.2.1	Aggregation unter der Hinzugabe von ADP	52
3.2.2	Aggregation ohne Hinzugabe von Agonisten	54
3.3	Die Auswirkung von Jam-A auf die Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	59
3.4	Der Einfluss von Jam-A auf die Thrombozytenspreizung	63
3.5	Die Wirkung von Jam-A auf die Phosphatidylexpression von Thrombozyten sowie das mitochondriale Membranpotenzial als Marker für Apoptosevorgänge	65
3.5.1	Ergebnisse für Annexin V	65
3.5.2	Ergebnisse für TMRE	66
3.6	Der Effekt von Jam-A in Kombination mit ADP auf die Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen	68
3.7	Der Einfluss von Jam-A in Kombination mit TRAP auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten	71

3.8	Die Auswirkung von löslichem Jam-A auf die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung.....	75
4	Diskussion.....	77
4.1	Die Auswirkungen von löslichem Jam-A auf die Thrombozytenfunktion und Thrombose.....	77
4.1.1	Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten.....	77
4.1.2	Thrombozytenspreizung.....	78
4.1.3	Thrombozytenaggregation in Kombination mit ADP.....	79
4.1.4	Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen.....	80
4.2	Der Einfluss von löslichem Jam-A auf die Thrombozyteninteraktion mit Monozyten.....	81
4.2.1	Thrombozyten-Monozyten-Aggregate.....	81
4.2.2	Monozyten-Makrophagen-Differenzierung.....	82
4.3	Der Effekt von löslichem Jam-A auf die Thrombozyteninteraktion mit Endothelzellen.....	83
4.4	Mögliche Bedeutung des löslichen Jam-A für die Pathophysiologie der Thrombose und Inflammation.....	85
4.5	Mögliche Konsequenzen für Diagnostik und Therapie.....	86
4.6	Limitationen der dargestellten Ergebnisse.....	86
4.7	Schlussfolgerung.....	87
5	Zusammenfassung.....	89
6	Danksagung.....	91
	Literaturverzeichnis.....	92
	Abbildungsverzeichnis.....	102
	Abkürzungsverzeichnis.....	104
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	106

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Hämostase

Die Hämostase ist ein physiologischer Vorgang, der der Gefäßabdichtung bei Verletzungen dient, um Blutverluste zu vermeiden. Sie wird in drei fließend ineinander übergehende Prozesse unterteilt.

Während der ein- bis dreiminütigen Blutstillung, die auch primäre Hämostase genannt wird, wird aus vielen sich zusammenlagernden Thrombozyten ein so genannter weißer Thrombus gebildet, der die Wunde abdichtet. Die Thrombozyten setzen weiterhin Substanzen frei, die zu einer Vasokonstriktion der Gefäße führen, wodurch die Durchblutung vermindert wird. Auf diesen Abschnitt der Hämostase wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Die sich anschließende Blutgerinnung oder sekundäre Hämostase gewährleistet durch die Bildung eines Fibrinnetzes einen stabilen Wundverschluss. Infolge der Einlagerung von Erythrozyten entsteht ein roter Thrombus [1], [2], [3], [4].

Im letzten Schritt erfolgt die Fibrinolyse, in der sich das Gerinnsel wieder auflösen kann [5]. Eine gute Balance zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Faktoren ist für einen physiologischen Ablauf der Hämostase unerlässlich.

Läuft die streng regulierte Hämostase jedoch in unkontrollierter Weise ab, kann es zur Bildung pathologischer Thromben kommen, die Durchblutungsstörungen verursachen können.

Der stärkste Auslöser für den Ablauf der Gerinnungskaskade ist eine Endothelläsion, die, bedingt durch ein Trauma oder eine Plaqueruptur, zur Freilegung extrazellulärer Matrix führt [6].

1.2 Physiologie der Thrombozyten und Thrombusbildung

1.2.1 Grundlagen

Thrombozyten sind kernlose, bikonkave Scheiben, die mit einem Durchmesser von 2 - 4 μm die kleinsten korpuskulären Bestandteile des menschlichen Blutes darstellen [1], [2]. Gebildet werden sie durch Abschnürung von Zellfragmenten aus Megakaryozyten, die sich im Knochenmark befinden [7]. Eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktoren spielen dabei unter anderem IL-6, IL-11 und ganz besonders das Thrombopoietin [8]. Die normale Anzahl an Thrombozyten liegt zwischen 150.000 – 350.000 pro μl Blut. Pro Tag werden etwa 100 Milliarden Thrombozyten neu produziert [9]. Auf ihrer Zelloberfläche sind sie mit einer Vielzahl von Rezeptoren ausgestattet. Etwa ein Drittel der Thrombozyten wird in der Milz gespeichert. Nach einer mittleren Lebensdauer von etwa 10 Tagen werden sie vom mononukleären Phagozytensystem in der Milz abgebaut [1], [9].

Thrombozyten besitzen ein charakteristisches, oberflächenverbundenes Membransystem (SCS = „*surface connected system*“) aus verzweigten Kanälen, was auch „*open canalicular system*“ genannt wird [10]. Es dient vor allem als Membranreserve.

Die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten im Bereich endothelialer Schädigung beruht auf einem mehrstufigen, sich teilweise überlagernden Prozess, der aus drei Schritten besteht, der Initiierung, der Extension und der Stabilisierung des Thrombus [11].

1.2.2 Initiierung

Im Rahmen einer Verletzung wird ein Kontakt von Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix möglich, welche sich normalerweise sicher abgeschirmt unter den Endothelzellen, die die Gefäßinnenwand bilden, befindet. Besonders relevant für die Thrombozytenadhäsion sind freiliegende Typ I- und III-Collagenfasern des Gefäßsubendothels [12], [13]. An diese Collagenfasern bindet rasch der von-Willebrand-Faktor (vWF), der mit dem GPIb des GPIb-IX-V-

Komplexes (= von-Willebrand-Rezeptor) auf den Thrombozyten eine Bindung eingeht. Der vWF wird von den Endothelzellen und in geringerer Menge von Megakaryozyten gebildet. Bis zu 20 % des vWF werden aus den α -Granula der aktivierten Thrombozyten freigesetzt [14]. Zunächst liegt der vWF im Plasma in inaktiven Multimeren vor, die erst nach ihrer Spaltung durch eine Metalloproteinase, das ADAMTS13, in die aktiven Bruchstücke überführt werden. Durch den Scherstress im Gefäßsystem, der durch unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten innerhalb des Gefäßlumens bedingt ist, geht der vWF in seine langgestreckte, aktive Form über [11]. Bedingt durch die Haftung des vWF an seinen Rezeptor, den GPIb-IX-V-Komplex, den zweithäufigsten Rezeptor auf Thrombozyten, bildet der Thrombozyt aufgrund der Scherbeanspruchung im Blutfluss sogenannte „tether“ aus. Dies sind lange Membranausstülpungen [15], [16].

Die Collagenbindung an den GPVI/FcR γ -Rezeptor (Collagenrezeptor) [17] löst die primäre Aktivierung des Thrombozyten aus, was über verschiedene Signalkaskaden zum Anstieg des intrazellulären Calciums führt.

Diese intrazellulären Signalprozesse aktivieren Integrin $\alpha_{IIb}\beta_1$ (Collagenrezeptor) und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor / GPIIb-IIIa) [18]. Dies gewährleistet eine feste Bindung der noch scheibenförmigen (diskoiden) Thrombozyten in Form eines Thrombozytenmonolayers an das Subendothel [11].

1.2.3 Extension

Nach dieser initialen Adhäsion wird im nächsten Schritt der Thrombozytenaktivierung ein thrombozytenreicher Thrombus erstellt. Dies gelingt durch Rekrutierung weiterer Thrombozyten sowie die Thrombozytenaggregation durch Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches über die Bindung von Fibrinogen und des vWF zu einer irreversiblen Quervernetzung der Thrombozyten führt [19].

Die zuvor beschriebene Adhäsion der Thrombozyten stellt eine Voraktivierung dar, welche die Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin oder Thromboxan A₂ (TxA₂) und die irreversible Aktivierung der Thrombozyten nach sich zieht. Alle diese Mediatoren binden an G-Protein-

gekoppelte Rezeptoren, was eine erhebliche Signalverstärkung während der intrazellulären Signalkaskade zur Folge hat [11].

Einen guten Überblick über die Mechanismen der Thrombusformation bietet die Abbildung 1.

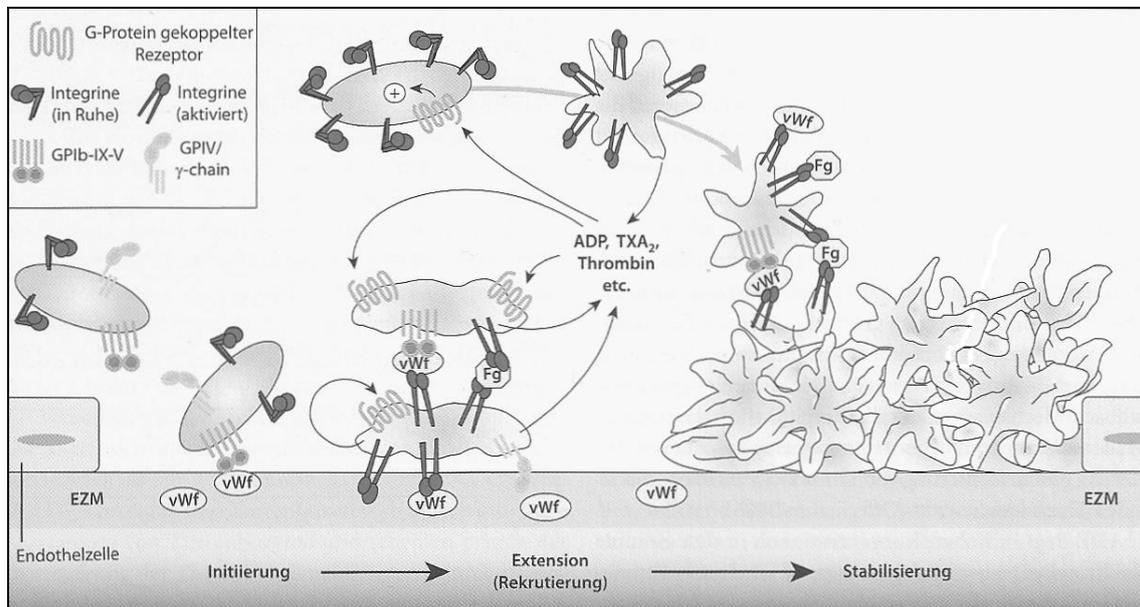


Abbildung 1: Mechanismen der Thrombozytenaktivierung im Bereich einer Endothelläsion. ADP = Adenosindiphosphat, EZM = extrazelluläre Matrix, Fg = Fibrinogen, GP = Glykoprotein, TXA₂ = Thromboxan A₂, vWf = von-Willebrand-Faktor (Pötzsch et al., 2010)

Thrombozyten enthalten drei Arten von Granula, deren Inhaltsstoffe entweder auf die umgebenden Gefäßzellen, weitere Thrombozyten (parakrin) oder auf die Thrombozyten selbst wirken (autokrin).

Zuerst werden die sogenannten dichten Granula, auch δ -Granula genannt, ausgeschüttet. Von ihnen befinden sich circa drei bis neun Stück in einem Thrombozyten [11]. Sie enthalten unter anderem Serotonin, das zur Gefäßkonstriktion sowie zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten führt. Das in den dichten Granula enthaltene Calcium stellt unter anderem für die sich anschließende Blutgerinnung eine unverzichtbare Voraussetzung dar. Das freigesetzte ADP wirkt auto- sowie parakrin und bindet an die auf der Thrombozytenoberfläche lokalisierten ADP-Rezeptoren. Das Thromboxan A₂, welches ebenfalls eine

wichtige Rolle bei Gefäßkonstriktion und der weiteren Thrombozytenaktivierung spielt, wird außerhalb der Granula im Cytosol der Thrombozyten gebildet.

Den dichten Granula folgen die α -Granula, die für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten wichtig sind [8]. Enthalten sind zahlreiche Proteine wie Fibrinogen, weitere Gerinnungsfaktoren sowie der vWF [7], aber auch Wachstumsfaktoren, Membranproteine, antimikrobielle Peptide und Immunmodulatoren, Chemokine sowie antikoagulatorische Faktoren. Die α -Granula sind mit etwa 80 Stück pro Thrombozyt die zahlreichsten und größten sekretorischen Organellen [11]. Sie sind von einem eigenen F-Aktin-Zytoskelettmantel umgeben, der die hochaktiven Granulainhaltsstoffe vor einem ungewollten Freiwerden schützen soll [20].

Die letzte Gruppe der Granula bilden die lysosomalen Granula, die nur vereinzelt im Thrombozyten vorkommen und hydrolytische Enzyme wie saure Hydrolasen, Elastase, Kathepsine oder Collagenasen enthalten [11]. Die lysosomalen Granula werden hier der Vollständigkeit wegen erwähnt, spielen aber bei der Thrombusformation keine Rolle.

Durch Aktin-Myosin-Interaktionen bilden sich mehrere Mikrometer lange Zellausläufer, die Pseudopodien, mit denen die Thrombozyten die Wunde durch eine verbesserte Haftung an sich selbst und am Endothel verschließen können [12], [13]. Im Kapitel 1.6.3 wird detailliert auf diese Formveränderung des Thrombozyten, den „*Shape Change*“, beziehungsweise das Spreizen der Thrombozyten eingegangen.

Darüber hinaus werden gerinnungsaktive Phospholipide wie das negativ geladene Phosphatidylserin von der Membranınnenseite auf die Außenseite transferiert, was ein wichtiger Cofaktor für die sich anschließende Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase ist [12], [13].

1.2.4 Stabilisierung

Die Fibrinogenbindung an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Thrombus spielt. Insbesondere die dadurch ausgelöste Tyrosinphosphorylierung der β_3 -

Untereinheit des Integrins scheint dabei bedeutsam zu sein. Des Weiteren kommt es durch aktomyosinbasierte Kontraktion der Thrombozyten zu einer weiteren Stabilisierung des Thrombus [11].

1.3 Pathogenese der Atherosklerose

Nach der „Response-to-injury-Theorie“ von Glomset und Ross [21] liegt die Ursache der Atherosklerose in einer entzündlichen Reaktion der Gefäßwand auf oxidiertes LDL-Cholesterin („*Low-Density-Lipoprotein*“-Cholesterin“).

Zu Beginn kommt es zu einer atherosklerotischen Frühläsion, die als „*fatty streaks*“ bezeichnet wird. Dabei lagert sich überschüssiges LDL-Cholesterin in der Intima der Gefäßwände ein, wo die Lipidanteile oxidiert werden. Dies verursacht eine lokale inflammatorische Reaktion. Die von Endothel- und glatten Muskelzellen ausgeschütteten Zytokine und Prostaglandine bedingen eine Einwanderung von Makrophagen. Die Makrophagen phagozytieren das oxidierte LDL-Cholesterin über Scavenger-Rezeptoren, wobei die Problematik darin besteht, dass dabei kein negativer Rückkoppelungsmechanismus ausgelöst wird und die Makrophagen immer mehr LDL anreichern. Es kommt zur Transformation zu so genannten Schaumzellen. Platzen diese auf, werden die gespeicherten Lipide freigesetzt und es bildet sich ein Lipidkern, der auch als Nekrosekern bezeichnet wird. Die Schaumzellen sezernieren außerdem Mediatoren, die zu einer Migration glatter Muskelzellen aus der Tunica media in die Intima führen. Diese bilden eine fibröse Kappe aus, die dem atherosklerotischen Plaque entspricht. Es ist die fibrös-fettige Intermediärläsion entstanden [13], [22], [23], [24].

Entsprechend der Zusammensetzung der Plaques werden das Atherom (hoher Fettanteil) vom fibrösen Plaque (hoher Bindegewebsanteil) und dem ausgeglichen zusammengesetzten Fibroatherom unterschieden [24].

Eine Mikrovaskularisierung kann eine Einblutung in die Plaques herbeiführen. Größere Plaques lagern mit der Zeit Calcium ein [24].

Bedingt durch die Atherosklerose entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion, so dass es zu einer verminderten endothelialen Vasodilatation mit paradoxer Vasokonstriktion kommt [24].

Bei einer Plaqueruptur, bei der das geschädigte Endothel aufreißt oder der Fettkern bis zum Gefäßlumen durchbricht, wird das Gerinnungssystem aktiviert, was bis zu einem Verschluss des bereits zuvor verengten Gefäßes führen kann [25], [26], [27]. Gefördert wird die Gefahr einer Plaqueruptur durch die von den Monozyten sezernierten matrixdegenerierenden Enzyme, die die fibröse Kappe zunehmend ausdünnen. Die Plaques werden somit instabil [24].

Der Begriff Atherosklerose wird häufig synonym zur Arteriosklerose verwendet. Atherosklerose weist sprachlich auf das Atherom in der geschädigten Gefäßwand hin, wohingegen Arteriosklerose auf die Versteifung der gesamten arteriellen Gefäße verweist, die unter anderem durch die Atherosklerose verursacht wird [24].

1.4 Das Junctional Adhesion Molecule A (Jam-A)

Das Glykoprotein Jam-A, welches auch als Jam-1, CD321 oder F11R bezeichnet wird, ist ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie [28], [29], [30] mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen [31], [32] (Abbildung 3). In Abbildung 2 ist eine abgewandelte Form des Jam-A mit nur einer Domäne dargestellt, das Jam-A D1. Erstmals erwähnt wurde Jam-A, nachdem es auf der Oberfläche von Thrombozyten entdeckt wurde [33].

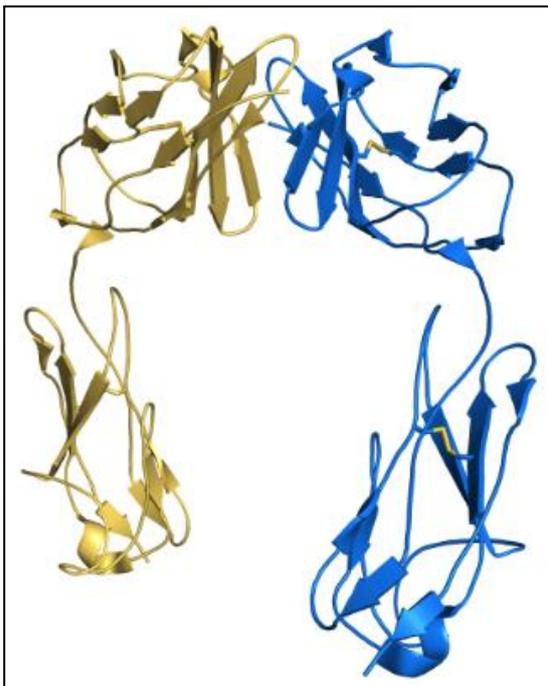


Abbildung 3: Struktur des natürlich vorkommenden Moleküls Jam-A D1/D2 mit zwei Domänen (Prof. Dr. Thilo Stehle, Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen)

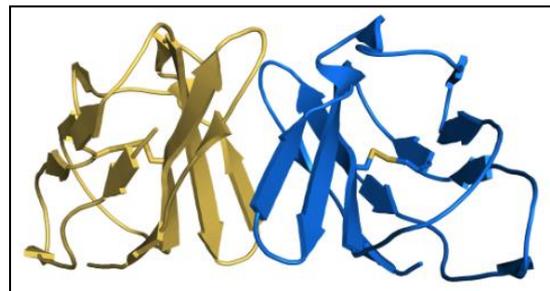


Abbildung 2: Struktur einer abgewandelten Jam-A-Form mit nur einer Domäne (Jam-A D1) (Prof. Dr. Thilo Stehle, Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen)

Jam-A kann in Form eines Rezeptors als Transmembranprotein [34] oder in löslicher Form vorliegen. Woher die lösliche Form stammt, ist bisher noch nicht bekannt [35]. Die Jam-Gruppe umfasst neben Jam-A noch zwei ähnlich gebaute Proteine, das Jam-B und das Jam-C. Eine JAM-Untergruppe bilden die Proteine „Coxsackie- und Adenovirusrezeptor“ (CAR), „endothelselektives Adhäsionsmolekül“ (ESAM), JAM-4 und JAML [36].

Das Jam-A Gen ist aus 13 Exons zusammengesetzt [30] und ist durch zwei Immunglobulinfallen (VH- und C2-Typ) gekennzeichnet [28], [36].

Jam-A hat Einfluss auf die Adhäsion [28], [37], [38], Aggregation [38], [39], [40], [41] und Sekretion von Thrombozyten [38], [39], [40]. Exprimiert werden kann

Jam-A von CD34-positiven Zellen [42], Endothel-, Epithelzellen sowie zirkulierenden Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten [32], [36], [43], [44]. Auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen kann Jam-A bereits nachgewiesen werden [43]. Allerdings nimmt der Anteil der Jam-A-positiven Zellen im Laufe der Entwicklung ab [45]. Die Jam-A-Effekte werden vermutlich zumindest zum Teil durch die Vernetzung von Jam-A mit dem FcγRIIA-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche ausgelöst [28], [32], [38], [40].

Jam-A stellt eine Transmembrankomponente der „*tight-junctions*“ zwischen Endothelzellen [32], [46], [47], [48] beziehungsweise Epithelzellen dar [48], [49], [50]. Die Bildung von Homodimeren [33], [48] innerhalb der „*tight-junctions*“ scheint wichtig für die Barrierefunktion der Epithelzellen zu sein [51]. In Epithelzellen scheint Jam-A eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der apikal-basalen Polarität zu spielen [49].

Jam-A scheint eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Thrombosen und Arteriosklerose zu spielen [41], [52]. Eine beeinträchtigte Jam-A-Expression in Endothelzellen reduziert mononukleäre Zellrekrutierung in die Arterienwand und begrenzt die Entstehung von Arteriosklerose [53], [54]. Lösliches Jam-A scheint die mononukleäre Zellrekrutierung auf entzündetes oder arteriosklerotisch verändertes Endothel zu vermindern [54].

Endotheliales membranständiges Jam-A führt zu festen Verbindungen zwischen Thrombozyten und aktivierten, beziehungsweise entzündeten Endothelzellen [35], [37], [41]. In den Thrombozyten werden durch diese Vernetzung Aktin-Filament-Baugruppen aktiviert, die eine Umwandlung der ruhenden, diskoiden Blutplättchen in ihre aktivierte Form auslösen. Des Weiteren kommt es zur Bildung von Blutplättchenaggregaten. In arteriosklerotischen Plaques konnte sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen eine Überexpression von Jam-A nachgewiesen werden [29], [35], [41]. Ferner führt eine solche Aktivierung zu einer Erhöhung der Menge an freiem intrazellulärem Calcium. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Jam-A und Agonisten der Thrombozytenaggregation wird diese verstärkt [55].

Auch bei der Kontrolle der Gefäßdurchlässigkeit und der Transmigration von Leukozyten [43] und Monozyten [56] durch Endothelzellen scheint Jam-A eine wichtige Rolle zu spielen [44], [50], [53].

Weiterhin vermittelt Jam-A die Differenzierung von CD34-positiven Zellen und Endothelzellen, womit die Reendothelialisierung erleichtert wird [42].

Außerdem spielt Jam-A eine wichtige Rolle bei der FGF2-induzierten Angiogenese (FGF2 = „*Fibroblast Growth Factor*“ = Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2) [32], [57].

1.5 Fragestellung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen bei den Todesursachen in Deutschland an erster Stelle [58]. Einer der Hauptrisikofaktoren, die Arteriosklerose, wurde von mehreren Forschergruppen bereits mit dem Protein Jam-A in Verbindung gebracht. Gerade in der Grundlagenforschung liegen diesbezüglich erst wenige Daten vor. Daher soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des Einflusses des löslichen Proteins Jam-A auf die Funktion der Thrombozyten führen und Schlüsse auf die Pathogenese der Thrombose zulassen.

Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang der Einfluss auf die Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten, die Aggregation, die Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen, das Überleben der Thrombozyten sowie Interaktionen der Thrombozyten mit Monozyten oder dem Endothel.

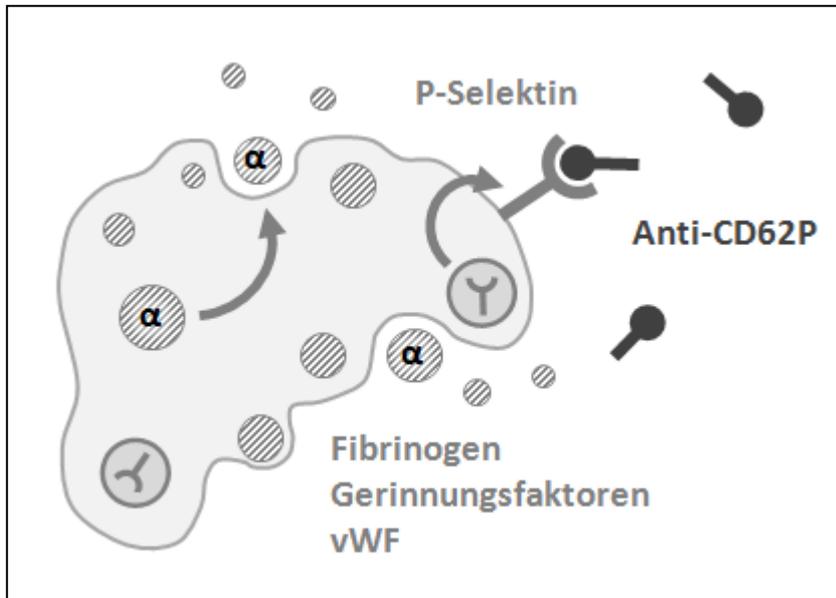
Außerdem soll der Einfluss von löslichem Jam-A auf die Thrombozytenpreisung ermittelt werden.

1.6 Grundlagen zu den durchgeführten Versuchen

1.6.1 Nachweis von Thrombozytenaktivierung & -degranulation mittels Anti-CD62P und Anti-PAC-1

Das Antigen CD62P ist auch als P-Selektin oder Immunglobulin-Selektin bekannt. CD62P ist ein Indikator und der Goldstandard für die Aktivierung von

Thrombozyten [59] und für die Ausschüttung von α -Granula [7]. Im aktivierten Zustand werden die Rezeptoren an die Oberfläche der Thrombozyten transportiert, woran der spezifische Antikörper (Anti-CD62P-FITC) binden kann (siehe Abbildung 4) [60].



Es vermittelt die Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten. Weiterhin ist das CD62P-Antigen verantwortlich für die rollende Bindung von Neutrophilen an aktiviertem Endothel [61].

Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Wirkung von CD62P (P-Selektin) (eigene Darstellung)

Einen sehr wichtigen Stellenwert nimmt dabei das P-Selektin-abhängig freigesetzte Zytokin RANTES („*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*“) ein, welches auch unter dem Namen CCL5 („*CC-chemokine ligand 5*“) zu finden ist. Freigesetzt von aktivierten Thrombozyten wird es auf der Oberfläche von Endothelzellen präsentiert und führt unter anderem zur Rekrutierung von Monozyten [62], [63], was einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese der Arteriosklerose leistet.

PAC-1 ist ein Indikator für den Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor auf aktivierten Thrombozyten [64]. Er ist auch unter den Namen Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor, CD41, beziehungsweise CD61 bekannt, bindet Fibrinogen und ist an der Blutgerinnung beteiligt [13] (siehe Abbildung 5).

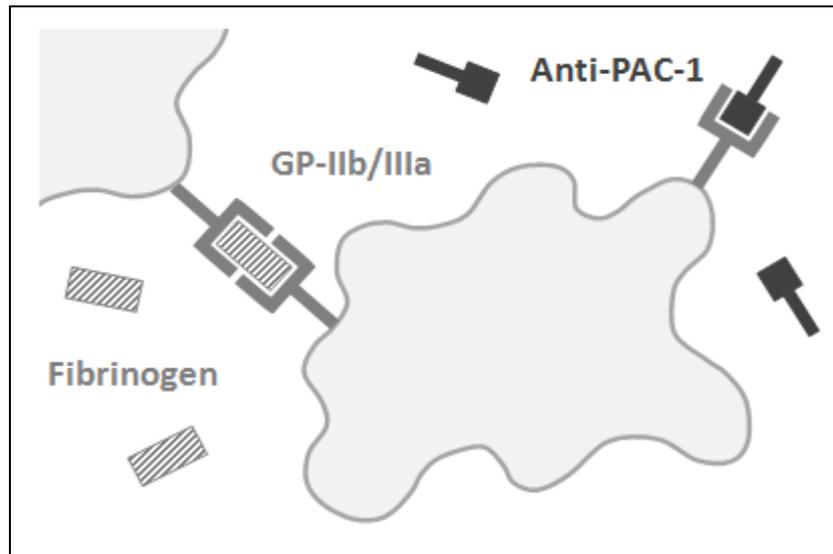


Abbildung 5: Schematische Übersicht zum Einsatzgebiet von PAC-1
(eigene Darstellung)

1.6.2 Der Thrombozyten-Agonist ADP

ADP stammt vor allem aus den δ -Granula der Thrombozyten. Über die Bindung an seine Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$, die auf der Thrombozytenoberfläche lokalisiert sind, kommt es zu einer weiteren Verstärkung der Thrombozytenaktivierung. Diese Rezeptoren sind außerdem von großer Wichtigkeit für die ADP-gesteuerte Thrombozytenaggregation. Beides sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, so dass es durch die sich anschließende Signalkaskade zu einer Verstärkung des Eingangssignals kommt. Ein klinisch häufig eingesetzter Thrombozytenaggregationshemmer ist das Clopidogrel, ein irreversibler Blocker des $P2Y_{12}$ -Rezeptors [65], [66].

