

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie

**Der funktionelle Effekt und die Signifikanz der homophilen
Interaktion zwischen dem