1.6.3 Thrombozytenspreizung

Zum besseren Verständnis der Thrombozytenspreizung („*spreading*“) werden im Folgenden einige grundlegende Informationen zum thrombozytären Zytoskelett aufgeführt.

Grundsätzlich besteht das Zytoskelett aus drei Komponenten, aus Aktinfilamenten, Spektrin und Mikrotubuli [11], [67].

Aus etwa zwei Millionen Aktinmolekülen [68] bilden sich 2000 bis 5000 Aktinpolymere in einem Thrombozyten. Diese polaren Polymere erzeugen ein stabiles dreidimensionales Netzwerk [69]. Das Aktin ist durch Tubulin A miteinander verbunden und verknüpft das Aktin mit dem zytoplasmatischen Schwanz des von Willebrand-Rezeptors GPIIb α . Adducin vermittelt die Verbindung zwischen Membran- und Zytoskelett.

Das Spektrin formiert mit ungefähr 2000 Molekülen pro Thrombozyt ein zweidimensionales Membranskelett und bindet direkt an die darüber liegende Plasmamembran [70].

Ein einzelner randständiger Mikrotubulus ist für die Scheibenform des Thrombozyten in der Ruhephase verantwortlich. Es handelt sich bei den Mikrotubuli um stabile, hohle Polymere, die aus heterodimeren Tubulinuntereinheiten aufgebaut sind [71]. Zur Längenverkürzung sind sie 8 - 12-mal zu einer Spule verdreht. Zusätzlich zu ihrer stabilisierenden Aufgabe besitzen die Mikrotubuli die Motorproteine Dynein und Kinesin. Das Dynein ist ein Minus-Ende-Motorprotein und kann zelluläre Fracht zum Minusende transportieren [72]. Kinesine sind Plus-Ende-Motorproteine, die Vesikel zur Peripherie der Zelle bringen [73].

Bei der Aktivierung der Thrombozyten folgt die Formveränderung („*Shape-Change*“) einem reproduzierbaren zeitlichen Ablauf [74]. Zuerst geht die Scheibenform verloren, woraufhin sich der Thrombozyt abkugelt und eine sphärische Form annimmt. Diese Formveränderung erfolgt nach Rezeptorbindung und wird durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultiert aus der Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern sowie durch Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran [74]. Nun bilden sich in der Zellperipherie des Thrombozyten fingerähnliche Zellausläufer, die Filopodien (Echinosphärozyten). Daraufhin flachen die Plättchen über einer Oberfläche ab und es verlängern sich breite Lamellen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Granula und Organellen dicht im Zentrum der Zelle zusammengedrängt. Der Thrombozyt ähnelt jetzt einem Spiegelei. Im letzten Stadium stülpen sich mehrere Bereiche der Zellmembran nach innen und werden anschließend in die Zellperipherie rotiert [67].

Zum Erreichen der Kugelform müssen sowohl die Mikrotubuli-Spule als auch das starre Aktinnetzwerk remodelliert werden [68]. Dazu werden die langen Aktinfilamente durch das Protein Gelsolin, welches für die Aktivierung eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration benötigt, in viele kurze Filamente zerlegt. Für das Spreizen der Thrombozyten werden die kurzen, randständigen Aktinfilamente durch Anlagerung von Aktinmonomeren, welche in einem Komplex mit β 4-Thymosin vorliegen, wieder verlängert. So kommt es zur Bildung der Filopodien [67].

1.6.4 Apoptose

Die Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, kann von den Zellen selbst oder von außen eingeleitet werden und spielt eine wichtige Rolle bei mehrzelligen Organismen. Beide Wege führen zu einer Aktivierung einer ganzen Kette von so genannten Caspasen. Ihren Namen haben diese Enzyme daher, dass es sich dabei um Cystein-Proteasen handelt, die hinter Aspartat schneiden [75].

Anders als bei der Nekrose kommt es dabei nicht zu einer ausgeprägten Immunreaktion.

Eine Schlüsselstellung bei den Apoptosevorgängen besitzen die Mitochondrien. Gelangt das Cytochrom c, ein Elektronentransporter der Atmungskette, der auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, ins Zytosol, wird die Apoptosekaskade eingeleitet [13], [76]. In gesunden Zellen inhibiert die Bcl-2-Proteingruppe die pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax, die den Austritt des Cytochrom c einleiten [77], [78]. Es wird nach dem „molekularen Uhr-Modell“ vermutet, dass aufgrund einer kürzeren Halbwertszeit der Bcl-2-Gruppe gegenüber den pro-apoptotischen Proteinen die Menge nach 10 Tagen nicht mehr ausreicht, um diese zu inhibieren, so dass die Apoptose eingeleitet wird [79], [80]. Besonders entscheidend für das thrombozytäre Überleben scheint Bak zu sein. Bei Bak-defizienten Mäusen konnte das Thrombozytenüberleben verdoppelt und eine Thrombozytose festgestellt werden [9], [79].

Die Apoptose zieht mehrere morphologische Veränderungen der Zelle nach sich. Die untergehende Zelle löst sich aus dem Zellverbund, Zellkern und Zytoplasma kondensieren, das heißt sie verklumpen und schrumpfen [81]. Außerdem stülpt sich die Zellmembran aus, so dass sich kleine Vesikel, die Apoptosekörper, bilden, die gut von Makrophagen phagozytiert werden können [13]. Des Weiteren wird das stark negativ geladene Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche verlagert [76], [81], [82]. Das Auslagern des Phosphatidylserins wird allerdings auch durch einige Agonisten der Thrombozytenaggregation ausgelöst [9], [83], [84]. Dieses wird von Rezeptoren auf den Makrophagen erkannt und fördert die Phagozytose der sich bildenden Apoptosekörper.

Murphy et al. stellten das „*multiple-hit model*“ auf, mit welchem sie sich das Thrombozytenüberleben erklärten. Demnach sei die Lebensspanne der Thrombozyten abhängig von der Anzahl der erlittenen Schädigungen und ihrer Fähigkeit, Schädigungen zu widerstehen [85], [86], [87].

1.6.5 Annexin V – Ein Detektor für frühe Apoptoseaktivität

Annexin V gehört zur Familie der Phospholipid-Bindungsproteine, die in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen mit hoher Affinität an negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin binden [88], [89]. Da die Translokation des Phosphatidylserins von der Innenseite der Plasmamembran auf die Zelloberfläche gleich zu Beginn der Apoptose stattfindet, zeigt Annexin V einen frühen Zeitpunkt der Apoptose an, noch bevor es zu einer Kondensation der DNA gekommen ist. Auf der Zelloberfläche kann Phosphatidylserin spezifisch durch Anfärben mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Annexin V (Annexin-V-FITC) detektiert [89] und durch Verwendung der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden [82]. Folglich ist ein Anstieg des Annexin V-Spiegels ein Zeichen für den Tod der Zelle.

1.6.6 TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) – Ein Marker für intaktes mitochondriales Membranpotenzial

TMRE ist ein rot-oranger fluoreszierender, membranpermeabler Farbstoff mit positiver Ladung, der sich gut in Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial anreichert. Daher lässt er sich zur Markierung von aktiven Mitochondrien in lebenden Zellen einsetzen [90]. Sinkt der TMRE-Spiegel, ist dies ein Zeichen für den Tod der Zelle.

Mitochondrien sind ovale Zellorganellen, die den wichtigsten Ort der Energiegewinnung in eukaryotischen Zellen darstellen. Sie bestehen aus zwei Membranen, wovon die äußere glatt und für kleine Proteine und Moleküle recht durchlässig ist. Die innere Membran, welche sehr stark gefaltet ist, bildet zur Oberflächenvergrößerung so genannte Cristae aus. Der Bereich zwischen beiden Membranen wird als Intermembranraum bezeichnet. Das Innere der Mitochondrien wird Matrixraum genannt. An der inneren Membran befinden sich die Komplexe der Atmungskette sowie die Adenosintriphosphat-Synthase (ATP-Synthase). Die Atmungskette fungiert als Elektronentransportkette und befördert Elektronen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht. Daraus resultiert im Inneren der Mitochondrien ein negatives Membranpotential, der Intermembranraum ist nun positiv geladen. Dieser Elektronengradient wird dazu benutzt, um im Vorgang der oxidativen Phosphorylierung Energie in Form von ATP herzustellen [13].

1.6.7 Der Thrombozyten-Agonist TRAP

Beim TRAP („*thrombin receptor-activating peptide*“), einem synthetisch hergestellten Protein, welches an den Thrombinrezeptor PAR-1 (protease-aktivierter Rezeptor) der Thrombozyten bindet, handelt es sich um einen äußerst wirksamen Thrombozytenaktivator [91], [92], [93], [94]. Es kann anstelle von Thrombin eingesetzt werden, was sich aufgrund der höheren Stabilität von TRAP anbietet. Durch Medikamente wie Aspirin oder Clopidogrel wird seine Wirkung nicht beeinträchtigt. TRAP kann diagnostisch zur Wirkungserfassung von GPIIb/IIIa-Antagonisten eingesetzt werden (z. B. Reopro, Aggrastat oder Integrillin).

1.6.8 Thrombozyten-Monozyten-Aggregate

Die Monozytenadhäsion an entzündetes Endothel stellt einen sehr wichtigen Faktor für die Entwicklung von Arteriosklerose dar [26], [95], [96], [97]. Dabei wurde für Thrombozyten-Monozyten-Aggregate eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen festgestellt, was zu einem erhöhten atherogenen Potenzial führen könnte [98]. Verantwortlich für die erste Bindung zwischen aktivierten Thrombozyten und Monozyten ist die Interaktion von P-Selektin und dem „P-Selektin-Glykoproteinligand-1“ (PSGL-1). Dieser Ligand ist sowohl auf Thrombozyten als auch auf den meisten Leukozyten, wie auch Monozyten lokalisiert [99]. Diese Interaktionen spielen auch bei der Haftung der Komplexe an arteriosklerotischen Thromben eine Rolle [100]. Die nachgeschaltete Bindung des CD40-Liganden auf Thrombozyten mit dem CD40 auf Monozyten führt zu einer Aktivierung des Monozyten sowie zu einer Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine [101], [102].

Zum Nachweis der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate *in vitro* mittels der Durchflusszytometrie wurde für beide Zellarten je eine typische Oberflächenstruktur gewählt, die mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht werden konnte. In diesem Fall waren das CD42b für Thrombozyten und CD14 für Monozyten. Doppelt-positive Zellen für CD42b und CD14 wurden dementsprechend als Thrombozyten-Monozyten-Aggregate gewertet. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 6. In der Punktwolkendarstellung im Ergebnisteil befinden sich diese Aggregate im oberen rechten Quadranten. Eine schematische Darstellung befindet sich in Abbildung 7.

CD42b („*Cluster of differentiation*“) ist ein Synonym für das Glykoprotein Ib, welches auf Thrombozyten als Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor im Rahmen der Hämostase dient [13]. Daher kann ein Antikörper dagegen als Marker für Thrombozyten eingesetzt werden. Durch eine Fluoreszenzmarkierung mit dem roten Farbstoff Phycoerythrin (PE) werden die Thrombozyten im FACS erfassbar.

CD14 ist ein Glykoprotein, welches vor allem auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen gebildet wird [103]. Es hat die Aufgabe der Opsonierung

von bakteriellen Fettsäuren und Peptidoglykanen [104]. Es markiert also Fremdkörper und ermöglicht die Phagozytose durch beispielsweise Granulozyten oder Makrophagen. FITC ist ein gelbgrüner Fluoreszenzfarbstoff, der im FACS registriert werden kann.

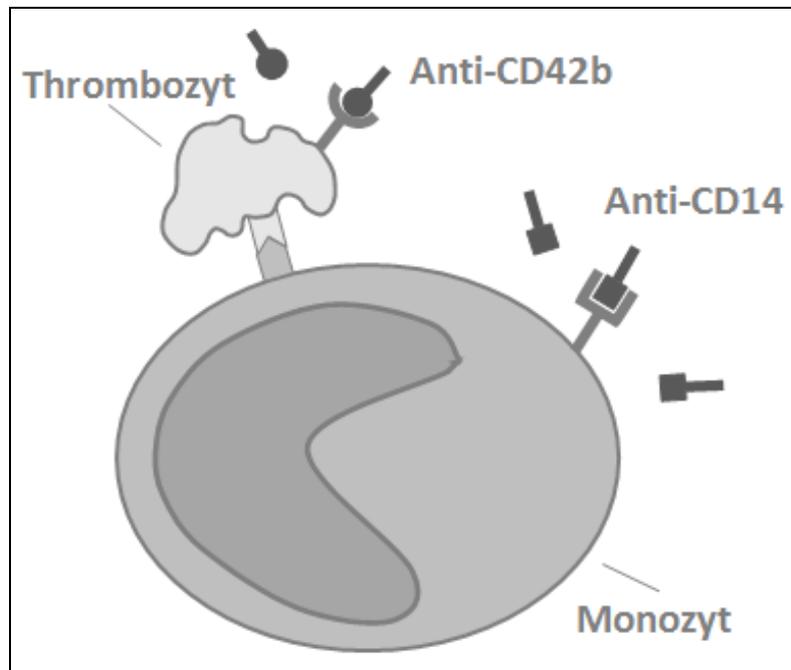


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten (eigene Darstellung)

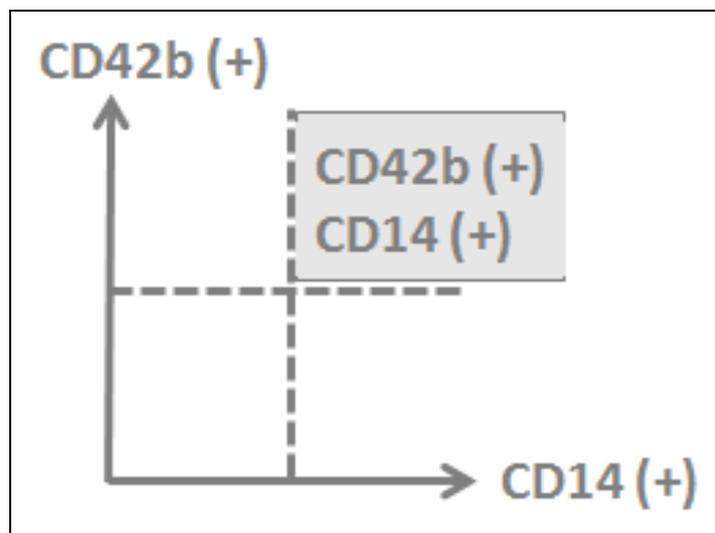


Abbildung 7: Illustration des Quadranten UR („upper right“) in der Durchflusszytometrie mit doppel-positiven Zellen. In diesem Versuch sind das die für CD42b und CD14 doppel-positiven Thrombozyten-Monozyten-Aggregate (eigene Darstellung).

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP) aus Vollblut

2.1.1 Benötigte Materialien

Geräte

Systemex (Zellzählautomat)	Systemex Deutschland GmbH, Nordstedt, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Proben

PRP („ <i>platelet rich plasma</i> “ / thrombozytenreiches Plasma) aus venösem CPDA-Blut (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin)	gesunde humane Spender
PPP („ <i>platelet poor plasma</i> “ / thrombozytenarmes Plasma) aus venösem CPDA-Blut	gesunde humane Spender

2.1.2 Durchführung

Vorbeschrieben ist diese Herangehensweise in [105]. Von gesunden Spendern werden vier CPDA-Röhrchen venöses Vollblut abgenommen und bei 209 g für 20 min. ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Überstand befindet sich thrombozytenreiches Plasma („*platelet rich plasma*“ = PRP). Dieses wird bis auf einen Rest mit einer Pasteurpipette in 15 ml Falcons überführt. 100 µl des PRPs werden am Systemex, einem automatischen Zellzählautomaten, analysiert, um die Anzahl der Thrombozyten zu bestimmen.

Um das plättchenarme Plasma („*platelet poor plasma*“ = PPP) zu erhalten, werden die CPDA-Röhrchen ein weiteres Mal zentrifugiert und zwar bei 2000 g für

10 min. mit Bremse bei Raumtemperatur. Das PPP, welches sich im Überstand befindet, wird ebenfalls mit einer Transferpipette in ein 15 ml Falcon überführt.

2.2 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut / Herstellung gewaschener Plättchen

2.2.1 Benötigte Materialien

Geräte

pH-Meter: HI 9025 microcomputer	Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Präzisionswaage	Denver Instrument / Sartorius, Bohemia, New York
Rührgerät mit Rührfischchen: IKA-MAG® RCT	IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Sterilbank Heraeus®	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Systemex (Zellzählautomat)	Systemex Deutschland GmbH, Nordstedt, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

1 N Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin Fraktion V (pH 7,0)	AppliChem Panreac ITW Companies, Chicago, Illinois, USA
D(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Puffer

steriler ACD-Puffer (Zitronensäure-	eigene Herstellung
-------------------------------------	--------------------

Citrat-Dextrose-Puffer)

Tyrodes 10x eigene Herstellung

Tyrodes-Puffer pH 6,5 eigene Herstellung

Probe

ACD-Vollblut gesunde humane Spender

2.2.2 Zusammensetzung der selbst hergestellten Pufferlösungen

ACD-Puffer:

12,5 g Natriumcitrat

6,82 g Zitronensäure

10 g Glukose

Aqua dest. ad 500 ml und mit NaOH auf pH 4,6 einstellen

Tyrodes-Puffer (10x):

80 g Natriumchlorid

10,15 g Natriumhydrogencarbonat

1,95 g Kaliumchlorid

Aqua dest. ad 1000 ml

Tyrodes-Gebrauchslösung:

20 ml Tyrodes-Puffer (10x)

0,2 g BSA

0,2 g Glukose

Aqua dest. ad 200 ml

2.2.3 Vorbereitung

Vor der Blutentnahme müssen ein bis zwei 20 ml-Spritzen mit 4 ml sterilem ACD-Puffer (Zitronensäure-Citrate-Dextrose-Puffer), der bei 4 °C für einige Tage im Kühlschrank gelagert werden kann, gefüllt werden. Um eine vorzeitige Gerinnung des abgenommenen Blutes zu verhindern, sollten die so präparier-

ten Spritzen einige Minuten bei 37 °C im Brutschrank angewärmt werden. Verschluss werden die Spritzen mit einem Membranadapter.

2.2.4 Durchführung

Zuvor beschrieben ist diese Methode in [106]. Je 10 ml des abgenommenen Blutes werden direkt aus der Spritze sehr langsam in ein schräg gehaltenes 15 ml Falcon gegeben, so dass das Blut die Wand herabrinnen kann. Die Falcons werden jetzt bei 209 g für 20 min. bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert.

Währenddessen wird der benötigte Tyrodes-Puffer mit pH 6,5 hergestellt. Die genaue Zusammensetzung des Puffers befindet sich im Anhang. Für die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wird ein pH-Meter benötigt, während bis zum Erreichen des Zielwertes HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz) hinzugegeben wird. Dabei ist auf eine freie Beweglichkeit des Rührfischchens im Becherglas zu achten, um eine gleichmäßige Verteilung des HEPES gewährleisten zu können.

Der benötigte pH-Wert des Tyrodes-Puffers von 6,5 wird mit 1N HCl eingestellt. Der nun fertig angemischte Puffer muss zum Abschluss unter der Sterilbank sterilfiltriert werden.

Durch die Zentrifugation hat sich plättchenreiches Plasma (PRP) abgesetzt, welches vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in ein 50 ml-Falcon umgefüllt wird, welches zuvor bereits mit 25 ml Tyrodes pH 6,5 vorgefüllt wurde. Es dürfen maximal 10 ml PRP in ein 50 ml-Falcon gegeben werden, so dass ein Gesamtvolumen von 35 ml entsteht.

Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 920 g für 10 min. bei Raumtemperatur mit Bremse. Der Überstand wird abgegossen. Das Pellet wird mit 1 ml PBS + Ca²⁺ resuspendiert. Die abschließende Thrombozytenzählung erfolgt in einer 1:10-Verdünnung in einem Eppendorf-Cup am Sysmex.

2.3 Monozytenisolation

2.3.1 Benötigte Materialien

Geräte

Brutschrank: incu-safe	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe für sterile Einmalpipetten, accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank Heraeus®	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden

Medien

VLE RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin & Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
---	----------------------------------

Probe

Blutkegel aus der Transfusionsmedizin	gesunde humane Spender
---------------------------------------	------------------------

2.3.2 Zusammensetzung des selbst hergestellten Monozytenmediums

Monozyten-Medium:

- 450 ml VLE RPMI 1640
- 50 ml Fetales Kälberserum (10 %)

2.3.3 Durchführung

Bereits beschrieben ist diese Methodik in [107]. Die Transfusionsmedizin stellt Leukozyten-Kegel zur Verfügung, die als Nebenprodukt bei der Blutspende entstehen.

Die Monozytenisolation erfolgt unter der Sterilbank. Um das Vollblut aus dem Kegel in ein 50 ml-Falcon umfüllen zu können, wird zuerst der Schlauch an der Spitze des Kegels aufgeschnitten und der Kegel auf das Falcon gestellt. Mit dem Eröffnen des anderen Schlauches läuft das Blut in das Falcon. Anschließend wird das Falcon auf eine Gesamtfüllmenge von 50 ml mit PBS (ohne Calcium) gebracht.

Für jeden Kegel mit Vollblut werden zwei weitere 50 ml-Falcons mit je 20 ml Ficoll befüllt. Diese Chemikalie erzeugt nach dem Zentrifugieren einen Dichtegradienten, der es ermöglicht, die Monozyten zu separieren.

Sehr langsam werden nun 25 ml des zuvor verdünnten Blutes mit einer Pipette in das schräg gehaltene Falcon laufen gelassen und im Anschluss bei 920 g für 20 min. ohne Bremse zentrifugiert.

Die sich mittig befindende weiße Monozytenphase wird mit einer Transferpipette aufgenommen und in ein neues 50 ml-Falcon gegeben, welches nachfolgend mit PBS (ohne Calcium) auf 50 ml aufgefüllt wird. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgt bei 535 g für 10 min. mit Bremse.

Der sich bildende Überstand wird verworfen. Das Monozytenpellet wird mit 6 ml Monozytenmedium RPMI 1640 resuspendiert. Je 2 ml dieser Monozytensuspension werden nun in eine rote Zellkulturflasche pipettiert, die zuvor mit je 23 ml Monozytenmedium befüllt wurde.

Über Nacht werden die drei Zellkulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.4 Durchflusszytometrie (FACS): Aktivierung & Degranulation von Thrombozyten

2.4.1 Benötigte Materialien

Geräte

Durchflusszytometer FACS Calibur BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Reagenzien

ADP 10 μM Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Formaldehyd (PFA) Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

PBS („*Phosphate buffered saline*“ /Phosphat-gepufferte Salzlösung) + Ca^{2+} Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Proteine

Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$ Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Antikörper

CD42b-PE Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

CD62P-FITC Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

PAC-I FITC Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

Probe

CPDA-Blut gesunde humane Spender

2.4.2 Versuchsdurchführung

Die Technik der Durchflusszytometrie wird in [108], [109], [105], [110] beschrieben.

Kurz gefasst werden in der FACS-Analyse („*fluorescence-activated cell sorting*“) fluoreszenz-markierte Zellen, die an einem Laserstrahl in hohem Tempo vorbeigehen.

fließen, in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert. Dadurch erfolgt eine Analyse der Eigenschaften der Zellen.

In diesem Versuch werden 20 µl Vollblut mit 980 µl PBS + Ca²⁺ 1:50 verdünnt. Es werden zwei verschiedene Versuchssets mit jeweils doppelter Ausführung angelegt. In alle Röhrchen werden 5 µl des CD42b PE-Antikörpers gegeben, womit die Thrombozyten markiert werden.

Set 1 wird mit je 5 µl CD62P FITC-Antikörper versehen.

Set 2 wird mit je 5 µl des PAC-1 FITC-Antikörpers markiert.

Jedes Set besteht aus folgenden Versuchsansätzen, wobei sich in allen Röhrchen jeweils 5 µl CD42b PE und 5 µl des spezifischen Antikörpers für das jeweilige Set sowie 35 µl verdünntes Vollblut befinden.

Versuchsansätze:

- Leerwert
- ADP 10 µM
- ADP 10 µM + Jam-A D1 10 µg/ml

Alle Versuchsansätze werden für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 300 µl 0,5 % Formaldehyd (PFA) werden alle Proben fixiert.

Die Proben werden nun im Durchflusszytometer analysiert.

2.5 Aggregometrie: Optische Messung der Thrombozytenaggregation

2.5.1 Benötigte Materialien

Geräte

Aggregometer	Chrono-Log Corporation, Havertown, Pennsylvania
Software: Aggrolink Version 5.2.1	Chrono-Log Corporation, Havertown, Pennsylvania
Sysmex (Zellzählautomat)	Sysmex Deutschland GmbH, Nor-

	derstedt, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thrombozyten-Agonisten	
ADP 10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Proteine	
Car D1 10 μ g/ml (Kontrolle)	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1 mit 0,5, 1, 2, 5, 10 μ g/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1/D2 mit 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μ g/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Proben	
PRP aus CPDA-Blut (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin)	gesunde humane Spender
PPP aus CPDA-Blut	identischer gesunder humaner Spender wie für das PRP

2.5.2 Versuchsdurchführung

Vorbeschrieben ist die Aggregometrie in den Quellen [105], [111], [112].

Kurz gefasst handelt es sich bei der Aggregometrie um ein photometrisches Messverfahren. Der Grad der Thrombozytenaggregation wird als Änderung der optischen Dichte in einem zu bestimmenden Thrombozytenmedium in Form einer Kurve aufgezeichnet. Als Referenzwert dient eine zweite Küvette mit plättchenarmem Plasma (PPP).

PRP und PPP werden, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, hergestellt. Für den Versuch ist es wichtig, dass das PRP nicht mehr als 200.000 Thrombozyten pro μ l enthält, um vergleichbare Messwerte zu erhalten. Im Zweifelsfall muss das PRP mit PPP verdünnt werden.

Beispiel: 237 x 10³/μl gemessene Thrombozyten im PRP

$$237/200 = 1,185$$

$$1 : 1,185$$

$$1 + 0,185$$

1000 μl PRP + 185 μl PPP → PRP mit 200 x 10³/μl Thrombozyten

Während der Zentrifugationsschritte werden alle Reagenzien in den benötigten Konzentrationen in Eppendorf-Cups vorbereitet. Das Jam-A sowie die Negativkontrolle in Form des Car D1 werden auf Eis gelagert.

Das Aggregometer wird 10 - 15 min. vor dem gewünschten Versuchsstart angeschaltet, damit es auf stabile 37 °C aufheizen kann. Eine Glasküvette wird mit 500 μl PPP befüllt und in die dafür vorgesehene Messkammer gesteckt. Das PPP wird während des Versuches als Leerwert dienen. In eine weitere Glasküvette wird PRP pipettiert (200 x 10³ Thrombozyten/μl) und ein kleines Rührfischchen hinzugefügt. Die genaue Menge des PRP richtet sich nach den hinzuzugebenden Reagenzien. Die Gesamtmenge beträgt am Ende 500 μl. Ein Stirrer sorgt zusammen mit dem Rührfischchen für eine perfekte Durchmischung aller Reagenzien in der Messkammer.

Am Computer wird das Programm „AGGROLINK“ geöffnet. Nach der Kalibrierung der jeweiligen Probe folgt eine zweiminütige Anwärmphase des PRP auf 37 °C. Nach den zwei Minuten werden rasch hintereinander alle Reagenzien zum PRP hinzugefügt und nach fünfminütiger Messung die Amplitude berechnet und der Kurvenverlauf der Aggregation beurteilt. Um die Kurven leichter vergleichen zu können, werden die Daten in Excel importiert und eine Sammelgrafik erstellt.

Versuchsdurchläufe:

- Leerwert
- ADP 10 μM
- ADP 10 μM + Jam-A D1 10 μg/ml
- ADP 10 μM + Jam-A D1/D2 30 μg/ml
- ADP 10 μM + Car D1 10 μg/ml
- Jam-A D1 10 μg/ml

- Jam-A D1 als Konzentrationsstudie mit 0,5, 1, 2, 5, 10 µg/ml
- Jam-A D1/D2 30 µg/ml
- Jam-A D1/D2 als Konzentrationsstudie mit 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/ml
- Car D1 10 µg/ml

2.6 Flusskammer: Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

2.6.1 Benötigte Materialien

Geräte

Lichtmikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kamera: Axio Cam MR	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Software: Axio Vision (AxioVS40 V 4.8.2.0)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Flusskammer	Sonderanfertigung
Perfusor	kd Scientific, Holliston, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

70%iges Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ADP 100 µM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin Fraktion V (pH 7,0)	AppliChem Panreac ITW Companies, Chicago, Illinois, USA
Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Collagenreagens Horm®	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
SKF-Lösung zum Verdünnen	kd Scientific, Holliston, Massachusetts, USA

Proteine

Car D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1/D2 30 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Probe

CPDA-Vollblut	gesunde humane Spender
---------------	------------------------

2.6.2 Technik der Flusskammer

Die Methodik der Flusskammer ist in den Quellen [110], [112] dargestellt.

In einer Flusskammer können unter dynamischen Flussbedingungen, wie sie beispielsweise im arteriellen Stromgebiet herrschen, durch kontinuierliche Perfusion der Kammer *in vitro* ähnliche Voraussetzungen wie *in vivo* hergestellt werden. Dies ermöglicht die realitätsnahe Untersuchung zellulärer Interaktionen.

2.6.3 Vorbereitung der Deckgläschen

Zuerst werden Deckgläschen mit den Abmessungen von 24 x 60 mm in einer Petrischale mit 70%igem Ethanol für 10 min. eingelegt, um die Deckgläschen von möglichen Fettrückständen zu befreien. Nach dem Trocknen werden sie mit einem Permanentmarker beschriftet sowie der später zu untersuchende Bereich mit seitlichen Begrenzungslinien markiert. Mit der Rückseite nach oben werden sie in eine Inkubationsschale gelegt, die zuvor mit Wasser gefüllt wurde. Dies ermöglicht später eine feuchte Lagerung.

Die Collagenlösung für die Beschichtung der Deckgläschen, welche in diesem Versuch als stabile Phase / Matrix dient, wird unter einer Sterilbank angefertigt. Dafür wird das Collagenreagens, welches bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wird, 1:10 mit der beiliegenden SKF-Lösung, einer Glucoselösung, verdünnt, so dass eine Konzentration von 100 µg/ml entsteht.

Jeweils 100 µl der angefertigten Collagenlösung werden nun auf jedes Deckgläschen pipettiert und mit der Pipettenspitze gleichmäßig im zuvor markierten Bereich verteilt. Die fertig präparierten Deckgläschen werden über Nacht in der feuchten Kammer bei 4 °C gelagert.

2.6.4 Durchführung des Flusskammerversuches

Die Methodik dieses Versuchs ist bereits in [105], [108], [110] beschrieben. Von den am Vortag vorbereiteten und bei 4 °C in der feuchten Kammer gelagerten Deckgläschen wird vorsichtig der Überstand abgegossen und mit der mit Collagen beschichteten Seite auf die Flusskammer gelegt. Überflüssiges PBS+ Ca²⁺ sollte mit einem Tuch abgesaugt werden, um eine sichere Lage des Deckgläschens zu gewährleisten. Die Blockung erfolgt mit 1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Am Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200 von Zeiss wird das 20er-Objektiv eingestellt.

Das Computerprogramm Axio Vision wird gestartet und die Schwarz-Weiß-Kamera AxioCamMR im Bereich „Aufnahme“ ausgewählt. In der Registerkarte „AxioCamMR: Live“ wird das Objektiv 20x-MRbw eingestellt.

An der Flusskammer wird ein möglichst kurzer zuführender Schlauch, um die Wartezeit bei der Perfusion zu verkürzen, und ein abführender Schlauch befestigt. Nun wird die Flusskammer mit dem eingeschliffenen Bereich nach oben hingelegt und mittels einer 10 ml-Spritze mit der Spülflüssigkeit PBS + Ca²⁺ gefüllt bis sich im zuführenden Schlauch keine Luftblasen mehr befinden und der eingeschliffene Bereich vollständig gefüllt ist. Eines der mit Collagen beschichteten Deckgläschen wird mit der beschichteten Seite nach unten auf die Flusskammer gelegt. Beides zusammen wird mit dem Deckgläschen nach unten in den Metallrahmen der Flusskammer eingefügt, so dass sich der markierte Bereich des Deckgläschens genau im ausgesparten Bereich des Metallrahmens befindet. Mit den beiden Verschlussstopfen wird beides gründlich festgeschraubt, so dass die Dichtigkeit der Kammer gewährleistet ist. Bei der Kontrol-

le des Flussbereichs werden bei Bedarf letzte Luftbläschen durch Spülen der Kammer entfernt.

Die fertig vorbereitete Flusskammer wird nun auf dem Deckel einer Petrischale mittig unter dem 20er-Objektiv des Mikroskops positioniert.

An den zuführenden Schlauch zur Flusskammer wird eine 1 ml-Spritze angeschlossen und anschließend in den Perfusor eingespannt. Die Spritze ist mit 1 ml Vollblut sowie den jeweiligen Testsubstanzen versehen:

- ADP 100 μM
- ADP 100 μM + Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$
- ADP 100 μM + Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$
- ADP 100 μM + Car D1 10 $\mu\text{g/ml}$
- Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$
- Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$
- Car D1 10 $\mu\text{g/ml}$

Das Jam-A, beziehungsweise die Negativkontrolle Car D1, werden 5 min. bei Raumtemperatur im Blut vorinkubiert bevor das ADP hinzugegeben und die Perfusion gestartet wird. Das Vollblut wird über die collagenbeschichtete Oberfläche mit einer arteriellen Scherrate von 1700 s^{-1} ($12,86 \text{ ml/h}$) perfundiert (siehe Abbildung 8).

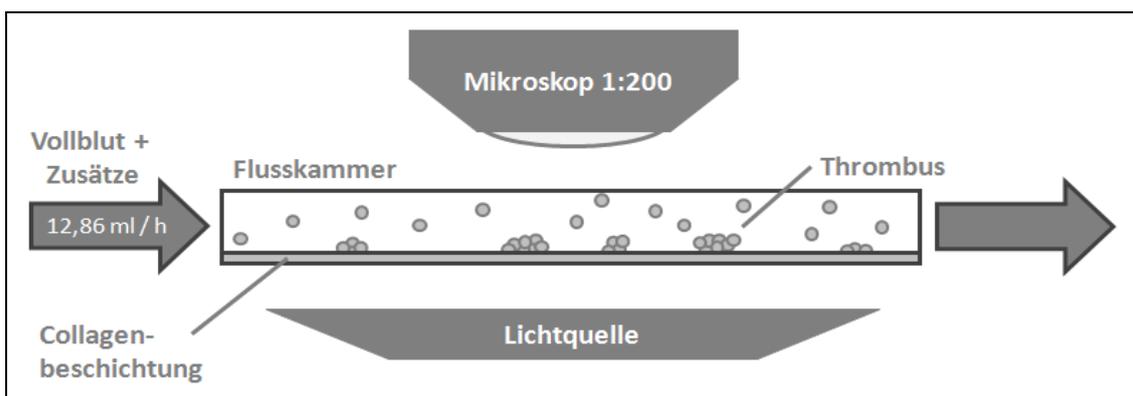


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung des Flusskammerversuchs zur Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (eigene Darstellung)

Kurz bevor die Spritze leergelaufen ist, wird die Perfusion gestoppt, der Schlauch abgeklemmt und gegen eine Spritze mit Spülflüssigkeit getauscht. Dies spült die Erythrozyten und die nicht gebundenen Thrombozyten aus der Flusskammer.

Sobald die Flusskammer ausreichend gespült ist und der Blick auf die Thromben frei wird, werden mindestens vier Fotos für die Dokumentation aus zufälligen optischen Bereichen der Kammer gemacht.

Abgespeichert werden die Fotos unter dem Originalformat „.zvi“ in der Axio-Vision-Software, damit die Größeninformationen für die spätere Auswertung erhalten bleiben.

2.7 Konfokalmikroskopie / Fluoreszenzmessung: Thrombozytenspreizung

2.7.1 Benötigte Materialien

Geräte

Brutschrank: incu-safe	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Konfokales Mikroskop: Axioplan 2, LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter: HI 9025 Microcomputer	Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Präzisionswaage	Denver Instrument / Sartorius, Bohemia, New York
Rührgerät mit Rührfischchen: IKA-MAG® RCT	IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ZEN lite (Analyse-Software für Bilder des Konfokalmikroskops)	Version 2012, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Reagenzien

1 mM CaCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
10 mM EGTA (Ethylenglykoltetrasäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
1N NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
20 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
70%iges Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin Fraktion V (pH 7,0)	AppliChem Panreac ITW Companies, Chicago, Illinois, USA
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Collagenreagens Horm®	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS+ Ca ²⁺	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PHEM-Puffer	eigene Herstellung
PIPES (Piperazin-N, N'-bis (2-ethansulfonsäure))	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SKF-Lösung zum Verdünnen	Nycomed, Opfikon, Schweiz
Waschpuffer (PBS 0,3 % Treiton + 0,1 % Tween 20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Proteine

Jam-A D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1/D2 30 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Antikörper

Phalloidin-Alexa Fluor 488	Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
----------------------------	--

Probe

gewaschene Thrombozyten aus mit gesunde humane Spender
ACD-antikoaguliertem venösem Blut

2.7.2 Zusammensetzung des selbst hergestellten Puffers

PHEM-Puffer:

3 g PIPES in 20 ml H₂O lösen

NaOH hinzugeben bis die Lösung klar ist

0,124 g HEPES

0,3 g EGTA

0,19 g MgCl₂

mit NaOH (1N) auf pH 6,9 einstellen und mit H₂O auf 100 ml bringen

2.7.3 Vorbereitung

Die Methodik der Thrombozytenspreizung ist in den Quellen [110], [113] beschrieben.

Als „*spreading*“ wird der Zustand aktivierter Thrombozyten bezeichnet, in dem sie ihre Form verändern, sich über einer thrombogenen Oberfläche (zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin, Laminin) ausbreiten und an andere Thrombozyten binden können. Dieser Vorgang kann durch einen Antikörper, der gegen einen Teil des Zytoskeletts gerichtet ist, unter einem Konfokalmikroskop sichtbar gemacht werden, was eine qualitative Analyse der Thrombozytenspreizung ermöglicht.

24 Deckgläschen werden mittels 70%igem Ethanol gesäubert und je eines in jede Kammer einer 24-Näpfchen-Kulturplatte gelegt. Jeweils sechs der Kammern werden nun mit 200 µl Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml, 2%igem Bovinem Serumalbumin (BSA) als Negativkontrolle oder HORM-Collagen 100 µg/ml als Positivkontrolle befüllt.

In einer feuchten Kammer erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

2.7.4 Durchführung für die Auswertung durch Konfokalmikroskopie

Wie ausführlich in Kapitel 2.2.4 beschrieben, werden gewaschene Thrombozyten hergestellt.

Aus der am Vortag vorbereiteten 24-Näpfchen-Kulturplatte werden alle Flüssigkeiten abpipettiert und verworfen. Es folgen drei Waschdurchgänge, in denen die Kammern jeweils mit 500 µl PBS ohne Calcium gespült, 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert sowie am Ende entfernt werden.

Die vorbereiteten gewaschenen Thrombozyten werden mit PBS + Ca²⁺ soweit verdünnt, dass sich in 100 - 200 µl am Ende 10⁶ Thrombozyten befinden. Diese Suspension wird in alle Kammern gegeben und für mindestens eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Thrombozyten entfernt und alle Kammern mit 500 µl PBS unter schwenkenden Bewegungen gewaschen.

Die Fixierung und Permeabilisierung des Sets erfolgt mit 150 µl des zuvor hergestellten PHEM-Puffers. Das Set wird für 10 min. bei 4 °C inkubiert. Es folgen zwei weitere Waschschritte mit PBS.

100 µl 1 %iges BSA, welche in jedes Näpfchen pipettiert werden, blocken den Versuch. Das Set wird nun 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen.

Zu allen Kammern werden 150 µl des Phalloidin-Alexa Fluor 488, das gegen Aktin gerichtet ist, gegeben. Der Antikörper wurde zuvor 1:300 mit PBS + Ca²⁺ verdünnt. Das Set wird nun mindestens eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit 500 µl eines speziellen Waschpuffers, der aus PBS 0,3 % Treiton und 0,1 % Tween 20 (Polysorbat 20) besteht, werden alle Kammern mit je 5 min. Inkubationszeit dreimal hintereinander gewaschen.

Die Deckgläschen werden auf sauberen Objektträgern mit Dako Fluorescent Mounting Medium beschichtet. In einer Mappe einsortiert, werden die fertigen Objektträger im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Über Nacht trocknen sie. In diesem Zustand können die Objektträger etwa einen Monat aufgehoben werden.

Die Bilderstellung erfolgt mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 Meta, Axio-plan 2 bei einer 100-fachen Vergrößerung mit einer zusätzlichen zweifachen Vergrößerung durch digitalen Zoom. Die so gewonnenen Bilder werden mit der ZEN lite-Software analysiert.

2.8 FACS-Analyse: Apoptosenachweis mittels Annexin V und TMRE (Tetramethylrhodaminethylester)

2.8.1 Benötigte Materialien

Geräte

Software: BD CellQuest™ Pro Version 0.3.7 fbb ©1994-2005	BD CellQuest™, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Sysmex (Zellzählautomat)	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

Annexin V FITC	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
FCCP 25 µg/ml (Positivkontrolle)	Abcam, Cambridge, England
Ionomycin 10 µM (Positivkontrolle)	Calbiochem, Billerica, Massachusetts, USA
PBS + Ca ²⁺	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TMRE (tetramethylrhodamine, ethylester perchlorate) 25 µM	Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trap 25 µM, TRAPtest	Cobas® / Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz

Proteine

Jam-A D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
-------------------	---

Jam-A D1/D2 30 µg/ml

Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Zellen

PRP aus CPDA-Blut

gesunde humane Spender

(10^6 Thrombozyten pro Probe)

2.8.2 Durchführung

Die Technik der Durchflusszytometrie wird in [109], [110], [114] beschrieben. Vorbeschrieben ist der Nachweis der Apoptose in [106].

Zur PRP-Gewinnung wird frisch abgenommenes CPDA-Blut (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) für 20 min. bei 209 g ohne Bremse zentrifugiert. Dabei hemmt das Citrat die Gerinnung während das Phosphat-Dextrose-Adenin den Blutzellen als Energielieferant dient und sie so am Leben erhält, so dass sie weiterhin zu Stoffwechselprozessen in der Lage sind. Am Sysmex wird die Thrombozytenzahl ermittelt. Zu jedem Versuchsansatz sollen 1 Mio. Thrombozyten hinzugefügt werden.

Die Versuchsansätze, jeweils in doppelter Ausführung, für Annexin V lauten wie folgt:

- Leerwert
- Jam-A D1 10 µg/ml
- Jam-A D1/D2 30 µg/ml
- TRAP 25 µM
- TRAP 25 µM + Jam-A D1 10 µg/ml
- TRAP 25 µM + Jam-A D1/D2 30 µg/ml
- Ionomycin 10 µM als Positivkontrolle

Den 1 h-Ansätzen werden nach 30 min. jeweils 4 µl Annexin V hinzugefügt und im Dunkeln für 30 min. inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit werden 300 µl PBS + Ca^{2+} hinzugefügt. Die Proben werden direkt im Anschluss im FACS gemessen.

Die Versuchsansätze für TMRE entsprechen denen von Annexin V. Jedoch gibt es eine andere Positivkontrolle:

- FCCP (Carbonylzyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon) 25 µg/ml als Positivkontrolle

Die Versuchsdurchführung läuft analog zu der mit Annexin V. Hinzugefügt werden dieses Mal jedoch 5 µl TMRE 25 µM.

Alle gesammelten Daten der Durchflusszytometrie werden mit der Software „CellQuest“ analysiert.

2.9 Flusskammer: Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen

2.9.1 Benötigte Materialien

Material für die Endothelzellkultur

Geräte

Brutschrank: incu-safe	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Mikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipettierhilfe für sterile Einmalpipetten, accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank Heraeus®	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS + Ca ²⁺	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Puffer & Zellmedien

Medium 199 + 10 % FCS + 1 % Penicillin & Streptomycin + 1,9 ml L-Glutamin zu 500 ml Medium	PAA, Pasching, Österreich / Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien / Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
--	---

Proteine

IFN γ 20 ng/ml	Pepto Tech, Rocky Hill, New York, USA
TNF α 50 ng/ml	Tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Trypsin (Ablösen der Zellen)	PAA, Pasching, Österreich

Proben

ECV-Zellen 304, 3 x 10 ⁶ gewaschene Plättchen aus mit ACD antikoaguliertem venösem Blut	Promocell, Heidelberg, Deutschland gesunde humane Spender
--	--

Material für den Flusskammerversuch

Geräte

Lichtmikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axio Cam MRc5	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Flusskammer	Sonderanfertigung
Perfusor	kd Scientific, Holliston, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Video disk recorder	kd Scientific, Holliston, Massachusetts, USA

Reagenzien

ADP 10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS + Ca ²⁺	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Proteine

Jam-A D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1/D2 30 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Probe

PRP aus CPDA-Blut	gesunde humane Spender
-------------------	------------------------

2.9.2 Vorbereitung: Anlegen einer Endothelzellkultur (ECV-Zellen)

Unter sterilen Bedingungen wird als Erstes eine Zellkulturflasche T175 mit einer 0,2 %igen Gelatinebeschichtung vorbereitet. 5 ml dieser 0,2 %igen Gelatinelösung werden in die liegende Zellkulturflasche gefüllt und dort durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf dem Boden verteilt. Die Flasche wird für 10 min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bevor die restliche Gelatine abpipettiert wird.

Die tiefgefrorenen ECV-Zellen werden in einem Falcon mit 10 ml Medium 199 suspendiert und für 5 min. bei 301 g bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden mittels 5 ml frischem Medium resuspendiert. In die zuvor vorbereitete rote Zellkulturflasche werden 25 ml Medium 199 gegeben bevor die 5 ml ECV-Suspension ergänzt werden.

Die Zellkulturflasche wird nun liegend bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Nach 1 - 2 Tagen sind für die weitere Versuchsdurchführung ausreichend Zellen vorhanden. Nach dieser Zeit müssen die ECV-Zellen ansonsten gesplittet werden, um weiterwachsen zu können. Regelmäßig muss die Qualität des Mediums kontrolliert und gegebenenfalls das Medium gegen frisches ersetzt werden, falls es zu einer gelblichen Verfärbung gekommen ist.

2.9.3 Beschichtung von Deckgläschen mit ECV-Zellen

Unter der Sterilbank wird auf 12 Deckgläschen mit den Abmessungen 24 x 60 mm mit einem Fettstift der spätere Flussbereich für die Flusskammer markiert.

Aus der zwei Tage alten ECV-Zellkulturflasche wird das Nährmedium abpipetiert und die Flasche gründlich mit PBS gespült. 5 ml Trypsin führen nach einer Inkubation von 5 min. im Brutschrank bei 37 °C zu einem Ablösen der ECV-Zellen vom Gelatineuntergrund. Dies wird unter einem Mikroskop kontrolliert bevor fortgefahren wird.

Die ECV-Zellen werden mit 20 ml Medium 199 + Zusätzen aus der Kulturflasche aufgenommen und in ein 50 ml-Falcon umgefüllt. Das Falcon wird für 5 min. bei 470 g bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 1 ml Medium resuspendiert.

In einer Zählkammer werden die ECV-Zellen in einer 1:10-Verdünnung mit dem Endothelzellmedium unter dem Mikroskop ausgezählt. Alle Deckgläschen werden mit 0,5 Mio. ECV-Zellen beschichtet. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Zellsuspension gleichmäßig auf dem kompletten markierten Bereich verteilt. In den Rand der Petrischalen wird PBS pipetiert, um ein feuchtes Milieu herzustellen. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C sollten die ECV-Zellen konfluent sein. Gegebenenfalls muss zwischendurch das Medium gewechselt werden.

2.9.4 Aktivierung der ECV-Zellen durch Tumornekrosefaktor α (TNF α)

50 ng/ml und Interferon γ (IFN γ) 20 ng/ml

Unter einem Mikroskop wird kontrolliert, ob die ECV-Zellen auf den Deckgläschen konfluent sind. Ist dies der Fall, wird unter der Sterilbank das Medium entfernt und die Deckgläschen mit PBS gespült. Auf jedes Deckgläschen werden nun 100 μ l des Mediums mit TNF α 50 ng/ml und IFN γ 20 ng/ml gegeben. Dabei ist auf eine gleichmäßige Bedeckung des kompletten markierten Bereiches zu achten. In den Rand der Petrischalen wird erneut PBS pipetiert, um ein feuchtes Milieu herzustellen. Anschließend werden die Petrischalen zurück in den Brutschrank mit 37 °C gestellt.

2.9.5 Durchführung des Flusskammerversuches

Von den Deckgläschen mit konfluentem Endothelzellrasen wird das Nährmedium abgekippt und mit PBS gespült.

Die Durchführung des Flusskammerversuches entspricht im Wesentlichen der ausführlichen Beschreibung in Kapitel 2.6.4. Die Versuchsmethodik ist bereits vorbeschrieben in [115].

In diesem Versuch erfolgt die Perfusion der Kammer allerdings mit PRP.

Abbildung 9 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf.

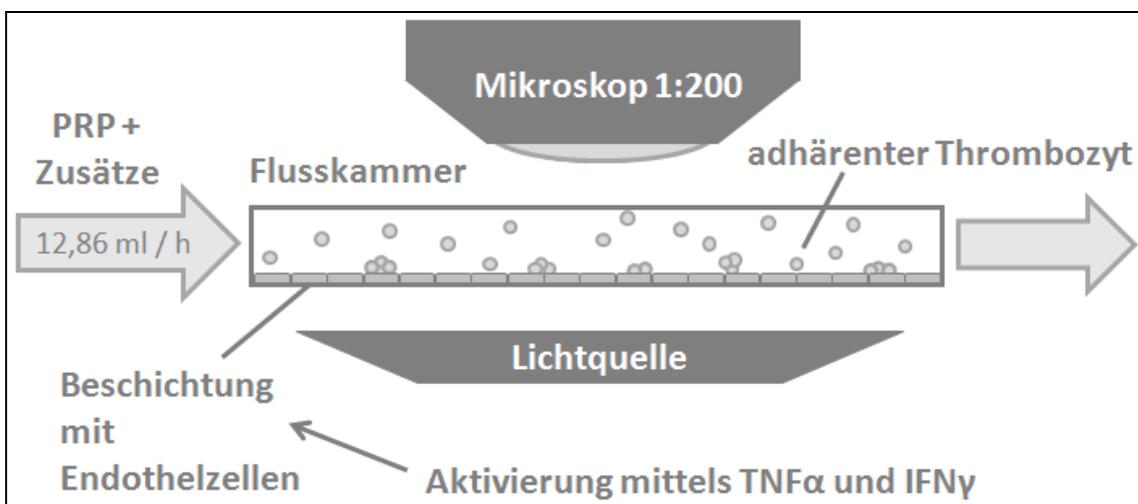


Abbildung 9: Flusskammer: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Thrombozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen unter arteriellen Flussbedingungen (eigene Darstellung)

Beim Spülen der Flusskammer vor Beginn der Perfusion zum Entfernen letzter Luftbläschen ist auf einen geringen Druck zu achten, da sonst Endothelzellen vom Deckgläschen weggespült werden können.

Nach Abschluss der Perfusion und anschließender Spülung der Flusskammer, um nicht gebundene Thrombozyten zu entfernen, werden mindestens vier Fotos für die Dokumentation aus zufälligen optischen Bereichen der Kammer gemacht.

2.9.6 Flusskammerdurchläufe

Die dynamische Phase der Flusskammer, mit der die Flusskammer perfundiert wird, besteht aus 1 ml PRP (mindestens $200 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten), welches zur Hälfte mit PBS + Ca^{2+} verdünnt ist. Weiterhin befinden sich darin die entsprechenden Zusätze der Versuchsdurchläufe

- Leerwert
- Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$
- Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$
- ADP 100 μM
- ADP 100 μM + Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$
- ADP 100 μM + Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$

Bei den Kombinationsansätzen mit ADP und Jam-A erfolgt eine fünfminütige Vorinkubation des PRP mit Jam-A bevor das ADP hinzugefügt und die Perfusion begonnen wird.

Das PRP wird über die mit Endothelzellen beschichtete Oberfläche mit einer arteriellen Scherrate von 1700 s^{-1} (12,86 ml/h) perfundiert.

2.10 FACS-Analyse: Nachweis von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten mit Hilfe von Anti-CD42b und Anti-CD14

2.10.1 Benötigte Materialien

Material für die Monozytenkultur

Geräte

Brutschrank: incu-safe	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Mikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sterilbank Heraeus®	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

Dulbeccos Phosphat Buffered Saline Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Puffer & Zellmedien

RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin & Streptomycin Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Proteine

Trypsin PAA, Pasching, Österreich

Proben

isolierte Monozyten aus venösem Blut gesunde humane Spender

Material für die FACS-Analyse

Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Reagenzien

Trap 25 µM, TRAPtest Cobas® / Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz

Formaldehyd (PFA) Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

PBS + Ca²⁺ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Proteine

Jam-A D1 mit 2,5, 5, 10 µg/ml Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Jam-A D1/D2 mit 7,5, 15, 30 µg/ml Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Antikörper

Mouse Anti-Human CD14 (FITC)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Mouse Anti-Human CD42b (PE)	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Isotyp-Kontrolle FITC: purified rabbit IgG: FITC	AbD Serotec, Kidlington, Großbritannien
Isotyp-Kontrolle PE: purified rabbit IgG: PE	AbD Serotec, Kidlington, Großbritannien

Proben

gewaschene Thrombozyten	gesunde humane Spender
isolierte Monozyten aus peripherem Blut	gesunde humane Spender

2.10.2 Gewinnung von Monozyten aus einer Monozytenkultur

Wie im Kapitel 2.3.3 ausführlich beschrieben, wurde am Vortag eine Monozytenkultur angelegt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Als Erstes wird das Monozytenmedium RPMI 1640 im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Unter einem Mikroskop werden die Zellkulturflaschen bezüglich der Menge der adhärenen Monozyten kontrolliert. Wenn die Zahl ausreichend erscheint, kann die Arbeit fortgesetzt werden.

Die folgenden Arbeitsschritte werden unter der Sterilbank ausgeführt. Alle nicht adhärenen Zellen werden abpipettiert. Nun wird die Zellkulturflasche T175 gründlich mit PBS gespült, bevor 5 ml Trypsin in jede Kulturflasche gegeben werden und eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erfolgt. In dieser Zeit sollten sich die Monozyten vom Untergrund gelöst haben, was unter einem Mikroskop zu kontrollieren ist. Im Zweifelsfall muss die Inkubationszeit verlängert werden. War die Ablösung erfolgreich, werden je 25 ml angewärmtes Monozytenmedium in die Zellkulturflaschen gefüllt und anschließend alles in ein 50 ml-Falcon umgefüllt. Die Falcons werden für 5 min. bei 836 g bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet, welches die Monozyten darstellt, wird mit 1 ml Monozytenmedium resuspen-

diert. Die Zellzählung erfolgt in einer 1:10-Verdünnung in einem Eppendorf-Cup mit dem Sysmex sowie manuell durch ein Hämozytometer.

2.10.3 Durchführung

Vorbeschrieben ist diese Methodik in [107]. Zu Beginn werden Monozyten und gewaschene Thrombozyten gewonnen. Eine ausführliche Beschreibung dieser Arbeitsschritte ist in den Kapiteln 2.3.3 sowie 2.2.4 zu finden.

Alle Versuchsansätze für die Durchflusszytometrie werden generell in doppelter Ausfertigung hergestellt. Das Endvolumen der Ansätze beträgt 50 μ l.

Alle Röhrchen werden mit 35 μ l PBS + Ca^{2+} befüllt. Hinzugegeben werden 5 μ l gewaschene Thrombozyten (1 Mio.) sowie 5 μ l Monozyten (30.000). Dabei sollten sich mindestens zehnmal mehr Thrombozyten als Monozyten im Versuchsansatz befinden. Die oben genannte Zusammenstellung gilt als Leerwert und Ausgangspunkt für alle folgenden Versuchsansätze.

Die einfachen Versuchsansätze umfassen je zwei Ansätze mit dem alleinigen Zusatz von Trap 25 μ M, Jam-A D1 mit 2,5, 5 und 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 mit 7,5, 15 und 30 μ g/ml, einer Isotypen-FITC-Kontrolle und einer Isotypen-PE-Kontrolle.

Die Kombinationsansätze bestehen aus Trap 25 μ M mit Jam-A D1, beziehungsweise mit Jam-A D1/D2 jeweils mit den oben genannten Konzentrationen. Alle angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen.

Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden zu allen Röhrchen außer zu den Iso-Kontrollen je 5 μ l Anti-CD42b für die Thrombozytenmarkierung sowie 5 μ l Anti-CD14 für die Monozytenmarkierung hinzupipettiert.

Es folgt eine weitere 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Die Fixierung des gesamten Versuchssets erfolgt mit je 300 μ l PFA 0,5 %. Der Versuchsansatz ist nun bereit zur Erfassung mittels FACS.

2.11 Zellkultur: Monozyten-Makrophagen-Differenzierung

2.11.1 Benötigte Materialien

Geräte

Brutschrank: incu-safe	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kamera: Axio Cam MR	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PC-Programm: Axio Vision (AxioVS40 V 4.8.2.0)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PC-Programm zur Zellauszählung: ImageJ 1.47v	National Institutes of Health, USA
Sterilbank Heraeus®	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Reagenzien

Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich

Zellmedien

VLE RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin & Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
--	----------------------------------

Proteine

Jam-A D1 10 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle
Jam-A D1/D2 30 µg/ml	Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle

Zellen

gewaschene Thrombozyten	gesunde humane Spender
isolierte Monozyten aus peripherem Blut	gesunde humane Spender

2.11.2 Durchführung

Im Vorfeld dieses Versuches werden Monozyten und gewaschene Thrombozyten aus humanem Vollblut gewonnen. Eine ausführliche Beschreibung dieser Arbeitsschritte ist in den Kapiteln 2.3.3 sowie 2.2.4 zu finden.

Die Methodik dieses Versuchs ist bereits vorbeschrieben [107]. Als Erstes wird das Monozytenmedium RPMI 1640 im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle folgenden Arbeitsschritte werden unter der Sterilbank ausgeführt. Eine 24-Näpfchen-Kulturplatte wird beschriftet und mit je 200 µl angewärmtem Monozytenmedium befüllt.

In alle Näpfchen werden etwa 3×10^4 Monozyten sowie 6×10^6 Thrombozyten pipettiert, so dass sich ein Verhältnis von 1:200 ergibt. Das Jam-A D1 hat eine Endkonzentration von 10 µg/ml und das Jam-A D1/D2 eine Endkonzentration von 30 µg/ml. Dieses Set wird für 10 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Set sollte in dieser Zeit täglich kontrolliert werden und bei Verfärbungen des Monozytenmediums jeweils um 200 µl Medium ergänzt werden.

Nach Ablauf der 10 Tage können die Ergebnisse dieses Versuches mit dem Mikroskop Zeiss „Axiovert 200“ in Form von Fotos dokumentiert werden. Zuvor müssen jedoch das alte Monozytenmedium abpipettiert und alle Wells gründlich mit je 300 µl PBS gespült werden. Nach Hinzugabe von neuem, auf 37 °C erwärmtem Monozytenmedium können die Fotos aufgenommen werden.

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Prism (GraphPad Prism®, Version 4.03) unter der Verwendung der „Einfaktoriellen ANOVA“ mit der Student-Newman-Keuls-Methode vorgenommen. Angegeben werden Mittelwert

und Standardfehler (Mittelwert \pm SEM; SEM bedeutet „standard error of the mean“ / Standardfehler des Mittelwertes). $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant in einem 95 % Konfidenzintervall betrachtet und in den Grafiken mit einem Stern (*) markiert. Zwei Sterne (**) entsprechen einem $p < 0,01$. Drei Sterne (***) entsprechen einem $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von Jam-A auf die Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten

In diesem Versuch sollten Erkenntnisse über den Effekt von löslichem Jam-A in Kombination mit dem Thrombozyten-Agonist ADP auf die Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten gewonnen werden. Als Indikatoren für die Degranulation wurden CD62P und PAC-1 gewählt.

Die FACS-Analyse mit CD62P ist in Abbildung 10 dargestellt. Gemessen wurden gegen einen Leerwert ADP allein und ADP mit Jam-A D1 in Kombination.

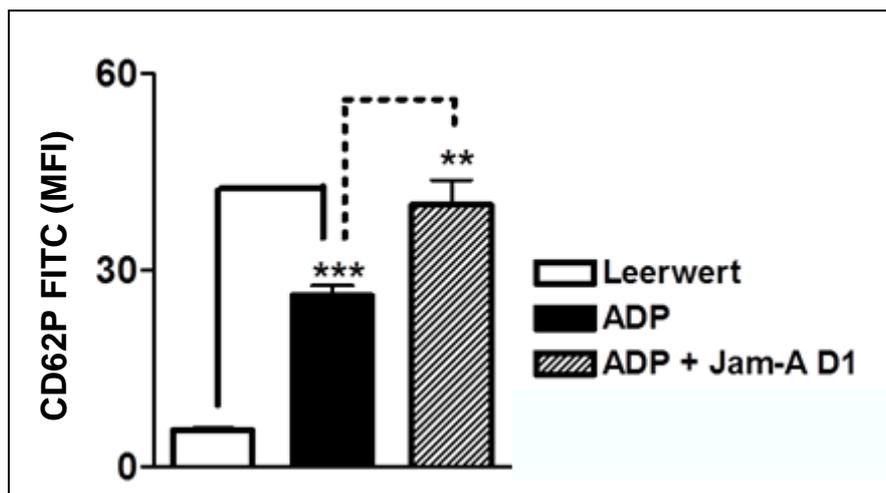


Abbildung 10: Thrombozytäre Degranulation – durchflusszytometrische Erfassung durch Anti-CD62P bei ADP 10 µM, dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 µg/ml und einem Leerwert (n = 3).

Es zeigt sich ein hoch signifikanter Anstieg ($***p < 0,001$) der Thrombozytenaktivität gegenüber dem Leerwert (Mittelwert \pm SEM) von $5,6 \pm 0,3$ mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) bei Hinzugabe von ADP auf $26,2 \pm 1,5$ MFI. Weiterhin kann mit hoher Signifikanz von $**p < 0,01$ ein Anstieg von ADP in Kombination mit Jam-A D1 auf $40,0 \pm 3,8$ MFI im Vergleich zu ADP allein ($26,2 \pm 1,5$ MFI) nachgewiesen werden.

Die FACS-Analyse mit PAC-1 ist in Abbildung 11 dargestellt. Gemessen wurden ADP allein und ADP mit Jam-A D1 in Kombination gegen einen Leerwert.

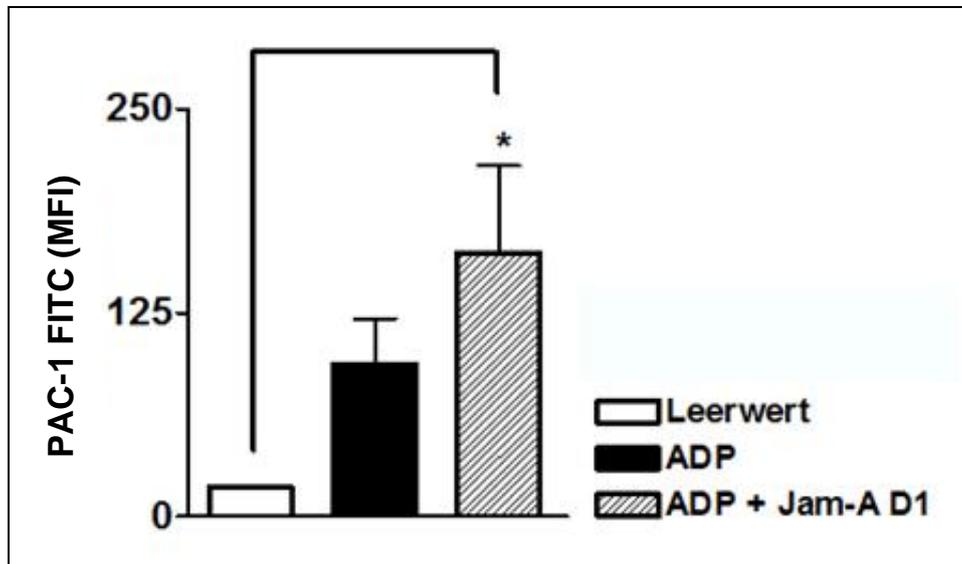


Abbildung 11: Thrombozytäre Aktivierung – durchflusszytometrische Erfassung durch Anti-PAC-1 bei ADP 10 µM, dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 µg/ml und einem Leerwert. In der Kombination zeigt sich ein signifikanter Anstieg (n = 3).

Der Leerwert (Mittelwert ± SEM) zeigt eine geringe Grundaktivierung der Thrombozyten von $18,5 \pm 0,7$ MFI an. Unter der Hinzugabe von ADP steigt die thrombozytäre Aktivierung auf $93,7 \pm 28,1$ MFI. Ein weiterer Anstieg lässt sich bei der Kombination von ADP mit Jam-A D1 auf $162,1 \pm 53,4$ MFI ablesen. Dennoch kann nur im Gegensatz zum Leerwert eine Signifikanz von $*p < 0,05$ erreicht werden.

3.2 Der Einfluss von Jam-A in Kombination mit ADP auf die Thrombozytenaggregation

3.2.1 Aggregation unter der Hinzugabe von ADP

Dieser Versuch sollte den Einfluss von löslichem Jam-A in Kombination mit dem Thrombozyten-Agonisten ADP auf die Thrombozytenaggregation zeigen. Bestimmt wurde jeweils die Amplitude der Kurve, die die Thrombozytenaggregation in Prozent angibt.

Abbildung 12 und Abbildung 13 stellen die Thrombozytenaggregation unter Hinzugabe von ADP 10 μ M sowie dessen Kombination mit Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und der Negativkontrolle, dem Car D1 10 μ g/ml dar.

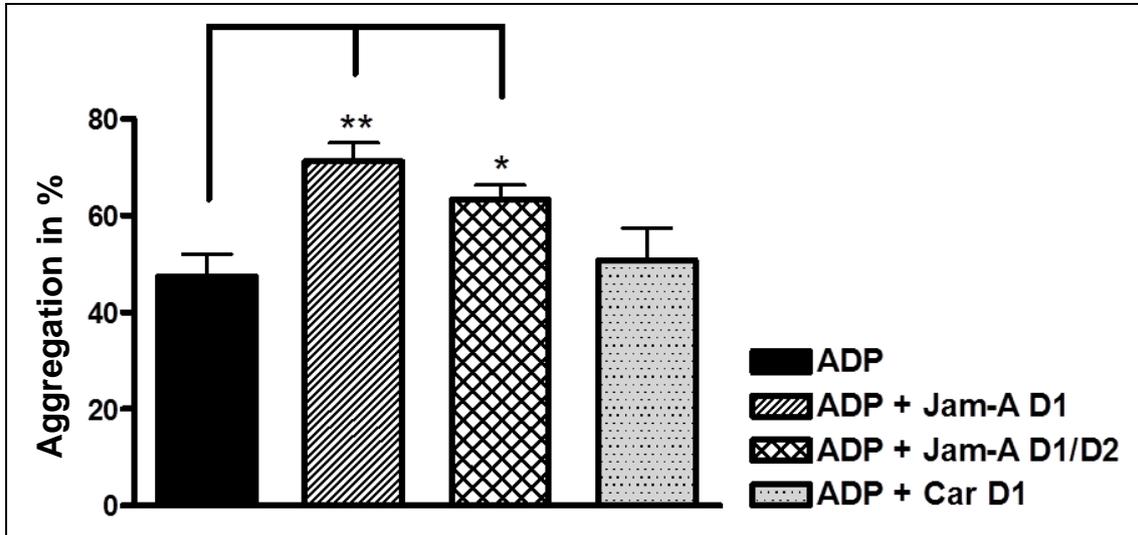


Abbildung 12: Thrombozytenaggregation in Prozent bei der Hinzugabe von ADP 10 μ M und dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und Car D1 10 μ g/ml. Die Kombination von ADP und Jam-A D1 zeigt eine signifikante Steigerung der Thrombozytenaggregation von **p < 0,01 gegenüber ADP. Die Kombination von ADP und Jam-A D1/D2 verzeichnet eine weniger ausgeprägte, aber signifikante Steigerung von *p < 0,05. Die Kombination von ADP und Car D1 unterscheidet sich nicht signifikant von ADP (n = 6).

Die Kombination von ADP und Jam-A D1 zeigt eine signifikante Steigerung der Thrombozytenaggregation (Mittelwert \pm SEM) auf 71,2 \pm 3,9 % (**p < 0,01) gegenüber ADP 10 μ M mit 47,5 \pm 4,5 %. Bei der Kombination von ADP und Jam-A D1/D2 ist die Steigerung auf 63,3 \pm 3,0 % weniger ausgeprägt, aber mit *p < 0,05 signifikant. Die Kombination von ADP und Car D1 unterscheidet sich mit 50,8 \pm 6,6 % nicht signifikant von ADP.

Abbildung 13 stellt beispielhaft den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation von ADP im Vergleich zu dessen Kombinationen mit Jam-A D1, Jam-A D1/D2 und der Negativkontrolle Car D1 dar.

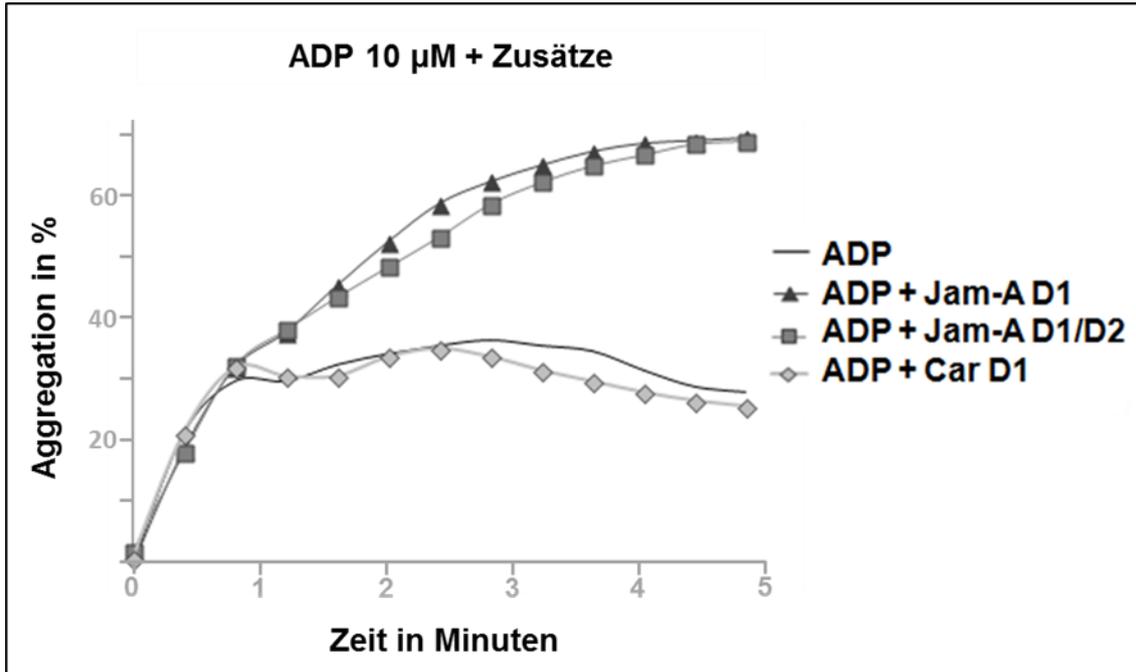


Abbildung 13: Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von ADP 10 µM und dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml und Car D1 10 µg/ml.

Es ist gut erkennbar, dass sowohl Jam-A D1 als auch Jam-A D1/D2 nach dem ersten Anstieg der Kurve einen zweiten Anstieg verzeichnen. Dabei liegt die Kurve von ADP mit Jam-A D1/D2 stets leicht unterhalb der von ADP mit Jam-A D1. Die Kurven von ADP und ADP mit Car D1 zeigen einen ebenfalls sehr ähnlichen Kurvenverlauf. Nach dem ersten Anstieg verlaufen beide bis zum Ende der Messzeit recht flach weiter. Es zeigt sich ein deutlich sichtbarer Unterschied gegenüber dem Kurvenverlauf der Kombinationen von ADP mit Jam-A D1 oder Jam-A D1/D2.

3.2.2 Aggregation ohne Hinzugabe von Agonisten

Abbildung 14 und Abbildung 15 stellen die Thrombozytenaggregation beim Leerwert sowie unter Beimischung von Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml und der Negativkontrolle, dem Car D1 10 µg/ml dar.

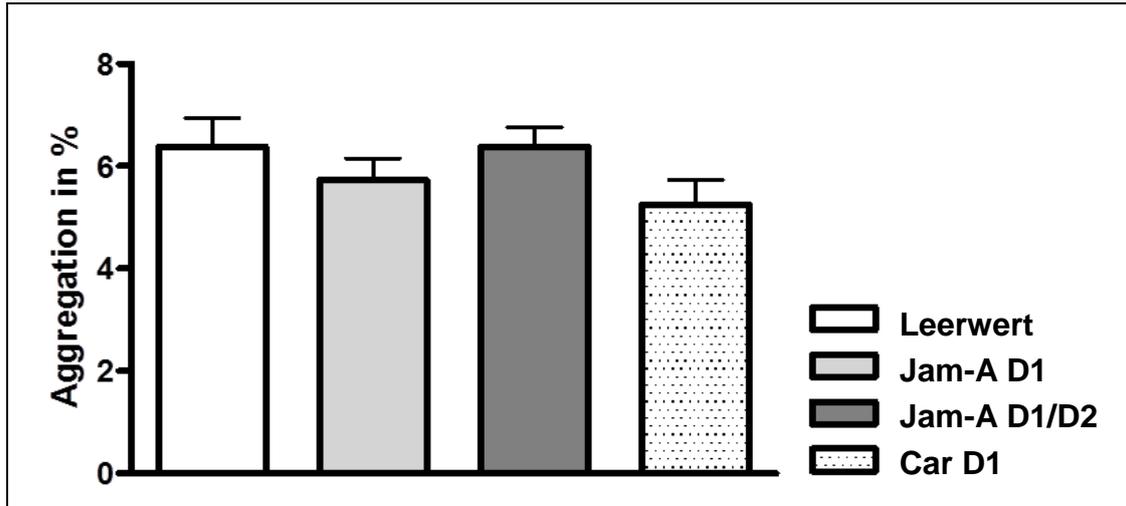


Abbildung 14: Thrombozytenaggregation in Prozent bei der Hinzugabe von Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml und Car D1 10 µg/ml. Gemessen wurde gegen einen Leerwert. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede (n = 5).

Bezüglich der prozentualen Aggregation zeigen sich zwischen dem Leerwert (Mittelwert ± SEM) mit $6,4 \pm 0,6$ %, Jam-A D1 mit $5,7 \pm 0,4$ %, Jam-A D1/D2 mit $6,4 \pm 0,4$ % sowie Car D1 mit $5,2 \pm 0,5$ % keine signifikanten Unterschiede.

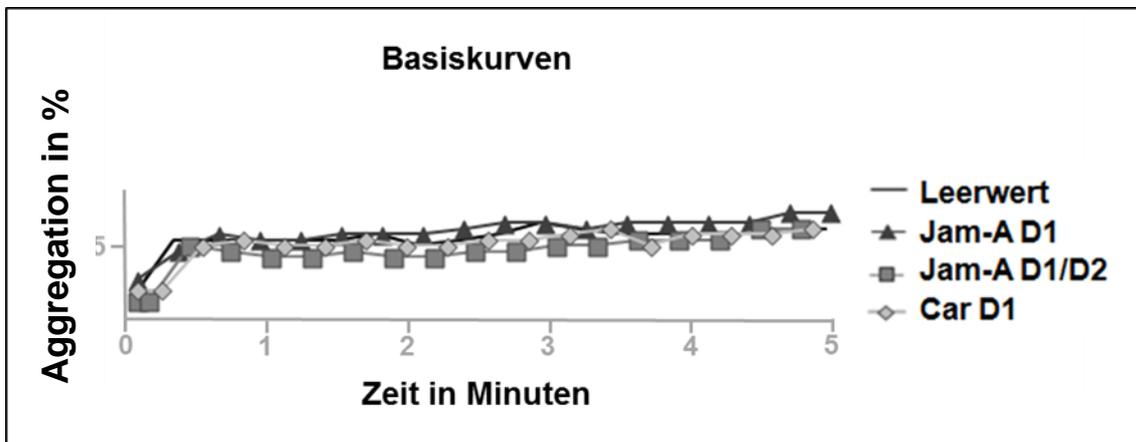


Abbildung 15: Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml und Car D1 10 µg/ml allein ohne Hinzugabe eines Thrombozytenaktivators. Gemessen wurde gegen einen Leerwert.

Die Aggregationskurven vom Leerwert, Jam-A D1, Jam-A D1/D2 sowie Car D1 haben einen identischen Verlauf und liegen praktisch direkt übereinander. Es sind keine Unterschiede sichtbar.

Abbildung 16 und Abbildung 17 repräsentieren die Thrombozytenaggregation beim Leerwert sowie unter Beimischung von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1, 0,5 µg/ml.

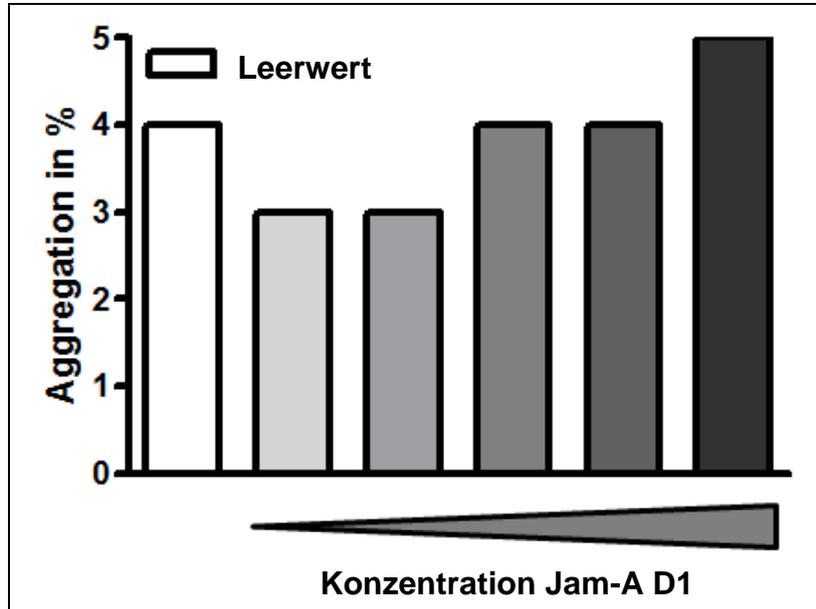


Abbildung 16: Konzentrationsstudie der Thrombozytenaggregation in Prozent von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml. Gemessen wurde gegen einen Leerwert (n = 1).

Die Messungen der prozentualen Thrombozytenaggregation von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1, und 0,5 µg/ml liegen gemeinsam mit dem Leerwert zwischen 3 % und 5 %. Jam-A D1 10 µg/ml erreicht mit 5 % den höchsten Wert. Es sind insgesamt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Thrombozytenaggregation feststellbar.

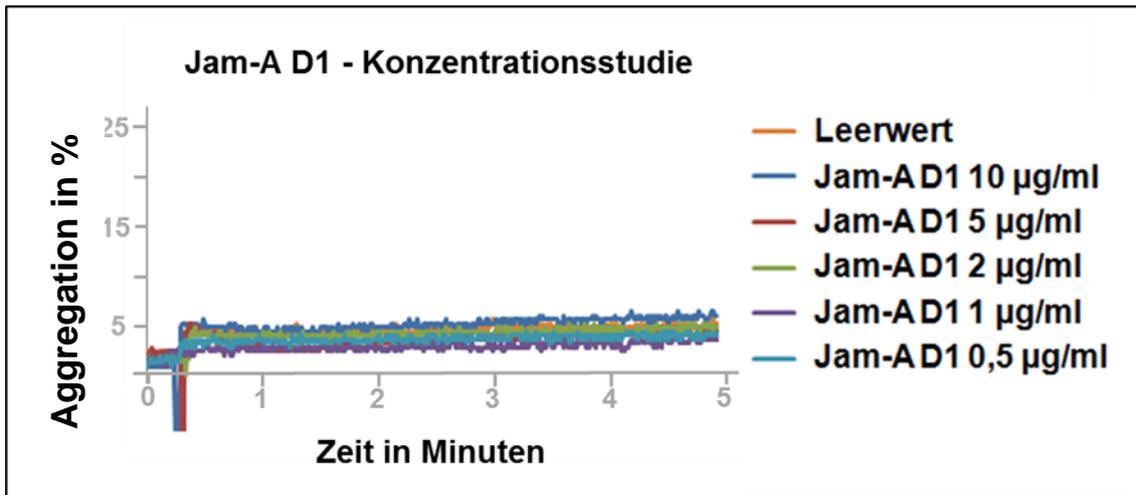


Abbildung 17: Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml.

Der beispielhafte Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml zeigt keine sichtbaren Unterschiede. Alle Kurven liegen praktisch direkt übereinander.

Abbildung 18 und Abbildung 19 beleuchten die Thrombozytenaggregation beim Leerwert sowie unter Hinzugabe von Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml.

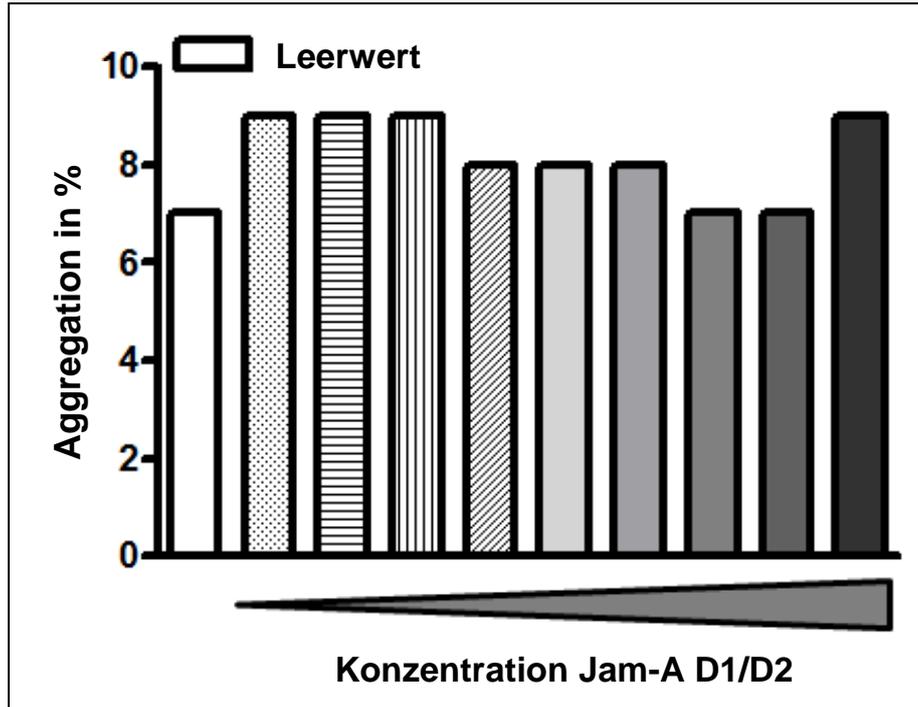


Abbildung 18: Konzentrationenstudie der Thrombozytenaggregation in Prozent von Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml. Gemessen wurde gegen einen Leerwert (n = 1).

Jam-A D1/D2 liefert in den Konzentrationen zwischen 30 µg/ml und 0,5 µg/ml ebenso wie der Leerwert eine prozentuale Thrombozytenaggregation zwischen 7 % und 9 %. Es können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

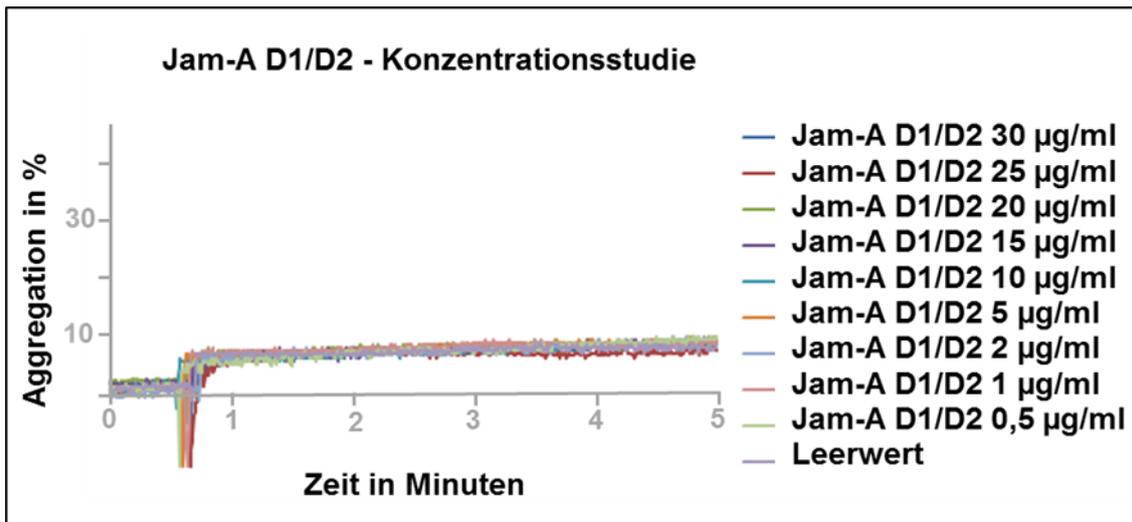


Abbildung 19: Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml.

Der beispielhafte Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation der Konzentrationsstudie von Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 sowie 0,5 µg/ml zeigt keine sichtbaren Unterschiede. Alle Kurven liegen praktisch direkt übereinander.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Thrombozytenaggregation feststellen, dass sowohl Jam-A D1 10 µg/ml als auch Jam-A D1/D2 30 µg/ml in Kombination mit dem Agonisten der Thrombozytenaggregation ADP die Aggregation deutlich fördern. Dabei zeigt Jam-A D1 eine stärkere Wirkung als Jam-A D1/D2. Die Negativkontrolle Car D1 führt in Kombination mit ADP zu keiner Steigerung der Aggregation.

Allein zeigen Jam-A D1 und Jam-A D1/D2, gleich welcher Konzentration, sowie Car D1 keine aktivierende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation. Ihre Werte entsprechen denen des Leerwertes.

3.3 Die Auswirkung von Jam-A auf die Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Bei diesem Experiment ging es um die Klärung der Auswirkungen von löslichem Jam-A mit beziehungsweise ohne den Einfluss des Thrombozyten-Agonisten ADP auf die Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen.

Ausgewertet wurden dabei die Fläche der sich bildenden Thromben in Quadratmikrometer (Abbildung 20) sowie die Anzahl der Thromben (Abbildung 21).

Hierzu wurden die Wirkung von ADP, in Kombination mit Jam-A D1, Jam-A D1/D2 und der Negativkontrolle, dem Protein Car D1, erfasst. Weiterhin wurden auch alle Einzelsubstanzen – ADP, Jam-A D1, Jam-A D1/D2 und Car D1 – bezüglich ihrer Wirkung auf die Thrombenbildung analysiert.

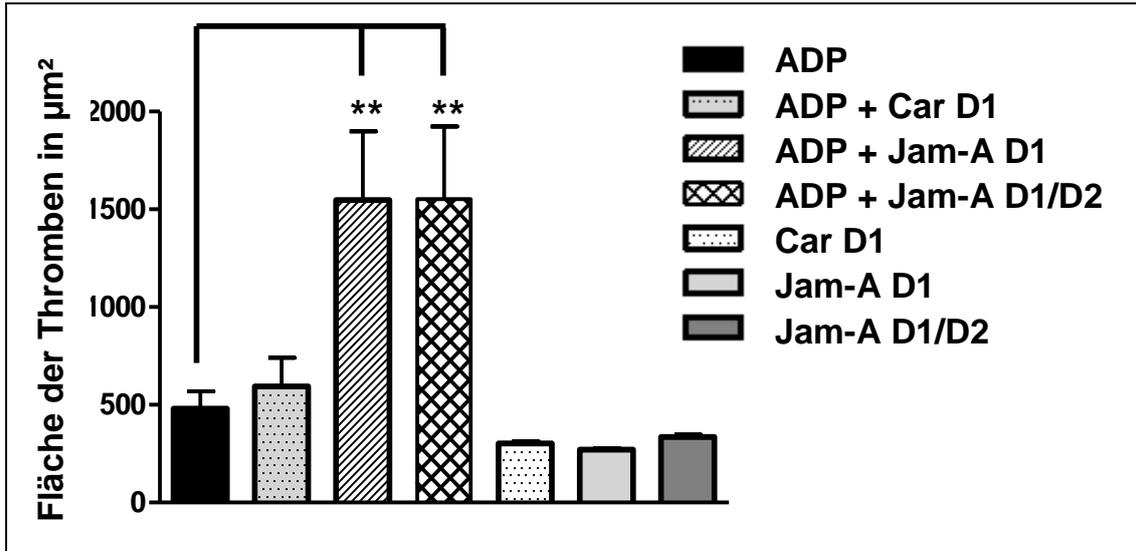


Abbildung 20: Fläche in Quadratmikrometer der sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben. Die Kombinationen von ADP 100 μM mit Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$ und Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$ zeigen eine signifikante Steigerung der Größe der sich bildenden Thromben (** $p < 0,01$) im Gegensatz zu ADP 100 μM allein ($n = 4$).

Bei der Ermittlung der Thrombenfläche (Mittelwert \pm SEM) zeigt sich ein deutlich signifikanter Größenzuwachs von ** $p < 0,01$ unter der Hinzugabe von ADP und Jam-A D1 mit $3199 \pm 501,2 \mu\text{m}^2$ sowie ADP und Jam-A D1/D2 mit $3179 \pm 400 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu ADP allein mit $994,3 \pm 183,1 \mu\text{m}^2$. Die Negativkontrolle Car D1 hingegen unterscheidet sich in Kombination mit ADP mit $1235 \pm 264 \mu\text{m}^2$ nicht signifikant von ADP allein. Die Proteine Jam-A D1 ($304 \pm 22,6 \mu\text{m}^2$), Jam-A D1/D2 ($375,4 \pm 38,7 \mu\text{m}^2$) sowie Car D1 ($328,9 \pm 39,5 \mu\text{m}^2$) führen zu etwa gleichgroßen Thromben mit nur sehr geringem Standardfehler unterhalb des Levels von ADP.

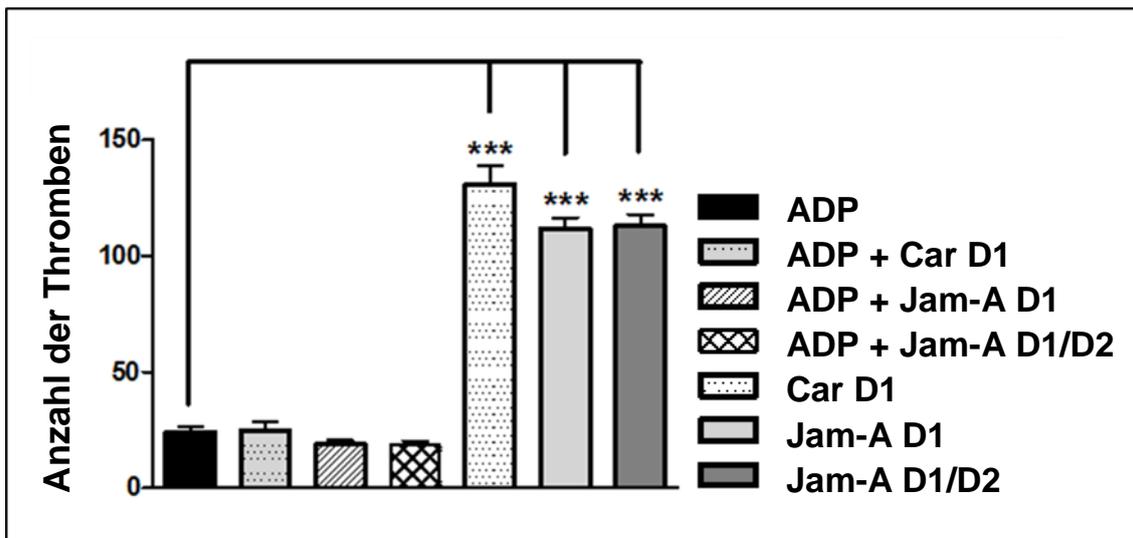


Abbildung 21: Anzahl der sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben. Jam-A D1 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 30 µg/ml sowie Car D1 10 µg/ml zeigen alle eine höchst signifikante Steigerung der Zahl der Thromben gegenüber ADP 100 µM beziehungsweise allen Kombinationen mit ADP (***) ($p < 0,001$) ($n = 4$).

Bei der Analyse der Thrombenanzahl (Mittelwert \pm SEM) stellt sich heraus, dass sich ADP ($24,1 \pm 2,5$ Thromben/Sichtfeld) und alle ADP-Kombinationen auf niedrigem Niveau nicht signifikant unterscheiden. Dahingegen führen sowohl Jam-A D1 mit $111,7 \pm 4,9$ Thromben/Sichtfeld, Jam-A D1/D2 mit $112,9 \pm 5,1$ Thromben/Sichtfeld als auch das Kontrollprotein Car D1 zu einem höchst signifikanten Anstieg der Anzahl von $***p < 0,001$ der sich bildenden Thromben auf gut das Vierfache.

Die oben beschriebenen Veränderungen, die die Substanzen in der Flusskammer auf die Thrombenbildungen haben, lassen sich auch auf den repräsentativen mikroskopischen Bildern (Abbildung 22) sofort erkennen.

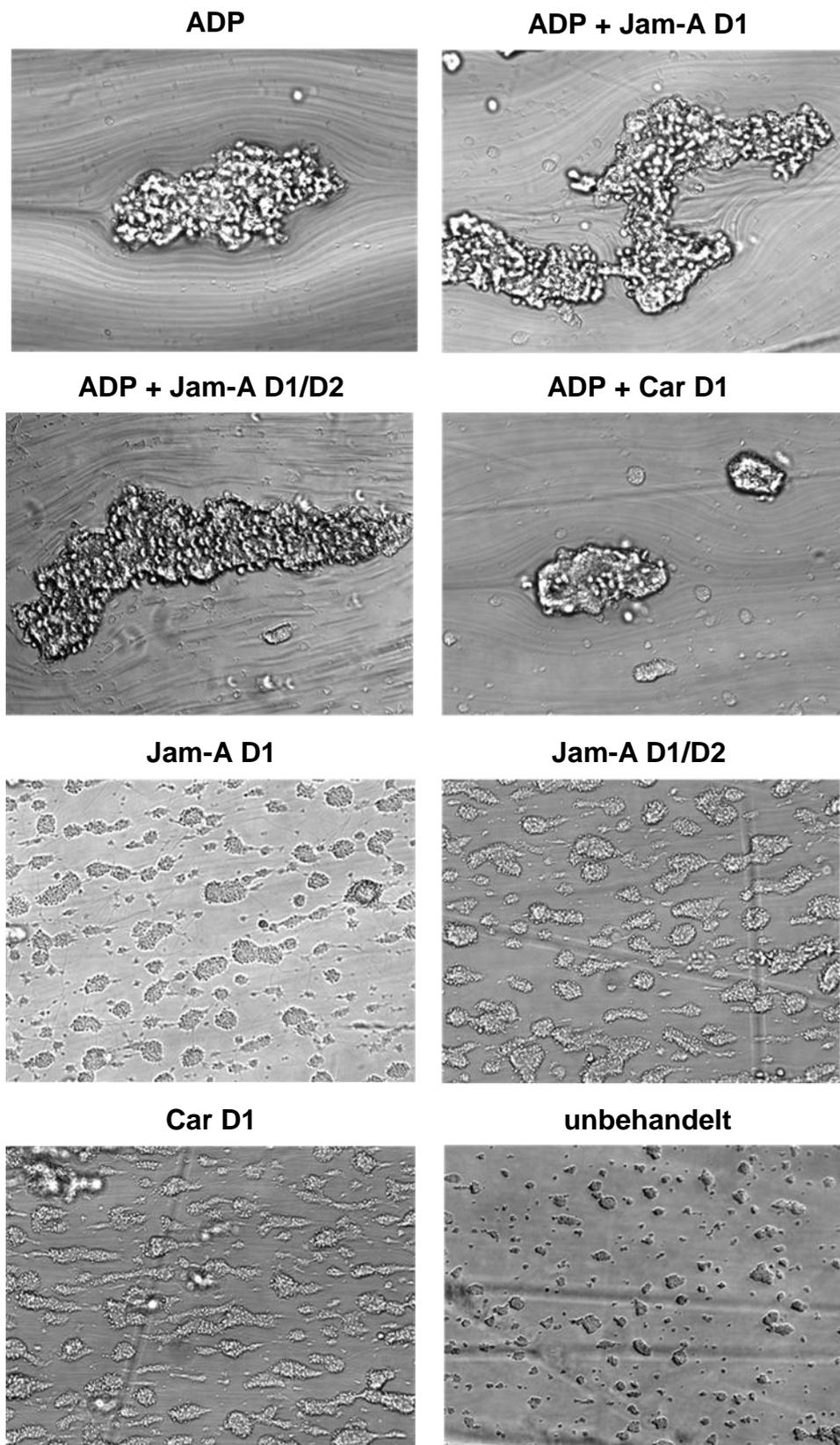


Abbildung 22: Repräsentative Beispielfotos für die sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben (Vergrößerung 200-fach) (n = 4).

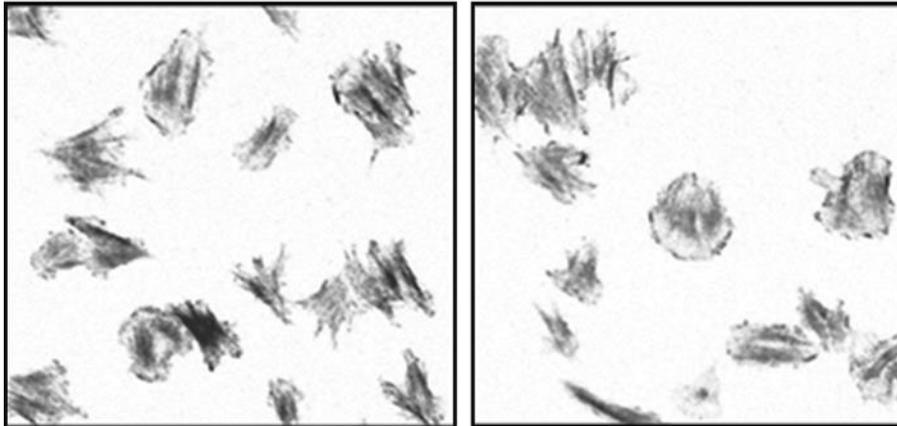
Weiterhin ließ sich unter dem Mikroskop beobachten, dass die Thromben, die sich unter den Kombinationen mit ADP bildeten, ein überproportional höheres Volumen aufwiesen. Sie konnten in sehr vielen Schnittebenen erfasst werden. Die kleinen Thromben, die sich unter den Einzelsubstanzen Jam-A D1, Jam-A D1/D2 oder Car D1 bildeten, zeigten eine nur nahezu flächige, zweidimensionale Ausdehnung und waren weniger stabil. Beide Beobachtungen wurden bei diesem Versuch jedoch nicht objektiv erfasst.

3.4 Der Einfluss von Jam-A auf die Thrombozytenspreizung

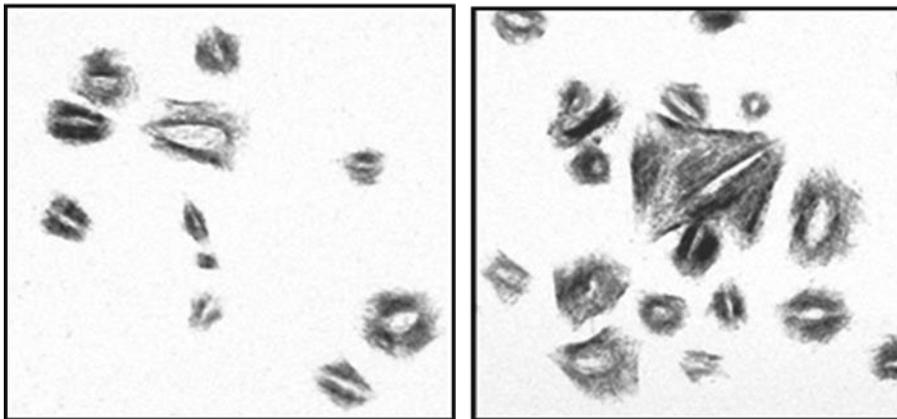
In diesem Versuch sollte geklärt werden, welchen Einfluss immobilisiertes lösliches Jam-A auf die Thrombozytenspreizung besitzt. Es wurde das Spreizungsverhalten der Thrombozyten auf den Untergründen Collagen, Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 mit Hilfe eines Konfokalmikroskops qualitativ untersucht. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 23 dargestellt.

Es fiel auf, dass nicht nur das Collagen, welches als natürlicher Thrombozytenaktivator als Positivkontrolle diente, sondern auch beide Jam-A-Varianten zu einer deutlichen Konformitätsänderung der Thrombozyten führten. Zusätzlich schien es, als formierte sich bei Jam-A eine ringförmige Struktur des Zytoskeletts, welche bei Collagen in dieser Form nicht zu beobachten war.

Collagen



Jam-A D1



Jam-A D1/D2

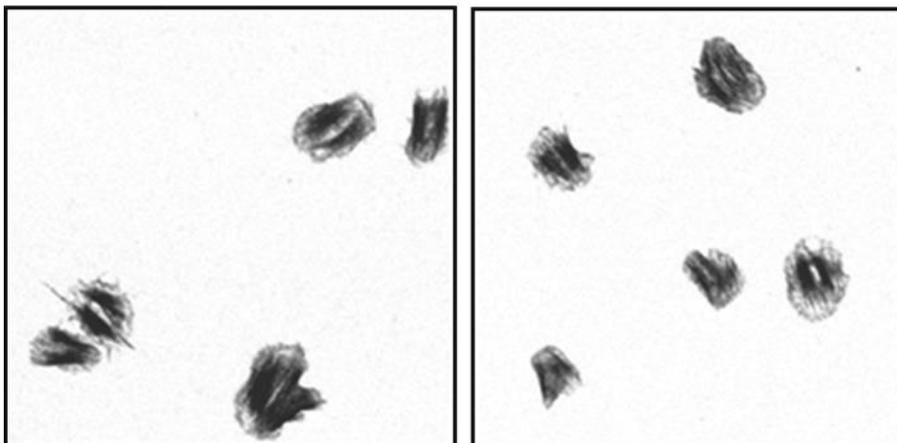


Abbildung 23: Repräsentative Beispielbilder für die Thrombozytenspreizung auf Collagen 10 µg/ml als Positivkontrolle, Jam-A D1 10 µg/ml sowie Jam-A D1/D2 30 µg/ml (Vergrößerung 100-fach sowie zweifach digitaler Zoom): Die Anfärbung erfolgte mittels Phalloidin-Antikörper. Auf beiden Jam-A Varianten ist mindestens ein ähnlich ausgeprägtes Spreizungsverhalten der Thrombozyten wie bei der Positivkontrolle Collagen zu beobachten. (Bilder von Dr. rer. nat. M. Chatterjee). Zur besseren Darstellbarkeit der Bilder in der Druckversion wurden die Farben invertiert (n = 3).

3.5 Die Wirkung von Jam-A auf die Phosphatidylexpression von Thrombozyten sowie das mitochondriale Membranpotenzial als Marker für Apoptosevorgänge

Der Einfluss von löslichem Jam-A auf die Apoptose und das Zellüberleben wurde in diesem Versuch mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) und den Markern Annexin V und TMRE untersucht.

3.5.1 Ergebnisse für Annexin V

Die Auswertung des Annexin V-Gehalts auf den Thrombozyten erfolgte nach einstündiger Inkubation (Abbildung 24).

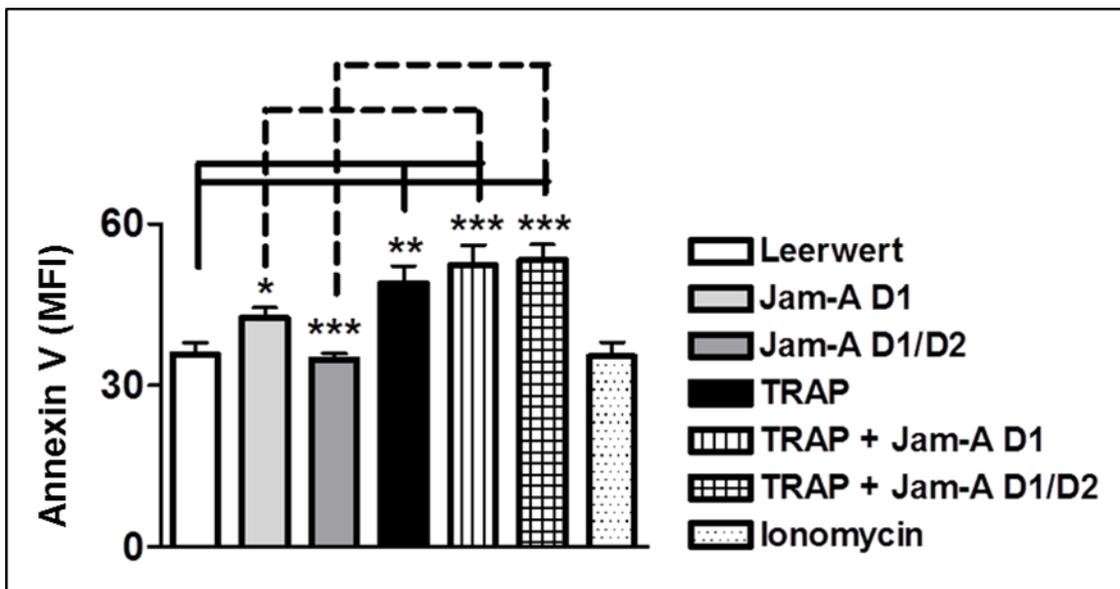


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Erfassung des Annexin V nach einer Stunde Inkubationszeit. Es zeigt sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Kombination von TRAP 25 µM mit Jam-A (D1 mit 10 µg/ml und D1/D2 mit 30 µg/ml) gegenüber Jam-A allein, was für eine verstärkte Apoptose spricht, da Annexin V an das bei der Apoptose externalisierte Phosphatidylserin bindet (n = 5).

Nach einstündiger Inkubation der Versuchsansätze mit Annexin V ist ein signifikanter Anstieg des Annexin V-Levels (Mittelwert ± SEM) bei TRAP auf $49 \pm 3,2$ MFI (**p < 0,01) und seinen Kombinationen mit Jam-A D1 auf $52,3 \pm 3,8$ MFI (**p < 0,001) beziehungsweise mit Jam-A D1/D2 auf $53,3 \pm 2,8$ MFI (**p < 0,001) gegenüber dem Leerwert mit $35,8 \pm 2,1$ MFI zu beobachten.

Weiterhin lässt sich ein signifikanter Anstieg (* $p < 0,05$) an Annexin V von TRAP mit Jam-A D1 gegenüber Jam-A D1 allein mit $42,6 \pm 1,9$ MFI nachweisen. Ebenso verzeichnet die Kombination von TRAP mit Jam-A D1/D2 einen signifikanten Anstieg (** $p < 0,001$) gegenüber Jam-A D1/D2 allein mit $34,8 \pm 1$ MFI.

Jam-A D1 sowie Jam-A D1/D2 allein unterscheiden sich nicht signifikant vom Leerwert. Bei Ionomycin handelt es sich um die Isotypenkontrolle.

Abbildung 25 enthält Beispiele für die Originalmesskurven der FACS-Analyse mit Annexin V nach einer Stunde Inkubationszeit.

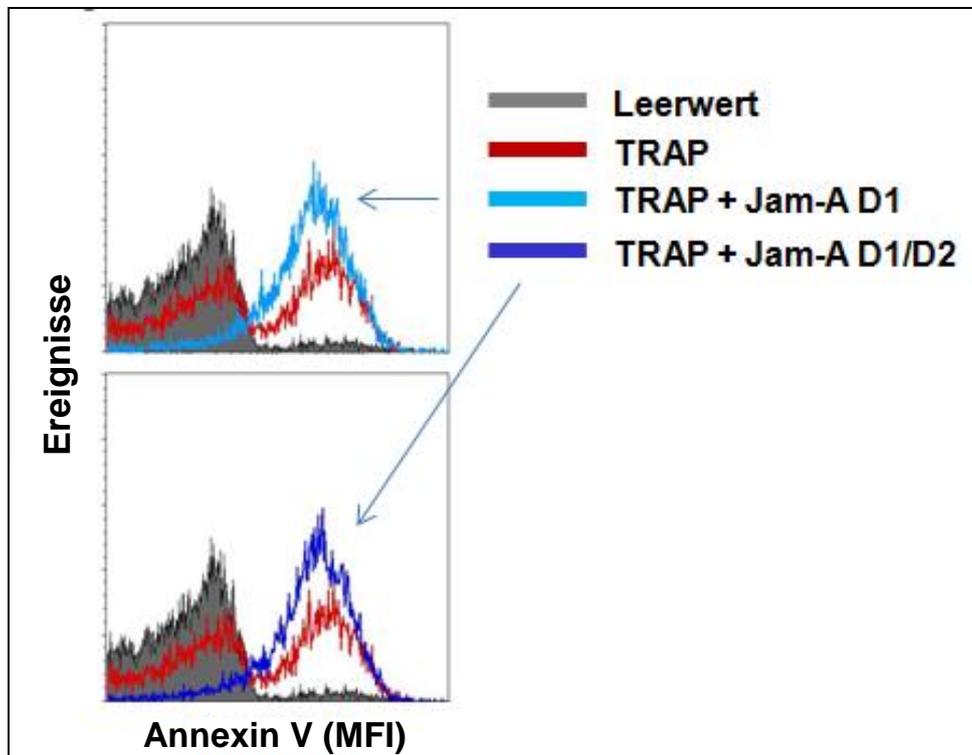


Abbildung 25: Beispiele für Originalkurven der FACS-Analyse mit Annexin V nach einer Stunde Inkubationszeit. Deutlich sichtbar ist die Rechtsverschiebung der Kurve durch Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 mit Zunahme der Fluoreszenz, was auf einen Anstieg der Apoptoseaktivität der Thrombozyten hinweist. (Grafik erstellt durch Dr. rer. nat. M. Chatterjee)

3.5.2 Ergebnisse für TMRE

Die Auswertung des TMRE-Gehalts der Thrombozyten erfolgte ebenfalls nach einer Stunde (Abbildung 26).

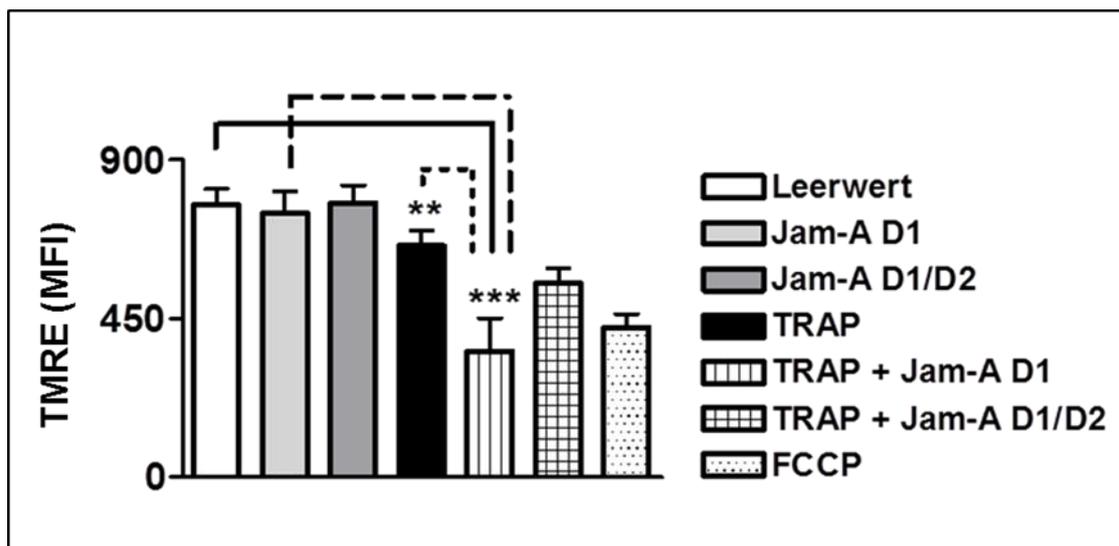


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Erfassung des TMRE nach einer Stunde Inkubationszeit. Zu sehen ist für die Kombination von TRAP 25 μ M mit Jam-A D1 10 μ g/ml gegenüber TRAP allein eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dies entspricht einer Zunahme der Apoptose, da in diesem Fall kein intaktes Membranpotenzial der Mitochondrien mehr vorliegt und somit das TMRE nicht mehr gebunden werden kann (n = 5).

Nach einstündiger Inkubationszeit geht ein hoch signifikanter Rückgang (***) des TMRE (Mittelwert \pm SEM) aus der Kombination von TRAP und Jam-A D1 mit $357,5 \pm 93$ MFI gegenüber dem Leerwert mit $772,8 \pm 46,2$ MFI beziehungsweise Jam-A D1 allein mit $747,7 \pm 64,1$ MFI hervor. Auch im Vergleich mit TRAP allein mit $656,8 \pm 41,6$ MFI besteht ein signifikanter Rückgang des TMRE von $**p < 0,01$.

Bei der Kombination von TRAP mit Jam-A D1/D2 mit $549,9 \pm 51,5$ MFI kann ebenfalls ein signifikanter Rückgang ($*p < 0,05$) gegenüber dem Leerwert und Jam-A D1/D2 allein mit $777,1 \pm 51,3$ MFI beobachtet werden. Dieser ist allerdings weniger ausgeprägt als bei TRAP mit Jam-A D1. Verglichen mit TRAP allein kann hier keine Signifikanz erreicht werden.

Abbildung 27 enthält Beispiele für die Originalmesskurven der FACS-Analyse mit TMRE nach einer Stunde Inkubationszeit.

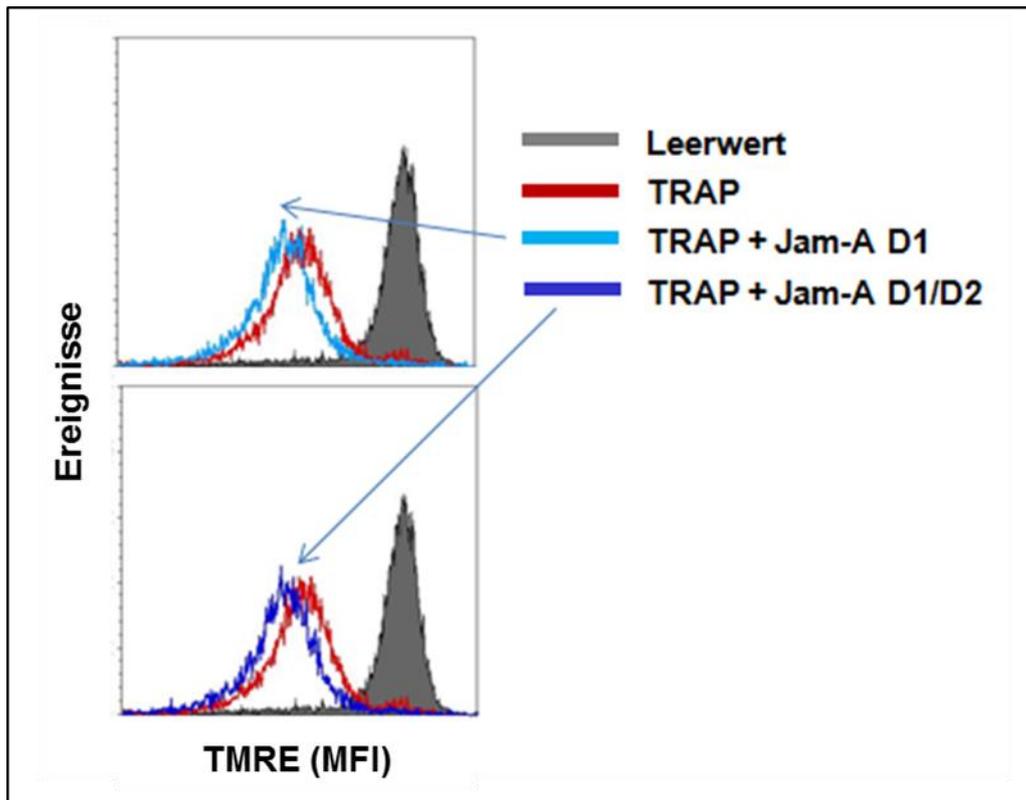


Abbildung 27: Beispiele für Originalkurven der FACS-Analyse mit TMRE nach einer Stunde Inkubationszeit. Erkennbar ist für Jam-A D1 10 µg/ml und Jam-A D1/D2 30 µg/ml in Kombination mit TRAP 25 µM eine Linksverschiebung der Kurve mit Abnahme der Ereigniszahl und auch der Fluoreszenz. Beides entspricht einer Zunahme der Apoptose, da hierbei kein intaktes Membranpotenzial der Mitochondrien mehr vorliegt und somit das TMRE nicht mehr gebunden werden kann. (Grafik erstellt durch Dr. rer. nat. M. Chatterjee)

3.6 Der Effekt von Jam-A in Kombination mit ADP auf die Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen

In diesem Versuch wurde mittels einer Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen die Thrombozyten-Adhäsion auf aktivierten Endothelzellen untersucht. Beurteilt wurden die Unterschiede zwischen Jam-A D1 beziehungsweise Jam-A D1/D2 allein gegenüber der Kombination mit dem Thrombozytenaktivator ADP. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 28 dargestellt.

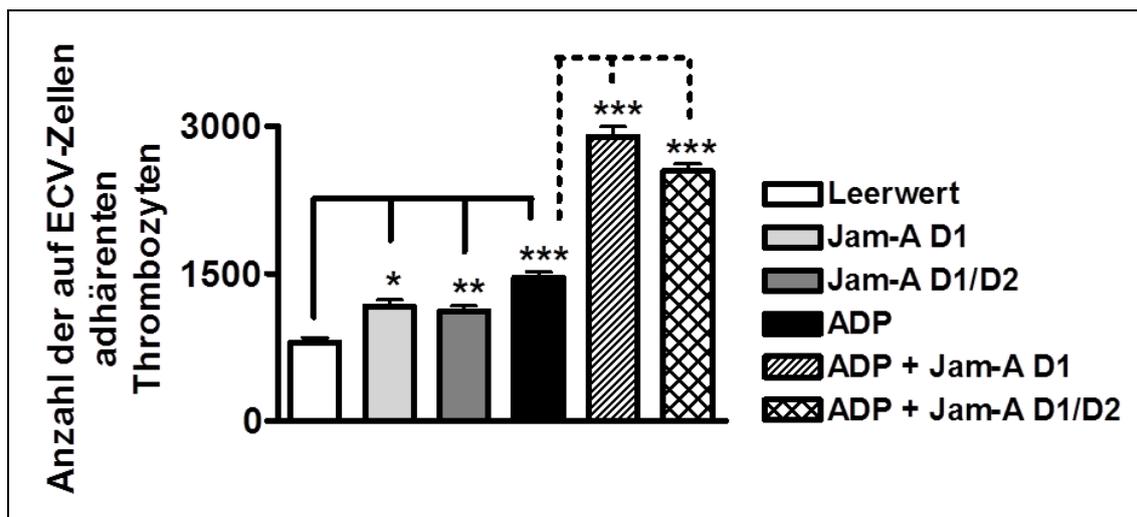


Abbildung 28: Anzahl der unter arteriellen Flussbedingungen auf ECV-Zellen adhärenen Thrombozyten. Gezeigt sind Jam-A D1 10 µg/ml und Jam-A D1/D2 30 µg/ml allein, sowie in Kombination mit ADP 10 µM. Es zeigt sich ein höchst signifikanter Anstieg der adhärenen Thrombozyten bei der Kombination von ADP mit Jam-A gegenüber ADP allein. Aber auch Jam-A allein verzeichnet bereits eine leichte Zunahme (n = 3).

Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 zeigen gegenüber dem Leerwert (Mittelwert \pm SEM) von $803,8 \pm 45,7$ Thrombozyten/Sichtfeld beide einen signifikanten Anstieg der auf Endothelzellen adhärenen Thrombozyten. Dies sind 1163 ± 67 Thrombozyten/Sichtfeld (* $p < 0,05$) bei Jam-A D1 und $1119 \pm 51,9$ Thrombozyten/Sichtfeld (** $p < 0,01$) bei Jam-A D1/D2.

ADP allein erreicht einen höchst signifikanten Anstieg von *** $p < 0,001$ mit $1462 \pm 51,3$ Thrombozyten/Sichtfeld gegenüber dem Leerwert. Jam-A D1 führt in Kombination mit ADP zu einer weiteren drastischen Steigerung der adhärenen Thrombozyten auf $2892 \pm 102,1$ Thrombozyten/Sichtfeld, was einem *** $p < 0,001$ entspricht. Die Kombination von Jam-A D1/D2 mit ADP bewirkt ebenfalls eine deutliche Steigerung auf $2544 \pm 71,6$ Thrombozyten/Sichtfeld mit *** $p < 0,001$. Diese ist jedoch etwas schwächer und unterscheidet sich signifikant mit *** $p < 0,001$ von ADP mit Jam-A D1.

In Abbildung 29 sind repräsentative Beispielbilder des Flusskammerversuchs zur Thrombozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen unter arteriellen Flussbedingungen dargestellt.

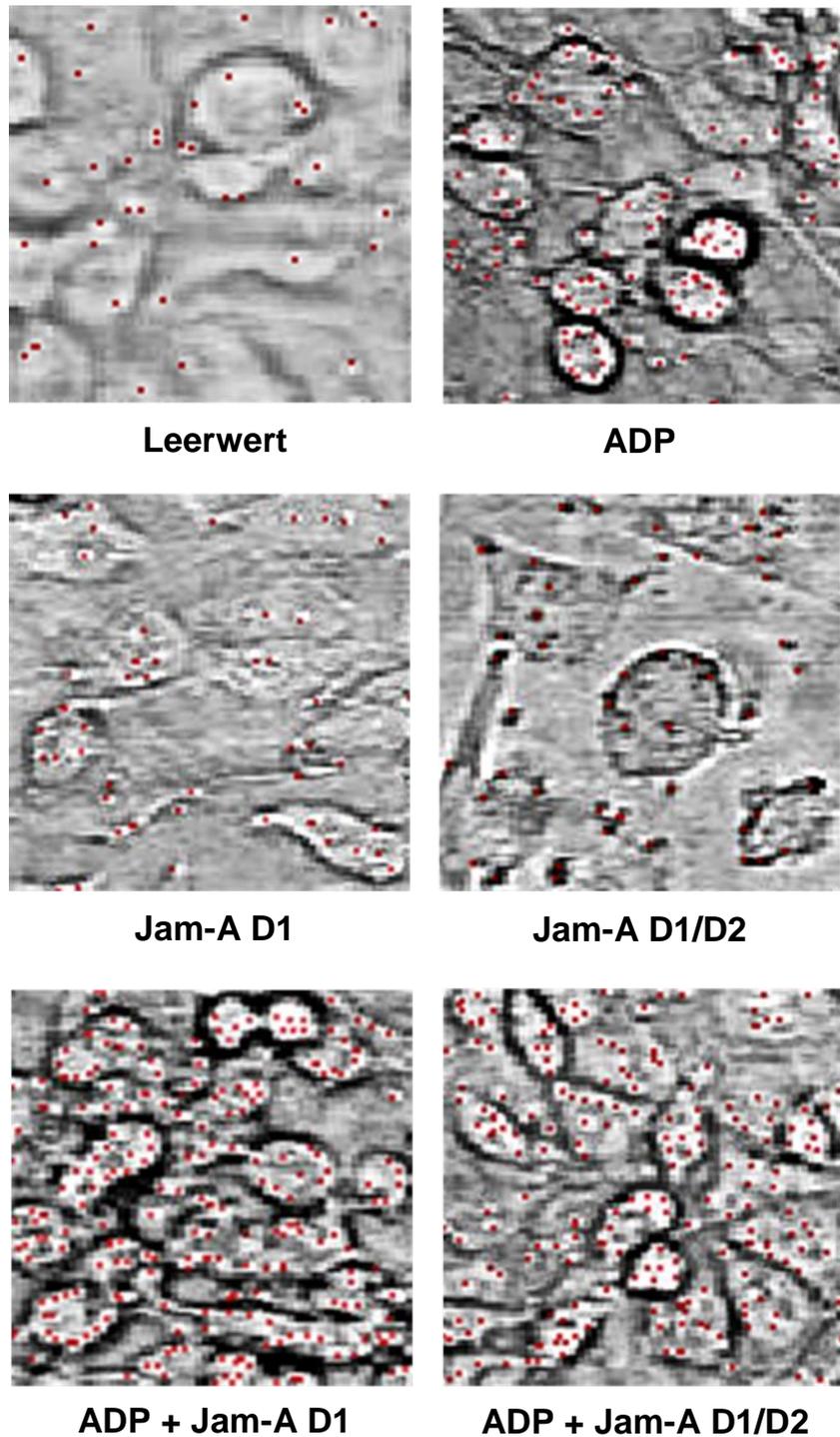


Abbildung 29: Repräsentative Beispielbilder zur Interaktion zwischen Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen in 200-facher Vergrößerung. Deutlich sichtbar ist der erheblich größere Anteil an adhärennten Thrombozyten bei den Flusskammerdurchläufen mit ADP 10 μ M in Kombination mit Jam-A D1 10 μ g/ml und Jam-A D1/D2 30 μ g/ml.

3.7 Der Einfluss von Jam-A in Kombination mit TRAP auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollten Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von löslichem Jam-A allein oder in Kombination mit dem Thrombozyten-Agonist TRAP auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten gewonnen werden. Als Marker wurden CD42b-PE für Thrombozyten und CD14-FITC für Monozyten eingesetzt. Nach Erhalt der Probenmesswerte durch das FACS wurden die Daten wie folgt ausgewertet: Einfach positive Zellen für CD42b entsprechen Thrombozyten, einfach positive Zellen für CD14 zeigen Monozyten an. Entscheidend war der relative Prozentsatz von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten, die sich in Form von doppelt-positiven Zellen (CD42b / CD14) darstellen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 30 und Abbildung 31 zu sehen. Repräsentative Beispiele in Form von Punktwolkendiagrammen zeigt die Abbildung 32.

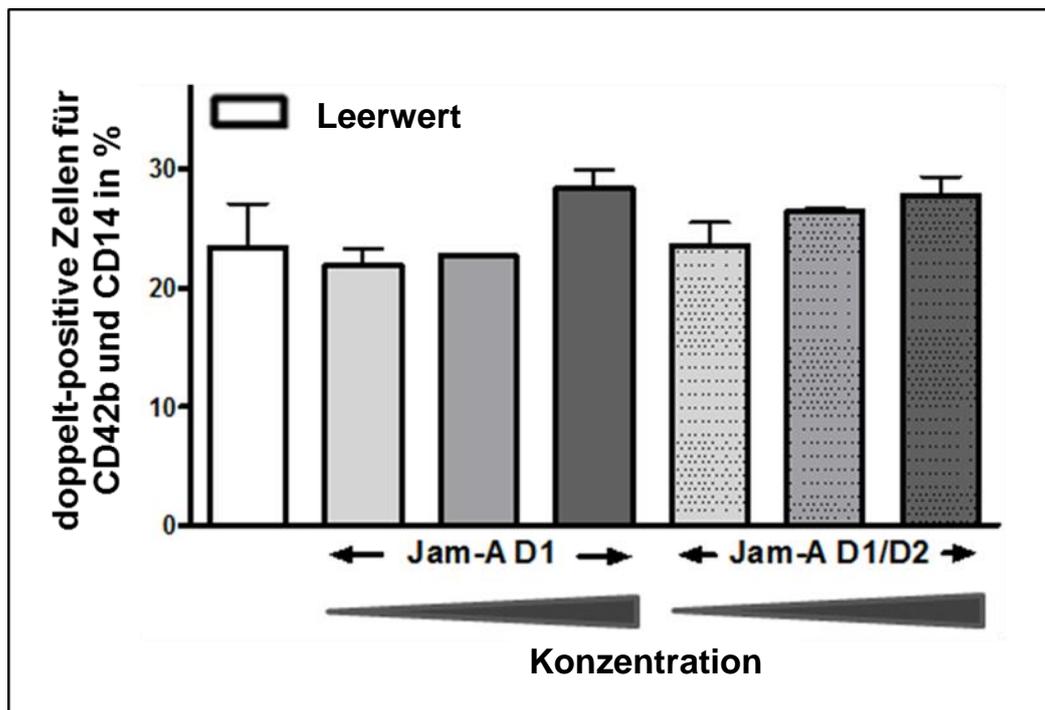


Abbildung 30: Auswirkung von Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 allein auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten. Durchflusszytometrisch erfasst wurde dabei der Anteil der CD42b / CD14-doppelt-positiven Zellen. Jam-A D1 wurde in den steigenden Konzentrationen von 2,5, 5 und 10 µg/ml sowie Jam-A D1/D2 in den Konzentrationen 7,5, 15 und 30 µg/ml eingesetzt. Es waren keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Leerwert festzustellen (n = 4).

Weder Jam-A D1 allein noch Jam-A D1/D2 allein kann in einer seiner Konzentrationen einen signifikanten prozentualen Anstieg der Zahl der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate (Mittelwert \pm SEM) gegenüber dem Leerwert von $23,7 \pm 3,7$ % erreichen. Dennoch fällt auf, dass die höchsten Konzentrationen auch die größte Anzahl von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten nach sich ziehen. Jam-A D1 10 μ g/ml allein liegt bei $28,3 \pm 1,5$ %, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml bei $27,8 \pm 1,6$ %.

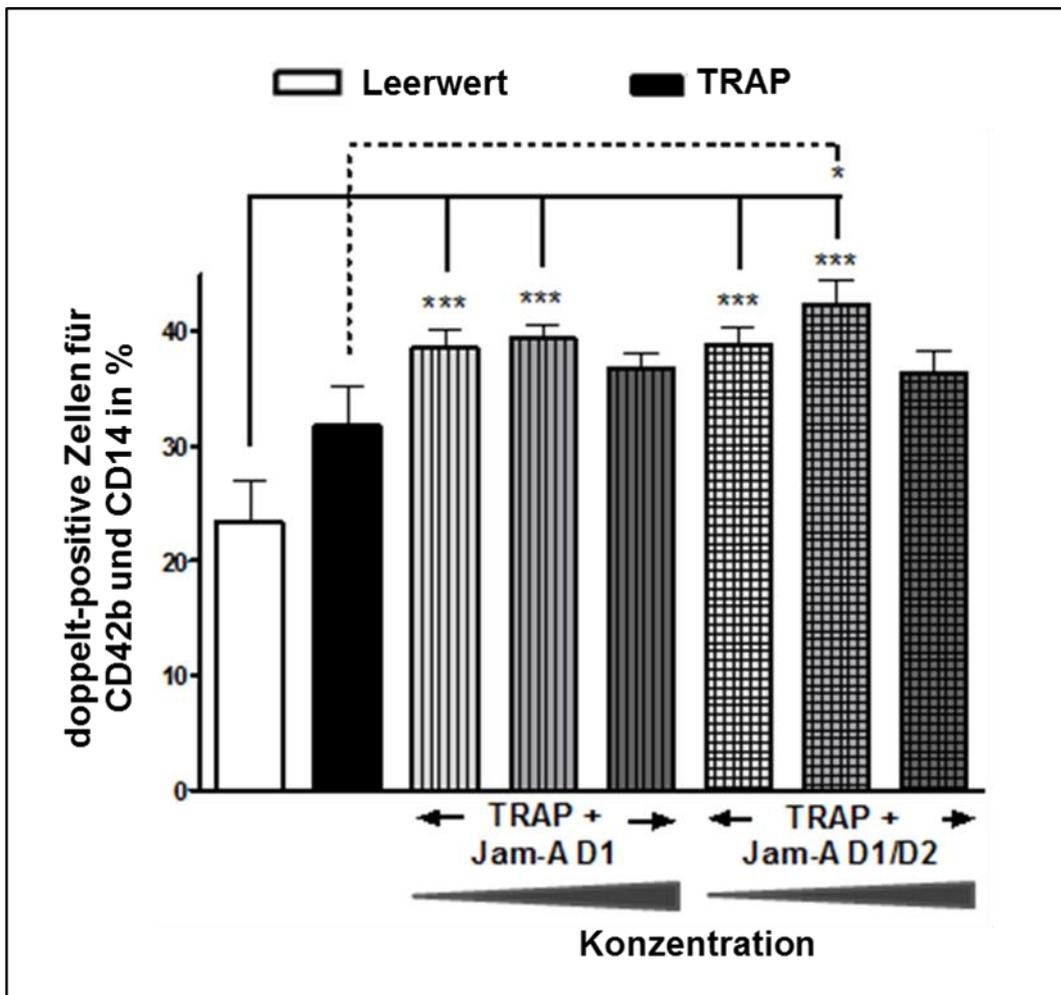


Abbildung 31: Auswirkung von Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 in Kombination mit dem Thrombozytenaktivator TRAP 25 μ M auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten. Durchflusszytometrisch erfasst wurde dabei der Anteil der CD42b / CD14-doppelt-positiven Zellen. Jam-A D1 wurde in den steigenden Konzentrationen von 2,5, 5 und 10 μ g/ml sowie Jam-A D1/D2 in den Konzentrationen 7,5, 15 und 30 μ g/ml eingesetzt. Gemessen wurde gegen einen Leerwert und TRAP 25 μ M allein. Es konnten sowohl in der Kombination mit Jam-A D1 als auch mit Jam-A D1/D2

Ergebnisse

signifikante Anstiege bei der Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten beobachtet werden ($n = 4$).

Einen hoch signifikanten Zuwachs ($***p < 0,001$) an Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten können die Kombinationen von TRAP und Jam-A D1 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ($38,5 \pm 1,6 \%$) und 5 $\mu\text{g/ml}$ ($39,3 \pm 1,3 \%$) sowie TRAP mit Jam-A D1/D2 7,5 $\mu\text{g/ml}$ ($38,8 \pm 1,6 \%$) und 15 $\mu\text{g/ml}$ ($42,2 \pm 2,3 \%$) gegenüber dem Leerwert verzeichnen. TRAP in Kombination mit Jam-A D1/D2 15 $\mu\text{g/ml}$ erlangt alleinig auch im Vergleich zu TRAP allein ($31,8 \pm 3,3 \%$) eine signifikante Zunahme ($*p < 0,05$) der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate.

TRAP in Verbindung mit Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$ ($36,8 \pm 1,2 \%$) beziehungsweise mit Jam-A D1/D2 30 $\mu\text{g/ml}$ ($36,4 \pm 1,8 \%$) erzielt zwar eine erhebliche Steigerung gegenüber dem Leerwert, doch reicht es für keinen Signifikanzgrad.

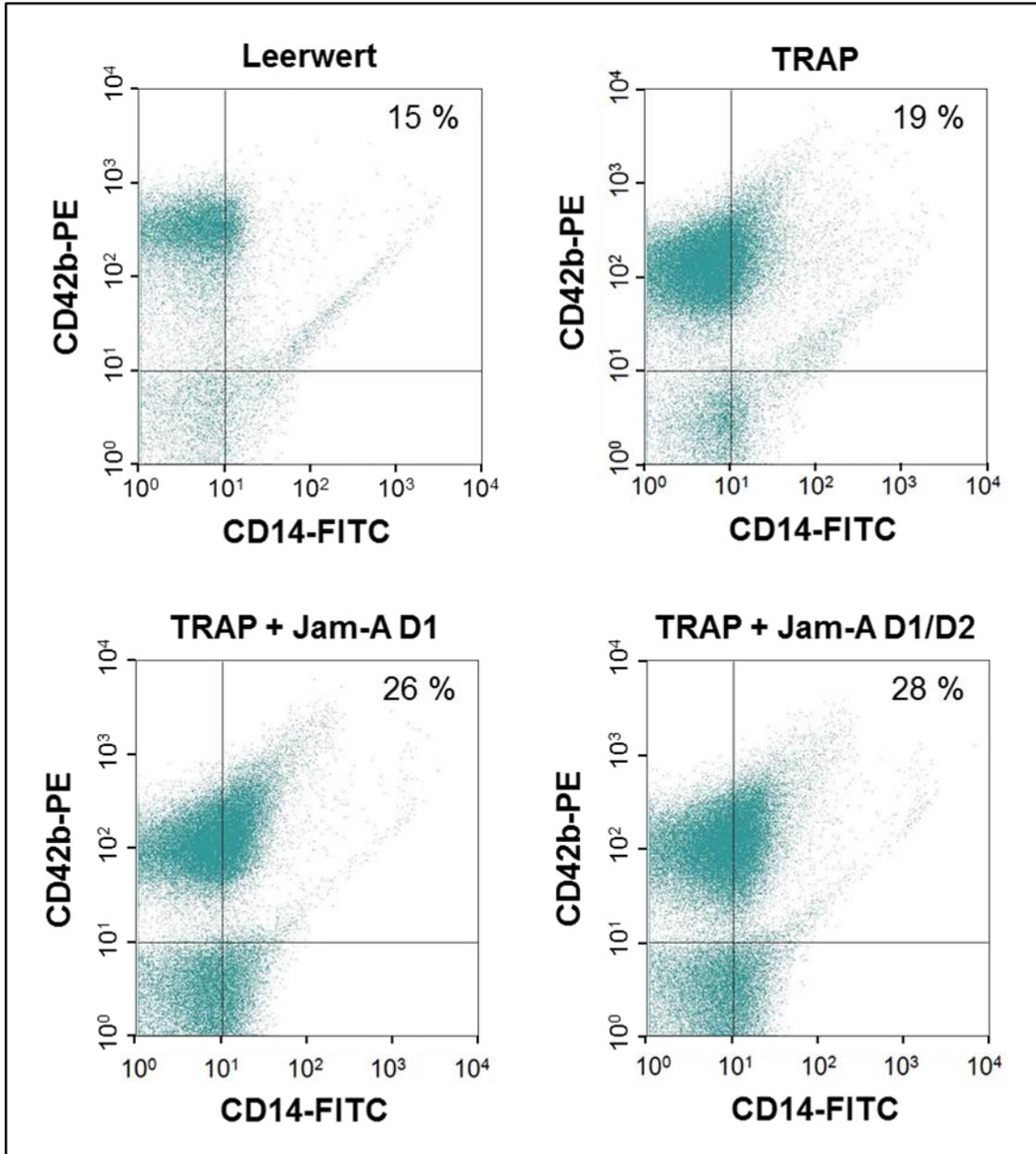


Abbildung 32: Repräsentative Punktwolkendiagramme zur Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten in der Durchflusszytometrie. Der Anteil der CD42b / CD14-doppelt-positiven Zellen, die als Thrombozyten-Monozyten-Aggregate gewertet wurden, befinden sich im oberen rechten Quadranten. Sowohl die Kombination von TRAP 25 μ M mit Jam-A D1 10 μ g/ml als auch in Kombination mit Jam-A D1/D2 30 μ g/ml konnte einen Zuwachs der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate im Gegensatz zu TRAP 25 μ M allein verzeichnen. (Erstellung dieser Grafiken durch Dr. rer. nat. M. Chatterjee)

3.8 Die Auswirkung von löslichem Jam-A auf die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung

In einer gemischten Thrombozyten-Monozyten-Zellkultur sollten Erkenntnisse über die Auswirkung von löslichem Jam-A auf die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung gewonnen werden. Unter dem Mikroskop wurde die Zahl der entstandenen Makrophagen erfasst. Das Ergebnis offenbart Abbildung 33.

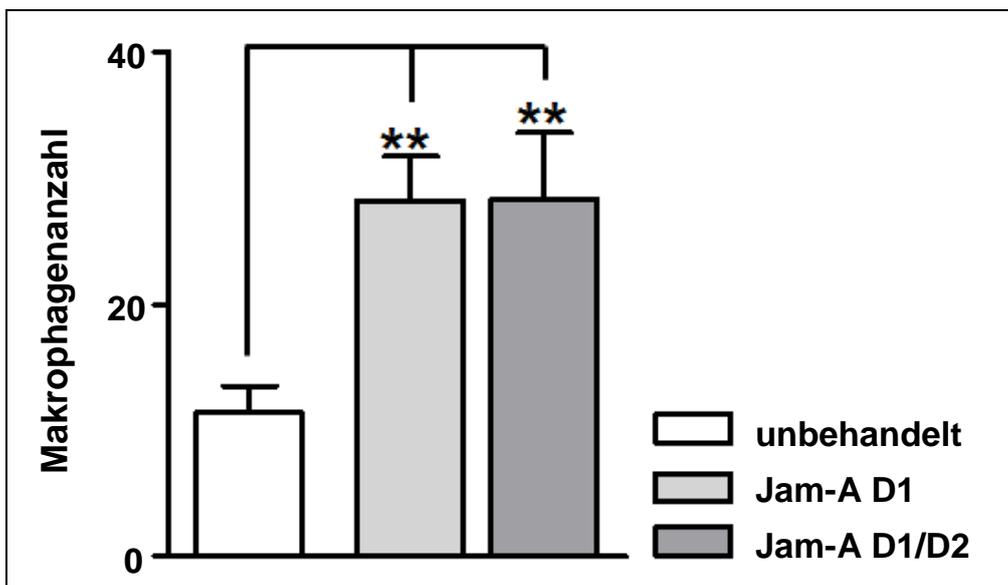


Abbildung 33: Monozyten-Makrophagen-Differenzierung: Anzahl der Makrophagen in der Zellkultur pro Bild. Untersucht wurden die Ansätze von Monozyten mit Thrombozyten (unbehandelt) sowie in Kombination mit Jam-A D1 10 µg/ml, beziehungsweise Jam-A D1/D2 30 µg/ml. Es lässt sich ein signifikanter Anstieg der Makrophagenanzahl durch den Zusatz von Jam-A beobachten (n = 5).

Es zeigt sich eine hohe Signifikanz von $**p < 0,01$ bei der Betrachtung der Makrophagenanzahl im Vergleich des unbehandelten Ansatzes (11,4 ± 2,1 Makrophagen/Sichtfeld) mit der Kombination von Jam-A D1 (28,2 ± 0,96 Makrophagen/Sichtfeld) beziehungsweise mit Jam-A D1/D2 (28,3 ± 5,3 Makrophagen/Sichtfeld).

In Abbildung 34 sind repräsentative Beispielbilder zusammengefasst. Darauf bestätigt sich deutlich der Anstieg der Makrophagenanzahl durch Jam-A.

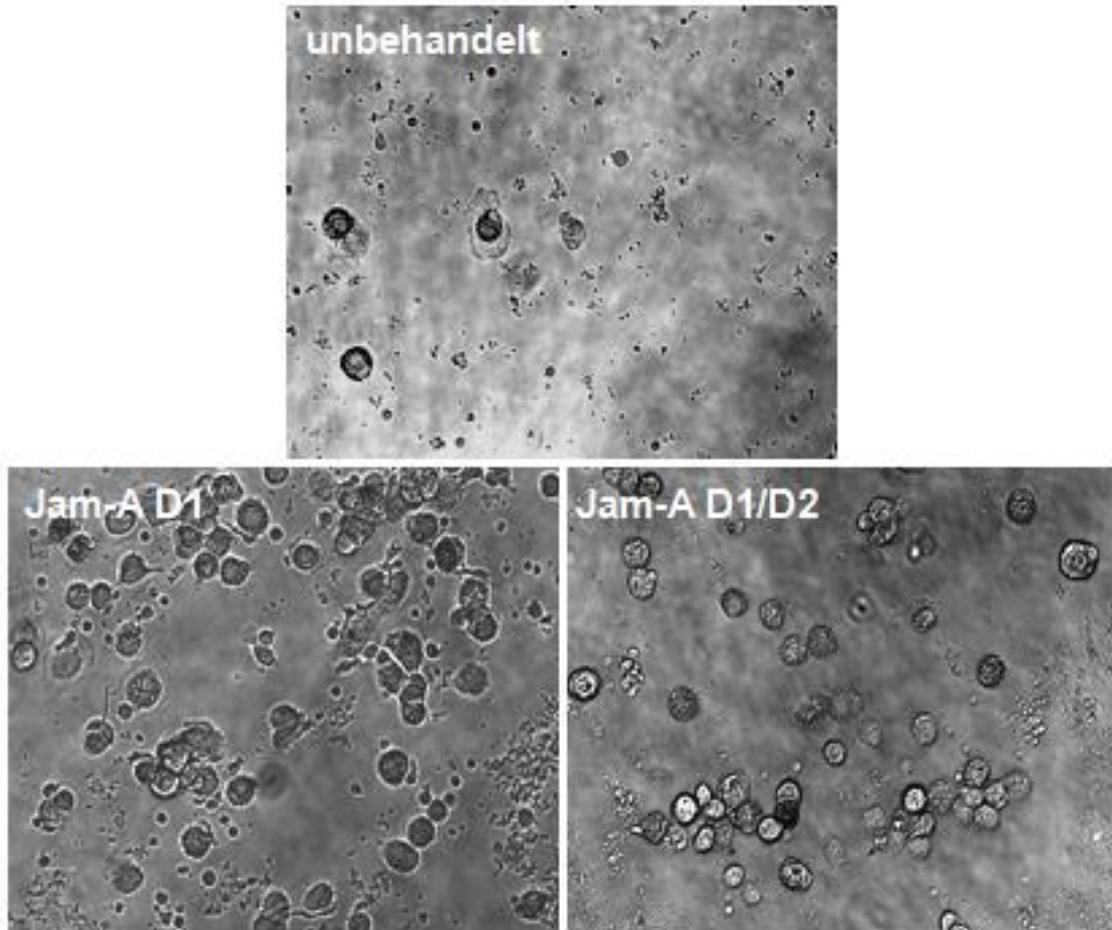


Abbildung 34: Monozyten-Makrophagen-Differenzierung: Repräsentative Beispielbilder in 200-facher Vergrößerung. Es lässt sich ein deutlicher Anstieg der Makrophagenanzahl in beiden Ansätzen mit Jam-A beobachten. (Diese Beispielbilder wurden von Dr. rer. nat. M. Chatterjee aufgenommen).

4 Diskussion

4.1 Die Auswirkungen von löslichem Jam-A auf die Thrombozytenfunktion und Thrombose

4.1.1 Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten

Mittels Durchflusszytometrie [105], [108], [109], [110] und der Markierung der Thrombozyten mit CD62P konnte gezeigt werden, dass Jam-A D1 zu einer signifikanten Steigerung der thrombozytären Degranulation gegenüber dem Agonisten ADP allein führt.

PAC-1, als Marker für die Aktivierung der Thrombozyten, konnte zwar einen signifikanten Anstieg der Thrombozytenaktivierung der Kombination von Jam-A D1 und ADP nachweisen, jedoch nur gegenüber dem Leerwert und nicht gegenüber ADP allein. Es ist nichtsdestotrotz ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Messwerten erkennbar.

Dass Jam-A einen positiven Einfluss auf die Aktivierung und Sekretion von Thrombozyten hat, berichteten auch Kornecki et al. [39], Wang et al. [40] sowie Naik et al. [38]. Kornecki et al. verzeichneten eine verstärkte Freisetzung von ATP sowie Serotonin nach Bindung des stimulierenden Jam-A-Antikörpers m.Ab.F11 an Thrombozyten [39]. Wang et al. nutzten für den Nachweis der Thrombozytenaktivierung durch den stimulierenden Antikörper m.Ab.F11 die direkte Messung des Proteinkinase C-Spiegels [40], eines „*second messenger*“, der eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Der Anstieg der Proteinkinase C ist unverzichtbar für die sich anschließende Sekretion der Thrombozyten und ein sicheres Zeichen für die Thrombozytenaktivierung. Durch den Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen den Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor sowie den Fc γ RIIA-Rezeptor konnte nachgewiesen werden, dass beide für die Thrombozytenaktivierung benötigt werden [40]. Obwohl Naik et al. eine Hyperaggregation bei Thrombozyten aus Jam-A-Knockout-Mäusen nachweisen konnten, verzeichneten sie eine gleichbleibend starke Thrombozytenaktivierung im

Gegensatz zu Thrombozyten aus Jam-A-Wildtyp-Mäusen. Sie ermittelten dafür sowohl die P-Selektin-Expression als Marker für die Thrombozytenaktivierung als auch die ATP-Freisetzung als Zeichen der Sekretion und Freisetzung von α -Granula [38].

Da Jam-A auch *in vivo* auf das ADP der Thrombozyten trifft, könnte es aufschlussreich sein, die Degranulation *in vivo* messen zu können, um zu schauen, ob sich die Ergebnisse bestätigen. Ebenso könnte eine weitere Versuchsdurchführung *in vitro* in Begleitung des Kontrollproteins Car D1 hilfreich sein, um etwaige unerkannte Effekte auszuschließen, die nicht auf das Jam-A D1 selbst zurückzuführen sind. Weiterhin wäre eine Analyse der Effekte des natürlich vorkommenden Jam-A D1/D2 von Nutzen.

4.1.2 Thrombozytenspreizung

Es hat sich bei der vergleichenden Untersuchung des Verhaltens von gewaschenen Thrombozyten auf den Untergründen Collagen, Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 herausgestellt, dass alle Substanzen zu einer Konformitätsänderung der Thrombozyten im Sinne einer Thrombozytenspreizung führen. Bei Jam-A D1 sowie Jam-A D1/D2 ließ sich zusätzlich die Formierung eines Ringes am Rande der Thrombozyten beobachten.

Sobocka et al. [28] sowie Babinska et al. [37] berichteten ebenfalls von einem positiven Effekt von Jam-A auf die Thrombozytenspreizung. Sobocka et al. beschrieben Vorgänge der Thrombozytenspreizung nach Bindung von Thrombozyten an den immobilisierten aktivierenden Jam-A-Antikörper m.Ab.F11. Bereits nach wenigen Minuten bildeten sich Filopodien sowie Lamellipodien aus. Dieser Vorgang war, wie der Einsatz blockierender Antikörper bewies, unabhängig von der Aktivität des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors sowie des Fc γ RIIA-Rezeptors [28]. Babinska et al. beobachteten mithilfe von Fluoreszenzmarkierung und Konfokalmikroskopie die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes lösliches rekombinantes Jam-A. Verhindern ließ sich diese Bindung durch die Hinzugabe von weiterem löslichem Jam-A [37].

Naik et al. schilderten hingegen bei Jam-A-defizienten Thrombozyten unter anderem eine verstärkte Thrombozytenspreizung auf immobilisiertem Fibrinogen. Bei dem Blut der Jam-A-defizienten Mäuse kam es nicht nur früher zur Thrombozytenspreizung sondern auch die Gesamtfläche der ausgebreiteten Thrombozyten war größer. Sie führten diese neue Erkenntnis auf eine negativ regulierende Wirkung des Proteins Jam-A in ruhenden Thrombozyten auf den Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor zurück [32].

4.1.3 Thrombozytenaggregation in Kombination mit ADP

Mit Hilfe der sehr etablierten Methode der Aggregometrie [116] konnte gezeigt werden, dass Jam-A D1 10 $\mu\text{g/ml}$ sowie Jam-A D1/D2 in Kombination mit dem Agonisten ADP zu einer signifikanten Steigerung der Thrombozytenaggregation gegenüber den Einzelsubstanzen führen. Dabei erreichte Jam-A D1 stets höhere Werte als Jam-A D1/D2. Jam-A allein, gleich in welcher Konzentration, zeigte keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation.

Die Aggregometrie wurde wegen des großen Erfahrungsschatzes bezüglich dieser Untersuchung gewählt. Einen besonderen Stellenwert hat sie beispielsweise auch bei der Erforschung der Wirkung neuer Antikoagulanzen [117] beziehungsweise deren Vergleich mit der derzeitigen Leitlinientherapie oder bei der Risikovorhersage für kardiovaskuläre Ereignisse [116].

Den positiven Effekt von Jam-A auf die Thrombozytenaggregation bestätigen auch Kornecki et al. [39], Wang et al. [40] sowie Naik et al. [38]. Kornecki et al. wiesen Thrombozytenaggregation nach, die durch membranständiges Jam-A auf Thrombozyten ausgelöst wurde, welches mit Hilfe eines aktivierenden F11-Antikörpers stimuliert wurde [39]. Wang et al. ergänzten den obigen Versuch nach eigener Durchführung durch die Hinzugabe von Antikörpern gegen den Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor sowie den Fc γ RIIA-Rezeptor wodurch es zu keiner Aggregation mehr kam. Dies belegte einen wichtigen Beitrag beider Rezeptoren an der Thrombozytenaggregation [40]. Naik et al. setzten ebenfalls den stimulierenden Antikörper gegen membranständiges Jam-A auf Thrombozyten ein und bestätigten sowohl die durch Jam-A ausgelöste Aggregation als auch die

Inhibition durch einen Antikörper gegen den FcγRIIA-Rezeptor [38]. Babinska et al. erforschten erstmals die Wirkung der löslichen Form des Jam-A in Form eines rekombinanten Proteins. Dabei entdeckten sie eine inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation. Sie erklärten dies damit, dass das lösliche Jam-A die homophilen Interaktionen des membranständigen Jam-A auf Thrombozyten verhindern würde [41].

Da Jam-A die Thrombozytenaggregation mit ADP, welches während der Hämostase ganz natürlich von den Thrombozyten ausgeschüttet wird, fördert, könnte es möglicherweise klinisch interessant sein, die Interaktion von Jam-A mit ADP zum Beispiel durch einen Antagonisten zu unterbinden wie es auch weitere Autoren bereits vorgeschlagen haben [29], [37], [55]. Erste Versuche dazu waren mit „Peptid 4D“ im Mausmodell bereits erfolgreich [41].

4.1.4 Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen

In der vorliegenden Arbeit hat sich mit Hilfe der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen herausgestellt, dass ADP in Kombination mit löslichem Jam-A zur Bildung von großen, stabilen, voluminösen Thromben führt. Jam-A allein hingegen zeigt keine diesbezügliche Wirkung. Wie auch beim Kontrollprotein Car D1 bildeten sich bedingt durch die Collagenbeschichtung der Deckgläschen (was eine thrombogene Oberfläche darstellt) eine große Anzahl sehr kleiner, flacher Thromben, die gleichmäßig über das gesamte Deckgläschen verteilt waren.

Es wurde für die Durchführung des Versuches die Flusskammer mit arteriellen Flussbedingungen sowie eine Deckgläschenbeschichtung mit Collagen gewählt, um die *in vivo*-Bedingungen möglichst realistisch darzustellen. In diesem Zusammenhang stellt die Flusskammer eine sehr etablierte Methode dar [110], [112].

Ein vergleichbarer Versuch wurde bisher noch nicht durchgeführt, doch Babinska et al. untersuchten die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes lösliches Jam-A. Eine Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie ADP oder Collagen führte zu einer verstärkten Adhäsion [37]. Naik et al. verzeichneten

hingegen eine verstärkte und schnellere Thrombusbildung bei Jam-A-defizienten Mäusen. Verantwortlich dafür machten sie das thrombozytäre Jam-A. Auch zeigten Jam-A-defiziente Mäuse eine große Anzahl sowie eine gesteigerte Größe an Mikroemboli nach Auslösung einer Lungenembolie durch intravenöse Injektion eines Collagen-Epinephrin-Gemischs [32].

4.2 Der Einfluss von löslichem Jam-A auf die Thrombozyten-interaktion mit Monozyten

4.2.1 Thrombozyten-Monozyten-Aggregate

Durchflusszytometrisch wurden die Thrombozyten-Monozyten-Aggregate in Form von CD42b-CD14-doppelt positiven Zellen im Quadranten UR erfasst. Gemessen wurden Jam-A D1 mit 2,5, 5 und 10 µg/ml, Jam-A D1/D2 mit 7,5, 15 und 30 µg/ml und TRAP 25 µM allein, sowie alle Jam-A-Kombinationen mit TRAP.

Keine der Einzelsubstanzen führte zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate. Hingegen konnten die Kombinationen von TRAP mit Jam-A D1 mit 2,5 und 5 µg/ml sowie mit Jam-A D1/D2 mit 7,5 und 15 µg/ml die Aggregatbildung signifikant gegenüber dem Leerwert steigern. TRAP und Jam-A D1/D2 7,5 µg/ml erzielte sogar eine signifikante Steigerung gegenüber TRAP allein. Interessanterweise konnte weder Jam-A D1 10 µg/ml, welches in den anderen Versuchen immer sehr aktiv war, noch Jam-A D1/D2 gemeinsam mit TRAP einen signifikanten Unterschied zum Leerwert nachweisen.

Zum Nachweis von Zellaggregaten erschien die Durchflusszytometrie aufgrund der Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung der Zellen als gut geeignet. Da es sich um ein Standardverfahren für diesen Zweck handelt, ist von aussagekräftigen Ergebnissen auszugehen.

Zur Auswirkung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten wurde in der Literatur schon zahlreich Stellung bezogen, jedoch noch nicht im Hinblick auf den

Einfluss von löslichem Jam-A. In der Veröffentlichung von Michetti et al. konnte nachgewiesen werden, dass sich zwischen aktivierten Thrombozyten und Monozyten, beziehungsweise neutrophilen Leukozyten Aggregate bilden. Diese Aggregate fanden sich insbesondere im Blut von Patienten mit Erkrankungen wie der Arteriosklerose, dem Akuten Koronarsyndrom, zerebrovaskulären Ischämien und Schlaganfällen, bei Sepsis oder Diabetes [118]. Furman et al. schlugen die Erfassung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten als frühen Marker für einen akuten Myokardinfarkt vor. Dem schlossen sich Lippi et al. an [119]. Bereits vier Stunden nach Symptombeginn zeigten sich signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe [120]. Neuman et al. bestätigten das vermehrte Vorkommen von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Weiterhin stellten sie, ausgelöst durch die Aggregatbildung, die Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine durch die Monozyten fest [102]. Din et al. wiesen eine Reduktion dieser Aggregate um 35 % bei gesunden Probanden nach einer vierwöchigen Diät mit Omega-3-Fettsäuren nach [121]. Michelson et al. entdeckten, dass die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten *in vivo* einer der sensibelsten Marker für die Aktivierung von Thrombozyten darstellen könnte [59]. Laut van Gils et al. erleichtert die Aggregatbildung den Monozyten die Transmigration [18] [98]. Durch die vermehrte Haftung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate an Endothelzellen [18] wirken diese laut da Costa Martins et al. vermehrt atherogen [98]. Weiterhin fördert die Aggregatbildung die Entzündungsreaktion und prothrombotische Funktionen [18], [95]. Die Aggregatbildung führt zu einer schnellen Bindung an entzündetes Endothel. Als unverzichtbar für die Aggregatbildung und die Haftung am Endothel stellte sich das P-Selektin [98] der aktivierten Thrombozyten sowie das freigesetzte Zytokin RANTES heraus [95], [63], welches noch viele weitere atherogene Eigenschaften besitzt [18].

4.2.2 Monozyten-Makrophagen-Differenzierung

Durch die kombinierte Zellkultur von Monozyten, Thrombozyten sowie dem Zusatz von Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 konnte nachgewiesen werden, dass lösliches Jam-A die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung fördert.

Eine genaue Entsprechung dieses Versuchs ist in der Literatur bisher nicht zu finden. Beurteilt wurde aber der Einfluss von Jam-A auf die Monozytenrekrutierung. Dabei stellten Schmitt et al. fest, dass die Wirkung des Jam-A stark von der jeweiligen Zellart abhängt. Bei Abwesenheit von endothelalem Jam-A konstatierten sie eine verminderte Monozytenrekrutierung und signifikant kleinere arteriosklerotische Plaques. Weiterhin registrierten sie eine verstärkte Jam-A-Expression auf Endothelzellen bei Behandlung mit oxidiertem LDL („*low density lipoprotein*“), was die Pathogenese der Arteriosklerose weiter verstärkt. Eine Jam-A-Defizienz in Leukozyten hingegen vergrößerte die arteriosklerotischen Plaques durch eine stärkere Makrophagenbeteiligung. Daher vermuteten sie eine wichtige Rolle des leukozytären Jam-A bei der Wiederablösung und Migration monozytärer Zellen [53].

Zernecke et al. beobachteten bei Jam-A-defizienten Mäusen ebenfalls eine signifikante Reduktion der arteriosklerotischen Veränderungen durch eine geringere Makrophagenbeteiligung. Dafür machten sie auch eine Jam-A abhängige Ausschüttung des Zytokins RANTES [62], [63], [95] verantwortlich, welches einen großen Einfluss auf die Monozytenrekrutierung besitzt [52].

Ostermann et al. beschrieben eine durch lösliches Jam-A verminderte Monozytenrekrutierung auf entzündetes oder arteriosklerotisch verändertes Endothel. Dies erklärten sie durch eine Interferenz mit den heterologen Interaktionen zwischen Monozyt und Endothel. Den Einfluss des endothelialen Jam-A auf die monozytäre Rekrutierung bestätigte die Forschergruppe hingegen [54].

4.3 Der Effekt von löslichem Jam-A auf die Thrombozyteninteraktion mit Endothelzellen

Unter arteriellen Flussbedingungen wurde in einer Flusskammer die Wirkung von Jam-A D1, Jam-A D1/D2 und ADP allein, sowie in beiden Kombinationen auf einen Endothelzellrasen untersucht. Es zeigte sich, dass bereits alle Substanzen allein zu einem signifikanten Zuwachs der Thrombozyten-Adhäsion führten. Die Kombinationen jedoch steigerten dies in außerordentlichem Umfang. Dabei lag Jam-A D1 noch etwas über Jam-A D1/D2.

Der Flusskammerversuch gehört zu einem etablierten Versuchsrepertoire und ist bereits in [110], [112], [115] vorbeschrieben. Durch den kontinuierlichen Fluss mit einer arteriellen Scherrate können die Bedingungen *in vivo* gut simuliert werden, was die Aussagekraft des Versuches und die Übertragbarkeit erhöht.

Babinska et al. untersuchten dieses Thema in den Jahren 2002 [37] sowie 2014 [41]. 2002 prüften sie die Adhäsion von Thrombozyten auf aktivierten Endothelzellen in Form von menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC). Dabei konnte durch das membrangebundene Jam-A auf beiden Zellarten eine feste Verbindung nachgewiesen werden. Lösliches rekombinantes Jam-A führte in ihren Experimenten jedoch zu einer Inhibition der Adhäsion um bis zu 60 %. Sie erklärten dies durch eine Störung der homophilen Interaktionen des Jam-A zwischen Thrombozyt und Endothelzelle. Insgesamt schlossen sie aus ihren Versuchen, dass Jam-A für 40 - 60 % der Bindungsstärke zwischen Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen verantwortlich ist [37]. Für diesen Versuch ist die vorherige Aktivierung der Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IFN- γ unumgänglich. Erst diese Maßnahme führt dazu, dass es zu einer Reorganisation des Jam-A aus den „*tight-junctions*“ hin zur luminalen Seite der Endothelzelle kommt, an welche das Jam-A der Thrombozyten binden kann. Die Gesamtmenge an Jam-A bleibt bei diesem Vorgang identisch. Denn in ruhendem Zustand bilden Endothelzellen keine thrombogene Oberfläche [122]. 2014 setzten Babinska et al. den oben geschilderten Versuch erneut ein, um die Wirksamkeit ihres neu entwickelten antithrombotischen Peptids „Peptid 4D“ zu überprüfen. Dieses besteht aus einer Teilsequenz des Jam-A-Proteins, welche sich in der dreidimensionalen Form der Jam-A-Faltung als Teil des aktiven Zentrums herausstellte. Für einen möglichen klinischen Einsatz wurde das Peptid noch mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der Proteolyse durch Trypsin und Thrombin ausgestattet, da Thrombin in thrombotischen beziehungsweise arteriosklerotischen Bereichen eine erhöhte Aktivität zeigt [123]. Sie konnten eine Verringerung der Thrombozytenadhäsion von bis zu 76 % durch das „Peptid 4D“ nachweisen [41], was im Umkehrschluss für die große

Bedeutung von Jam-A an der Interaktion zwischen Thrombozyten und aktiviertem Endothel spricht.

4.4 Mögliche Bedeutung des löslichen Jam-A für die Pathophysiologie der Thrombose und Inflammation

In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen ließ sich *in vitro* der Einfluss von Jam-A auf einzelne Aspekte nachweisen, die zusammen genommen zu einer Förderung atherosklerotischer Prozesse beitragen können.

Bei *in vivo*-Versuchen anderer Forschergruppen konnte in arteriosklerotischen Plaques sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen eine Überexpression von Jam-A nachgewiesen werden [29], [35], [41], was die Relevanz der *in vitro*-Beobachtungen bestätigt.

Babinska et al. sowie Zerneck et al. weisen darauf hin, dass Jam-A eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Thrombosen und Arteriosklerose zu spielen scheint [41], [52]. Eine beeinträchtigte Jam-A-Expression in Endothelzellen reduziert mononukleäre Zellrekrutierung in die Arterienwand und begrenzt die Entstehung von Arteriosklerose [53], [54]. Dem entgegengesetzt scheint lösliches Jam-A die mononukleäre Zellrekrutierung auf entzündetes oder arteriosklerotisch verändertes Endothel zu vermindern [54].

Endotheliales membranständiges Jam-A führt zu festen Verbindungen zwischen Thrombozyten und aktivierten, beziehungsweise entzündeten Endothelzellen [35], [37], [41]. Dabei zeigte sich, dass Endothelzellen, die mit oxidiertem LDL behandelt wurden, vermehrt Jam-A auf ihrer Oberfläche präsentieren [53]. Diesem Effekt konnte mit Statinen entgegengewirkt werden [34].

Es existiert jedoch seitens Naik et al. auch die gegenteilige Behauptung, dass zelleigenes Jam-A in ruhenden Thrombozyten durch Unterdrückung der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivität als endogener Inhibitor für die Thrombozytenfunktion dienen und somit vor der Entstehung einer Thrombose oder Arteriosklerose schützen könnte. Jam-A-defiziente Mäuse zeigten einen prothrombotischen Phänotyp, waren grundsätzlich gesund und fertil, jedoch waren die Spermienbeweglichkeit, die

epitheliale Morphologie der Cornea sowie die FGF2-induzierte Angiogenese gestört [32].

4.5 Mögliche Konsequenzen für Diagnostik und Therapie

Aufgrund der oben geschilderten Erkenntnisse liegt die Ansicht nahe, dass Arzneimittel, die die Funktion von Jam-A antagonisieren, ein neues Mittel zur Prophylaxe und Behandlung von Arteriosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall sein könnten [29], [35], [37], [41], [55]. Erste *in vivo*-Versuche an Mäusen mit dem „Peptid 4D“ erwiesen sich als erfolgversprechend. Es zeigten sich starke und spezifische Bindungen zwischen dem „Peptid 4D“ und Jam-A, woraufhin die Thrombozytenaggregation sowie die Thrombozytenadhäsion auf entzündeten Endothelzellen blockiert wurde [41]. Daher werden nun Testungen am Menschen empfohlen.

In einer Studie mit männlichen Probanden mit koronarer Herzkrankheit konnte ein erhöhter Jam-A-Plasmaspiegel gemessen werden. Dabei zeigte sich die Höhe des Jam-A-Spiegels proportional zum Schweregrad der Erkrankung und könnte damit als Biomarker im klinischen Einsatz interessant werden [35]. Es wird eine kombinierte Therapie mit Jam-A-Antagonisten und Statinen vorgeschlagen, aus der sich additive oder synergistische Effekte ergeben sollten [41].

Neben der Arteriosklerose konnten auch bei einem ihrer Hauptrisikofaktoren, der Hypertonie, erhöhte Plasma-Jam-A-Spiegel festgestellt werden [47], [124], [125]. Die Hochregulation von Jam-A scheint durch den Angiotensin-1-Signalweg getriggert zu werden. Bei menschlichen Probanden führte der Einsatz von ACE-Hemmern, beziehungsweise Angiotensin-2-Blockern zu verringerten Plasma-Jam-A-Spiegeln. Möglicherweise könnte Jam-A daher als prognostischer Faktor für die Hypertonie eingesetzt werden [124], [125].

4.6 Limitationen der dargestellten Ergebnisse

Bei den verwendeten Blutproben handelte es sich immer jeweils nur um eine kleine Stichprobe von gesunden humanen Spendern, deren Blut mit extern syn-

thetisiertem löslichem Jam-A versetzt wurde, um die im jeweiligen Fokus stehenden Effekte zu untersuchen. Es handelt sich in der vorliegenden Arbeit ausschließlich um *in vitro*-Versuche. Trotz signifikanter Ergebnisse kann daher noch nicht davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse verallgemeinert werden können.

Leider war es nicht möglich, in allen Versuchen das Kontrollprotein Car D1 mitzuführen, da es nicht ständig verfügbar war. Ein gewünschter Ersatz durch ein anderes Kontrollprotein zur Erhöhung der Ergebnisqualität war nicht möglich, da bei keinem anderen verfügbaren Protein ungewollte Nebeneffekte auf die Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden konnten.

Durch die gegebene *in vitro*-Situation ist zudem zu beachten, dass einige Versuchsergebnisse stark zeitsensibel sind, wie beispielsweise die Aggregationsversuche. Die Verwendbarkeit des eingesetzten Blutes limitierte sich von allein, da mit der Zeit ein starkes Nachlassen der Aggregation zu beobachten war. Ähnliches zeigte sich auch bei den Flusskammerversuchen.

Durch die vorgegebene geringe Anzahl an durchgeführten Versuchsdurchläufen kamen interindividuelle Unterschiede bei den Blutspendern zum Teil so stark zum Tragen, dass keine Signifikanz bei der Zusammenfassung der Versuchsdurchläufe erreicht werden konnte. Und dies, obwohl in den Einzelversuchen die Effekte eindeutig zu beobachten waren, wie beispielsweise bei der Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass zur Sicherung der Relevanz von löslichem Jam-A in Therapie und Diagnostik *in vivo*-Versuche benötigt werden, um eine Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den lebenden menschlichen Organismus beweisen zu können.

4.7 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass lösliches Jam-A *in vitro* zu einer Förderung atherogener Prozesse führt. Dazu gehören sowohl primär thrombozytäre Vorgänge wie deren Aktivierung und Degranulation, die Thrombo-

zytenaggregation, die Thrombusformation sowie die Thrombozytenspreizung als auch Interaktionen mit anderen Zellen wie Endothelzellen oder Monozyten.

Die proapoptotische Wirkung des löslichen Jam-A könnte so interpretiert werden, dass damit regenerative Prozesse unterbunden werden. Im ausgeprägten Fall könnte es zu einer Thrombozytopenie kommen. Außerdem könnte es durch die Apoptose bedingten prothrombotischen Effekte zur Ausbildung großer Thromben kommen.

Daher ist zu überlegen, ob sich das Blocken des Jam-A hemmend auf das Vorschreiten der Arteriosklerose auswirken könnte. Ähnliche Vorschläge unterbreiteten Babinska et al. [29], [37], Cavusoglu et al. [35] und Sobocka et al. [55]. Das „Peptid 4D“ stellte sich im Mausmodell dafür als möglicherweise geeigneter Kandidat heraus [41].

Es ist jedoch festzuhalten, dass *in vivo* keine pauschale Aussage über die Jam-A-Wirkung zu treffen ist, da sich je nach Lokalisation auf unterschiedlichen Zellarten unterschiedliche, zum Teil sogar entgegengesetzte Effekte ergeben.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis des Einflusses des löslichen Proteins Jam-A auf die Funktion der Thrombozyten führen. Dazu wurden sowohl das natürlich vorkommende Jam-A D1/D2 als auch das künstlich geschaffene Protein mit nur einer Domäne, das Jam-A D1, untersucht. Es wurde im Vorfeld vermutet, dass sich Anhaltspunkte finden würden, die bestätigen, dass Jam-A die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose steigern würde. Damit wäre Jam-A ein möglicher Angriffspunkt zur Therapie des größten Risikofaktors kardiovaskulärer Erkrankungen, die die häufigste Todesursache in Deutschland ausmachen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mittels Aggregometrie, Durchflusszytometrie, Flusskammer, Lichtmikroskopie, Konfokalmikroskopie und Zellkultur gewonnen.

Insgesamt ließ sich feststellen, dass das künstliche Jam-A D1 einen stärkeren Effekt als das natürlich vorkommende Jam-A D1/D2 zeigte. Die Aggregometrie ergab eine signifikante Steigerung der Thrombozytenaggregation in Kombination mit dem Agonisten ADP. Allein zeigte Jam-A keinen Effekt. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der Flusskammer, wo sich in Kombination mit ADP wenige, aber sehr großflächige und voluminöse Thromben bildeten. Jam-A allein führte zu zahlreichen, winzigen, flachen Thromben. Die Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen nahm in Kombination mit ADP, aber auch in geringem Maße allein durch Jam-A, ebenfalls zu. Einen fördernden Einfluss zeigte Jam-A weiterhin auf die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung.

In Kombination mit TRAP steigerte Jam-A die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten.

Jam-A D1 verstärkte überdies die Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten.

Förderlich auf die Apoptose wirkte sich vor allem die Kombination von TRAP und Jam-A D1 aus.

Jam-A löste eine vergleichbare Thrombozytenspreizung aus wie die Positivkontrolle Collagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Einzelergebnisse dafür sprechen, dass lösliches Jam-A die Entstehung und das Voranschreiten der Arteriosklerose unterstützt. Daher könnte es sinnvoll sein, *in-vivo*-Versuche anzuschließen, die die Übertragbarkeit auf den lebenden Organismus prüfen und gegebenenfalls die Wirksamkeit eines blockierenden Antikörpers gegen Jam-A zu überprüfen.

6 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Meinrad Gawaz für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und das zur Verfügung stellen der Forschungseinrichtung.

Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee bin ich für die wirklich tolle, kompetente und engagierte Betreuung sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Thilo Stehle danke ich für die Bereitstellung von Jam-A D1, Jam-A D1/D2 und Car D1.

Der ehemaligen Bachelorstudentin Stefanie Müller danke ich für das Isolieren und Heranzüchten von Monozytenkulturen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Labors Christina Hackelsperger, Klaudia Posavec und Lydia Laptev für die Unterstützung bei labortechnischen Fragen und die Gabe von hilfreichen Tipps sowie die angenehme Atmosphäre im Labor.

Herzlich danke ich auch meinem Mann, Tobias Schwartz, für seine IT-Unterstützung sowie meiner Mutter, Gabriele Schwanz, für die grammatikalische Prüfung meiner Dissertation.

Literaturverzeichnis

1. White J.G., *Platelet Structure*, in *Platelets*, A. Michelson, Editor. 2012, Elsevier. p. 162-87.
2. Bessis M., *Living blood cells and their ultrastructure*. 1973, New York: Springer Verlag.
3. Ruggeri Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1227-34.
4. May A.E., Seizer P., and Gawaz M., *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(3): p. s5-10.
5. Gawaz M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 498-511.
6. Weiss H.J., *Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts)*. N Engl J Med, 1975. 293(11): p. 531-41.
7. Reed G.L., *Platelet Secretion*, in *Platelets*, A. Michelson, Editor. 2007, Elsevier. p. 309-14.
8. Italiano J.E., Jr. and Hartwig J.H., *Megakaryocyte Development and Platelet Formation* in *Platelet*, A. Michelson, Editor. 2012, Elsevier. p. 27-45.
9. Josefsson E.C., Dowling M.R., Lebois M., and Kile B.T., *The Regulation of Platelet Life Span*, in *Platelets*, A. Michelson, Editor. 2012, Elsevier. p. 96-106.
10. Behnke O., *The morphology of blood platelet membrane systems*. Ser Haematol, 1970. 3(4): p. 3-16.
11. Pötzsch B., Gawaz M.P., and Madlener K., *Hämostaseologie*. 2. ed. 2010: Springer-Verlag. 15-86.
12. Behrends J.C., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S., Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., and Wischmeyer E., *Duale Reihe Physiologie*. 2010: Thieme.
13. Horn F., *Biochemie des Menschen*. 4 ed. 2009: Thieme.
14. Cramer E.M., Breton-Gorius J., Beesley J.E., and Martin J.F., *Ultrastructural demonstration of tubular inclusions coinciding with von Willebrand factor in pig megakaryocytes*. Blood, 1988. 71(6): p. 1533-8.
15. Dopheide S.M., Maxwell M.J., and Jackson S.P., *Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor*. Blood, 2002. 99(1): p. 159-67.
16. Ruggeri Z.M., Orje J.N., Habermann R., Federici A.B., and Reininger A.J., *Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress*. Blood, 2006. 108(6): p. 1903-10.
17. Massberg S., Gawaz M., Gruner S., Schulte V., Konrad I., Zohlnhofer D., Heinzmann U., and Nieswandt B., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. J Exp Med, 2003. 197(1): p. 41-9.
18. van Gils J.M., Zwaginga J.J., and Hordijk P.L., *Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their*

- relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*, 2009. 85(2): p. 195-204.
19. Shattil S.J. and Newman P.J., *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. *Blood*, 2004. 104(6): p. 1606-15.
 20. Flaumenhaft R., Dilks J.R., Rozenvayn N., Monahan-Earley R.A., Feng D., and Dvorak A.M., *The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion*. *Blood*, 2005. 105(10): p. 3879-87.
 21. Ross R., Glomset J., and Harker L., *Response to injury and atherogenesis*. *Am J Pathol*, 1977. 86(3): p. 675-84.
 22. Ross R. and Glomset J.A., *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. 295(7): p. 369-77.
 23. Ross R. and Glomset J.A., *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. 295(8): p. 420-5.
 24. Bob A. B.K., *Duale Reihe Innere Medizin*. 3. ed. 2013: Thieme.
 25. Libby P., *The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis*. *J Intern Med*, 2008. 263(5): p. 517-27.
 26. Libby P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 868-74.
 27. Steffens S. and Mach F., *Inflammation and atherosclerosis*. *Herz*, 2004. 29(8): p. 741-8.
 28. Sobocka M.B., Sobocki T., Banerjee P., Weiss C., Rushbrook J.I., Norin A.J., Hartwig J., Salifu M.O., Markell M.S., Babinska A., Ehrlich Y.H., and Kornecki E., *Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation*. *Blood*, 2000. 95(8): p. 2600-9.
 29. Babinska A., Azari B.M., Salifu M.O., Liu R., Jiang X.C., Sobocka M.B., Boo D., Al Khoury G., Deitch J.S., Marmur J.D., Ehrlich Y.H., and Kornecki E., *The F11 receptor (F11R/JAM-A) in atherothrombosis: overexpression of F11R in atherosclerotic plaques*. *Thromb Haemost*, 2007. 97(2): p. 272-81.
 30. Sobocki T., Sobocka M.B., Babinska A., Ehrlich Y.H., Banerjee P., and Kornecki E., *Genomic structure, organization and promoter analysis of the human F11R/F11 receptor/junctional adhesion molecule-1/JAM-A*. *Gene*, 2006. 366(1): p. 128-44.
 31. Gupta S.K., Pillarisetti K., and Ohlstein E.H., *Platelet agonist F11 receptor is a member of the immunoglobulin superfamily and identical with junctional adhesion molecule (JAM): regulation of expression in human endothelial cells and macrophages*. *IUBMB Life*, 2000. 50(1): p. 51-6.
 32. Naik M.U., Stalker T.J., Brass L.F., and Naik U.P., *JAM-A protects from thrombosis by suppressing integrin alphabeta3-dependent outside-in signaling in platelets*. *Blood*, 2012. 119(14): p. 3352-60.
 33. Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., and Dejana E., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. *J Cell Biol*, 1998. 142(1): p. 117-27.

34. Schmitt M.M., Fraemohs L., Hackeng T.M., Weber C., and Koenen R.R., *Atherogenic mononuclear cell recruitment is facilitated by oxidized lipoprotein-induced endothelial junctional adhesion molecule-A redistribution*. *Atherosclerosis*, 2014. 234(2): p. 254-264.
35. Cavusoglu E., Kornecki E., Sobocka M.B., Babinska A., Ehrlich Y.H., Chopra V., Yanamadala S., Ruwende C., Salifu M.O., Clark L.T., Eng C., Pinsky D.J., and Marmur J.D., *Association of plasma levels of F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) with human atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 50(18): p. 1768-76.
36. Bazzoni G., *The JAM family of junctional adhesion molecules*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(5): p. 525-30.
37. Babinska A., Kedees M.H., Athar H., Ahmed T., Batuman O., Ehrlich Y.H., Hussain M.M., and Kornecki E., *F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis*. *Thromb Haemost*, 2002. 88(5): p. 843-50.
38. Naik U.P., Ehrlich Y.H., and Kornecki E., *Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the Fc gamma RII receptor*. *Biochem J*, 1995. 310 (Pt 1): p. 155-62.
39. Kornecki E., Walkowiak B., Naik U.P., and Ehrlich Y.H., *Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody*. *J Biol Chem*, 1990. 265(17): p. 10042-8.
40. Wang F., Naik U.P., Ehrlich Y.H., Osada S., Ohno S., and Kornecki E., *Stimulatory antibody-induced activation and selective translocation of protein kinase C isoenzymes in human platelets*. *Biochem J*, 1995. 311 (Pt 2): p. 401-6.
41. Babinska A., Clement C.C., Swiatkowska M., Szymanski J., Shon A., Ehrlich Y.H., Kornecki E., and Salifu M.O., *Development of new antiatherosclerotic and antithrombotic drugs utilizing F11 receptor (F11R/JAM-A) peptides*. *Biopolymers*, 2014. 101(4): p. 322-34.
42. Stellos K., Langer H., Gnerlich S., Panagiota V., Paul A., Schonberger T., Ninci E., Menzel D., Mueller I., Bigalke B., Geisler T., Bultmann A., Lindemann S., and Gawaz M., *Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(6): p. 1127-36.
43. Bazzoni G., Martinez-Estrada O.M., Mueller F., Nelboeck P., Schmid G., Bartfai T., Dejana E., and Brockhaus M., *Homophilic interaction of junctional adhesion molecule*. *J Biol Chem*, 2000. 275(40): p. 30970-6.
44. Weber C., Fraemohs L., and Dejana E., *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(6): p. 467-77.
45. Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M., and Miyajima A., *Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2008. 111(3): p. 1167-72.

46. Severson E.A., Jiang L., Ivanov A.I., Mandell K.J., Nusrat A., and Parkos C.A., *Cis-dimerization mediates function of junctional adhesion molecule A*. Mol Biol Cell, 2008. 19(5): p. 1862-72.
47. Waki H., Liu B., Miyake M., Katahira K., Murphy D., Kasparov S., and Paton J.F., *Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem*. Hypertension, 2007. 49(6): p. 1321-7.
48. Liang T.W., DeMarco R.A., Mrsny R.J., Gurney A., Gray A., Hooley J., Aaron H.L., Huang A., Klassen T., Tumas D.B., and Fong S., *Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. 279(6): p. C1733-43.
49. Rehder D., Iden S., Nasdala I., Wegener J., Brickwedde M.K., Vestweber D., and Ebnet K., *Junctional adhesion molecule-a participates in the formation of apico-basal polarity through different domains*. Exp Cell Res, 2006. 312(17): p. 3389-403.
50. Naik U.P. and Eckfeld K., *Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1)*. J Biol Regul Homeost Agents, 2003. 17(4): p. 341-7.
51. Mandell K.J., McCall I.C., and Parkos C.A., *Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function*. J Biol Chem, 2004. 279(16): p. 16254-62.
52. Zernecke A., Liehn E.A., Fraemohs L., von Hundelshausen P., Koenen R.R., Corada M., Dejana E., and Weber C., *Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(2): p. e10-3.
53. Schmitt M.M., Megens R.T., Zernecke A., Bidzhekov K., van den Akker N.M., Rademakers T., van Zandvoort M.A., Hackeng T.M., Koenen R.R., and Weber C., *Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis*. Circulation, 2014. 129(1): p. 66-76.
54. Ostermann G., Fraemohs L., Baltus T., Schober A., Lietz M., Zernecke A., Liehn E.A., and Weber C., *Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(4): p. 729-35.
55. Sobocka M.B., Sobocki T., Babinska A., Hartwig J.H., Li M., Ehrlich Y.H., and Kornecki E., *Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa*. J Recept Signal Transduct Res, 2004. 24(1-2): p. 85-105.
56. Guo Y.L., Bai R., Chen C.X., Liu D.Q., Liu Y., Zhang C.Y., and Zen K., *Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(1): p. 75-83.
57. Cooke V.G., Naik M.U., and Naik U.P., *Fibroblast growth factor-2 failed to induce angiogenesis in junctional adhesion molecule-A-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(9): p. 2005-11.

58. Statistisches Bundesamt. *Todesursachen nach Krankheitsarten 2015*. 31.01.17]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
59. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Valeri C.R., and Furman M.I., *Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2001. 104(13): p. 1533-7.
60. Stenberg P.E., McEver R.P., Shuman M.A., Jacques Y.V., and Bainton D.F., *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation*. *J Cell Biol*, 1985. 101(3): p. 880-6.
61. Massaguer A., Engel P., Tovar V., March S., Rigol M., Solanes N., Bosch J., and Pizcueta P., *Characterization of platelet and soluble-porcine P-selectin (CD62P)*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 96(3-4): p. 169-81.
62. von Hundelshausen P., Weber K.S., Huo Y., Proudfoot A.E., Nelson P.J., Ley K., and Weber C., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. *Circulation*, 2001. 103(13): p. 1772-7.
63. Schober A., Manka D., von Hundelshausen P., Huo Y., Hanrath P., Sarembock I.J., Ley K., and Weber C., *Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury*. *Circulation*, 2002. 106(12): p. 1523-9.
64. Hou M., Yu J., Zhang L., and Liu C., *[Changes and significance of P-selectin and PAC-1 in coronary heart disease before and after stenting]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2014. 94(10): p. 766-8.
65. Leon C., Alex M., Klocke A., Morgenstern E., Moosbauer C., Eckly A., Spannagl M., Gachet C., and Engelmann B., *Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation*. *Blood*, 2004. 103(2): p. 594-600.
66. Gachet C., *Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors*. *Int J Hematol*, 2001. 74(4): p. 375-81.
67. Hartwig J.H., *The Platelet Cytoskeleton*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2007, Elsevier. p. 75-90.
68. Nachmias V.T., *Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading*. *J Cell Biol*, 1980. 86(3): p. 795-802.
69. Hartwig J.H. and DeSisto M., *The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments*. *J Cell Biol*, 1991. 112(3): p. 407-25.
70. Fox J.E., Boyles J.K., Berndt M.C., Steffen P.K., and Anderson L.K., *Identification of a membrane skeleton in platelets*. *J Cell Biol*, 1988. 106(5): p. 1525-38.
71. Kenney D.M. and Linck R.W., *The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band*. *J Cell Sci*, 1985. 78: p. 1-22.

72. Gibbons I.R., *The role of dynein in microtubule-based motility*. Cell Struct Funct, 1996. 21(5): p. 331-42.
73. Schroer T.A., Steuer E.R., and Sheetz M.P., *Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles*. Cell, 1989. 56(6): p. 937-46.
74. Fox J.E., Reynolds C.C., Morrow J.S., and Phillips D.R., *Spectrin is associated with membrane-bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the Ca²⁺-dependent protease during platelet activation*. Blood, 1987. 69(2): p. 537-45.
75. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., and Wallach D., *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. Cell, 1996. 85(6): p. 803-15.
76. Josefsson E.C., Dowling M.R., Lebois M., and Kile B.T., *The Regulation of Platelet Life Span*.
77. Kluck R.M., Bossy-Wetzell E., Green D.R., and Newmeyer D.D., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. 275(5303): p. 1132-6.
78. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., and Wang X., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. 91(4): p. 479-89.
79. Mason K.D., Carpinelli M.R., Fletcher J.I., Collinge J.E., Hilton A.A., Ellis S., Kelly P.N., Ekert P.G., Metcalf D., Roberts A.W., Huang D.C., and Kile B.T., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. 128(6): p. 1173-86.
80. Li J., Xia Y., Bertino A.M., Coburn J.P., and Kuter D.J., *The mechanism of apoptosis in human platelets during storage*. Transfusion, 2000. 40(11): p. 1320-9.
81. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., and van Oers M.H., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. 84(5): p. 1415-20.
82. Zhang G., Gurtu V., Kain S.R., and Yan G., *Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V*. Biotechniques, 1997. 23(3): p. 525-31.
83. Dale G.L., *Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response*. J Thromb Haemost, 2005. 3(10): p. 2185-92.
84. Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., and Alberio L., *Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface*. Nature, 2002. 415(6868): p. 175-9.
85. Murphy E.A. and Francis M.E., *The estimation of blood platelet survival. I. General principles of the study of cell survival*. Thromb Diath Haemorrh, 1969. 22(2): p. 281-95.
86. Murphy E.A. and Francis M.E., *The estimation of blood platelet survival. II. The multiple hit model*. Thromb Diath Haemorrh, 1971. 25(1): p. 53-80.
87. Murphy E.A., *The estimation of blood platelet survival. 3. The robustness of the basic models*. Thromb Diath Haemorrh, 1971. 26(3): p. 431-48.

88. Reutelingsperger C.P. and van Heerde W.L., *Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 1997. 53(6): p. 527-32.
89. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., and Reutelingsperger C., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 39-51.
90. Jayaraman S., *Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580)*. J Immunol Methods, 2005. 306(1-2): p. 68-79.
91. Andersen H., Greenberg D.L., Fujikawa K., Xu W., Chung D.W., and Davie E.W., *Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(20): p. 11189-93.
92. Coughlin S.R., *Protease-activated receptors and platelet function*. Thromb Haemost, 1999. 82(2): p. 353-6.
93. Coughlin S.R., *Protease-activated receptors in vascular biology*. Thromb Haemost, 2001. 86(1): p. 298-307.
94. Vassallo R.R., Jr., Kieber-Emmons T., Cichowski K., and Brass L.F., *Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides*. J Biol Chem, 1992. 267(9): p. 6081-5.
95. Huo Y., Schober A., Forlow S.B., Smith D.F., Hyman M.C., Jung S., Littman D.R., Weber C., and Ley K., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. 9(1): p. 61-7.
96. Hansson G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. 352(16): p. 1685-95.
97. Weber C., Schober A., and Zernecke A., *Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(11): p. 1997-2008.
98. da Costa Martins P.A., van Gils J.M., Mol A., Hordijk P.L., and Zwaginga J.J., *Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins*. J Leukoc Biol, 2006. 79(3): p. 499-507.
99. Moore K.L., Stults N.L., Diaz S., Smith D.F., Cummings R.D., Varki A., and McEver R.P., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. J Cell Biol, 1992. 118(2): p. 445-56.
100. Walcheck B., Moore K.L., McEver R.P., and Kishimoto T.K., *Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro*. J Clin Invest, 1996. 98(5): p. 1081-7.
101. Alderson M.R., Armitage R.J., Tough T.W., Strockbine L., Fanslow W.C., and Spriggs M.K., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. J Exp Med, 1993. 178(2): p. 669-74.

102. Neumann F.J., Marx N., Gawaz M., Brand K., Ott I., Rokitta C., Sticherling C., Meinel C., May A., and Schomig A., *Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets*. *Circulation*, 1997. 95(10): p. 2387-94.
103. Goyert S.M., Ferrero E., Rettig W.J., Yenamandra A.K., Obata F., and Le Beau M.M., *The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors*. *Science*, 1988. 239(4839): p. 497-500.
104. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., and Mathison J.C., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. *Science*, 1990. 249(4975): p. 1431-3.
105. Borst O., Schaub M., Walker B., Schmid E., Munzer P., Voelkl J., Alesutan I., Rodriguez J.M., Vogel S., Schonberger T., Metzger K., Rath D., Umbach A., Kuhl D., Muller, II, Seizer P., Geisler T., Gawaz M., and Lang F., *Pivotal role of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in vascular inflammation and atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. 35(3): p. 547-57.
106. Chatterjee M., Seizer P., Borst O., Schonberger T., Mack A., Geisler T., Langer H.F., May A.E., Vogel S., Lang F., and Gawaz M., *SDF-1alpha induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival*. *FASEB J*, 2014. 28(7): p. 2864-78.
107. Chatterjee M., von Ungern-Sternberg S.N., Seizer P., Schlegel F., Buttcher M., Sindhu N.A., Muller S., Mack A., and Gawaz M., *Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7*. *Cell Death Dis*, 2015. 6: p. e1989.
108. Chatterjee M., Borst O., Walker B., Fotinos A., Vogel S., Seizer P., Mack A., Alampour-Rajabi S., Rath D., Geisler T., Lang F., Langer H.F., Bernhagen J., and Gawaz M., *Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling*. *Circ Res*, 2014. 115(11): p. 939-49.
109. Chatterjee M., Huang Z., Zhang W., Jiang L., Hultenby K., Zhu L., Hu H., Nilsson G.P., and Li N., *Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli*. *Blood*, 2011. 117(14): p. 3907-11.
110. Elvers M., Herrmann A., Seizer P., Munzer P., Beck S., Schonberger T., Borst O., Martin-Romero F.J., Lang F., May A.E., and Gawaz M., *Intracellular cyclophilin A is an important Ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation*. *Blood*, 2012. 120(6): p. 1317-26.
111. Borst O., Munzer P., Gatidis S., Schmidt E.M., Schonberger T., Schmid E., Towhid S.T., Stellos K., Seizer P., May A.E., Lang F., and Gawaz M., *The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositide 3-kinase/Akt signaling*. *Circ Res*, 2012. 111(10): p. 1297-307.

112. Borst O., *Neue molekulare Mechanismen zellulärer Interaktionen an der Gefäßwand und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose*. 2010, Tübingen.
113. Elvers M., Pozgaj R., Pleines I., May F., Kuijpers M.J., Heemskerk J.M., Yu P., and Nieswandt B., *Platelet hyperreactivity and a prothrombotic phenotype in mice with a gain-of-function mutation in phospholipase Cgamma2*. *J Thromb Haemost*, 2010. 8(6): p. 1353-63.
114. Pleines I., Elvers M., Strehl A., Pozgajova M., Varga-Szabo D., May F., Chrostek-Grashoff A., Brakebusch C., and Nieswandt B., *Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets*. *Pflugers Arch*, 2009. 457(5): p. 1173-85.
115. Langer H., May A.E., Daub K., Heinzmann U., Lang P., Schumm M., Vestweber D., Massberg S., Schonberger T., Pfisterer I., Hatzopoulos A.K., and Gawaz M., *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. *Circ Res*, 2006. 98(2): p. e2-10.
116. Muller K.A., Karathanos A., Tavlaki E., Stimpfle F., Meissner M., Bigalke B., Stellos K., Schwab M., Schaeffeler E., Muller, II, Gawaz M., and Geisler T., *Combination of high on-treatment platelet aggregation and low deaggregation better predicts long-term cardiovascular events in PCI patients under dual antiplatelet therapy*. *Platelets*, 2013.
117. Gawaz M., Muller I., and Besta F., *Combined antithrombotic therapy for acute coronary syndrome*. *Semin Vasc Med*, 2003. 3(2): p. 163-76.
118. Michetti N., Weyrich A., and Zimmerman G., *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and thrombosis*. *US Hematology*, 2009.
119. Lippi G., Montagnana M., Salvagno G.L., Cicorella N., Degan M., Minuz P., Lechi C., and Guidi G.C., *Risk stratification of patients with acute myocardial infarction by quantification of circulating monocyte-platelet aggregates*. *Int J Cardiol*, 2007. 115(1): p. 101-2.
120. Furman M.I., Barnard M.R., Krueger L.A., Fox M.L., Shilale E.A., Lessard D.M., Marchese P., Frelinger A.L., 3rd, Goldberg R.J., and Michelson A.D., *Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 38(4): p. 1002-6.
121. Din J.N., Harding S.A., Valerio C.J., Sarma J., Lyall K., Riemersma R.A., Newby D.E., and Flapan A.D., *Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man*. *Atherosclerosis*, 2008. 197(1): p. 290-6.
122. Ozaki H., Ishii K., Horiuchi H., Arai H., Kawamoto T., Okawa K., Iwamatsu A., and Kita T., *Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells*. *J Immunol*, 1999. 163(2): p. 553-7.
123. Lee I.O., Kratz M.T., Schirmer S.H., Baumhake M., and Bohm M., *The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. 343(2): p. 253-7.
124. Ong K.L., Leung R.Y., Babinska A., Salifu M.O., Ehrlich Y.H., Kornecki E., Wong L.Y., Tso A.W., Cherny S.S., Sham P.C., Lam T.H., Lam K.S., and Cheung B.M., *Elevated plasma level of soluble F11*

- receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) in hypertension.* Am J Hypertens, 2009. 22(5): p. 500-5.
125. Xu H., Oliveira-Sales E.B., McBride F., Liu B., Hewinson J., Toward M., Hendy E.B., Graham D., Dominiczak A.F., Giannotta M., Waki H., Ascione R., Paton J.F., and Kasparov S., *Upregulation of junctional adhesion molecule-A is a putative prognostic marker of hypertension.* Cardiovasc Res, 2012. 96(3): p. 552-60.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mechanismen der Thrombozytenaktivierung im Bereich einer Endothelläsion.	4
Abbildung 2:	Struktur einer abgewandelten Jam-A-Form mit nur einer Domäne (Jam-A D1)	8
Abbildung 3:	Struktur des natürlich vorkommenden Moleküls Jam-A D1/D2 mit zwei Domänen	8
Abbildung 4:	Schematische Übersicht über die Wirkung von CD62P (P-Selektin)	11
Abbildung 5:	Schematische Übersicht zum Einsatzgebiet von PAC-1	12
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten	18
Abbildung 7:	Illustrierung des Quadranten UR (upper right) in der Durchflusszytometrie mit doppelt-positiven Zellen.	18
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung des Flusskammerversuchs zur Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	32
Abbildung 9:	Flusskammer: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Thrombozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen unter arteriellen Flussbedingungen (eigene Darstellung)	43
Abbildung 10:	Thrombozytäre Degranulation	51
Abbildung 11:	Thrombozytäre Aktivierung	52
Abbildung 12:	Thrombozytenaggregation in Prozent bei der Hinzugabe von ADP 10 μ M und dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und Car D1 10 μ g/ml	53
Abbildung 13:	Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von ADP 10 μ M und dessen Kombinationen mit Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und Car D1 10 μ g/ml	54
Abbildung 14:	Thrombozytenaggregation in Prozent bei der Hinzugabe von Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und Car D1 10 μ g/ml.	55
Abbildung 15:	Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von Jam-A D1 10 μ g/ml, Jam-A D1/D2 30 μ g/ml und Car D1 10 μ g/ml allein ohne Hinzugabe eines Thrombozytenaktivators.	55
Abbildung 16:	Konzentrationsstudie der Thrombozytenaggregation in Prozent von Jam-A D1 mit 10, 5, 2, 1 und 0,5 μ g/ml	56
Abbildung 17:	Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei der Hinzugabe von Jam-A D1 mit 10, 5, 2 und 1 μ g/ml	57
Abbildung 18:	Konzentrationsstudie der Thrombozytenaggregation in Prozent von Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0,5 μ g/ml.	58

Abbildung 19:	Beispiel für den Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregation bei Jam-A D1/D2 mit 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg/ml.	58
Abbildung 20:	Fläche in Quadratmikrometer der sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben.	60
Abbildung 21:	Anzahl der sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben.	61
Abbildung 22:	Repräsentative Beispielfotos für die sich in der Flusskammer unter arteriellen Flussbedingungen bildenden Thromben.	62
Abbildung 23:	Repräsentative Beispielbilder für die Thrombozytenspreizung auf Collagen 10 µg/ml als Positivkontrolle, Jam-A D1 10 µg/ml sowie Jam-A D1/D2 30 µg/ml.	64
Abbildung 24:	Durchflusszytometrische Erfassung des Annexin V nach einer Stunde Inkubationszeit.	65
Abbildung 25:	Beispiele für Originalkurven der FACS-Analyse mit Annexin V nach einer Stunde Inkubationszeit.	66
Abbildung 26:	Durchflusszytometrische Erfassung des TMRE nach einer Stunde Inkubationszeit.	67
Abbildung 27:	Beispiele für Originalkurven der FACS-Analyse mit TMRE nach einer Stunde Inkubationszeit.	68
Abbildung 28:	Anzahl der unter arteriellen Flussbedingungen auf ECV-Zellen adhärenen Thrombozyten.	69
Abbildung 29:	Repräsentative Beispielbilder zur Interaktion zwischen Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen in 200-facher Vergrößerung.	70
Abbildung 30:	Auswirkung von Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 allein auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten.	71
Abbildung 31:	Auswirkung von Jam-A D1 und Jam-A D1/D2 in Kombination mit dem Thrombozytenaktivator TRAP 25 µM auf die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten.	72
Abbildung 32:	Repräsentative Punktwolkendiagramme zur Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten in der Durchflusszytometrie.	74
Abbildung 33:	Monozyten-Makrophagen-Differenzierung: Anzahl der Makrophagen in der Zellkultur pro Bild.	75
Abbildung 34:	Monozyten-Makrophagen-Differenzierung: Repräsentative Beispielbilder in 200-facher Vergrößerung.	76

Abkürzungsverzeichnis

ACD-Puffer	Zitronensäure-Citrat-Dextrose-Puffer
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
AUC	„Area under the curve“
Bak	proapoptotisches Protein
Bax	Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53, proapoptotisch
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“, Proteinfamilie, welche auf die Apoptose einwirkt, antiapoptotisch
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Car	Coxsackie- und Adenovirusrezeptor
CD	„Cluster of Differentiation“
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP	„Collagen Related Peptide“
ECV-Zellen	Endothelzellen
EGTA	Ethylenglykoltetrasäure
ESAM	endothelselektives Adhäsionsmolekül
Fab-Fragment	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	Durchflusszytometrie, („fluorescence-activated cell sorting“)
FCCP	Carbonylzyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FGF2	„Fibroblast Growth Factor“, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GP	Glykoprotein
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
HUVEC	„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“
IFN γ	Interferon gamma

Jam-A	„ <i>Junctional Adhesion Molecule A</i> “
LDL	„ <i>Low Density Lipoprotein</i> “
MFI	„ <i>Mean Fluorescence Intensity</i> “
NaOH	Natriumhydroxid
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor, Thrombinrezeptor
PE	Phycoerythrin
PFA	Formaldehyd
PIPES	Piperazin-N, N'-bis (2-Ethansulfonsäure)
PPP	thrombozytenarmes Plasma („ <i>platelet poor plasma</i> “)
PRP	thrombozytenreiches Plasma („ <i>platelet rich plasma</i> “)
PSGL-1	P-Selektin-Glykoproteinligand-1
RANTES	„ <i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> “, Synonym: CCL5
SCF	Stammzellfaktor
SCS	„ <i>surface connected system</i> “
SEM	„ <i>Standard Error of the Mean</i> “ / Standardfehler des Mittelwertes
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	„ <i>Thrombin Receptor-Activating Peptide</i> “
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UR	Quadrant „ <i>upper right</i> “ / oben rechts bei der Durchflusszytometrie, Ort der doppelt-positiven Zellen
vWF	von-Willebrand-Faktor

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Meinrad Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee, Teilprojektleiterin DGK TP-1 KFO-274, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Klinische Forschergruppe.

Die Versuche Thrombozytenaktivierung und -degranulation, Thrombozytenaggregation, Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen, Apoptosenachweis durch Annexin V und TMRE, Interaktion zwischen Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen, die Thrombozyten-Monozyten-Aggregate sowie alle Vorarbeiten wie die Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma, die Herstellung gewaschener Plättchen oder die Monozytenisolation wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. M. Chatterjee von mir eigenständig durchgeführt.

Bei der Thrombozytenspreizung erhielt ich Unterstützung bei der Aufnahme der Bilder mit dem Konfokalmikroskop durch Dr. rer. nat. M. Chatterjee. Ebenfalls unterstützte sie mich mit der Erstellung der Originalgrafiken des Apoptosenachweises und der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate mittels FACS. Die Versuche zur Monozyten-Makrophagen-Differenzierung entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. M. Chatterjee, die meinen eigenen Versuchsdurchläufen weitere hinzufügte. Stefanie Müller isolierte einen Teil der von mir benötigten Monozyten und betreute auch teilweise die daraus entstehenden Monozytenkulturen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Einweisung von Dr. rer. nat. M. Chatterjee in das gewünschte Statistikprogramm Prism.

Ich versichere, das Manuskript selbständig mit etwas Layout-Unterstützung durch meinen Mann, Tobias Schwartz, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Jessica Schwartz, Magstadt den 22.05.2017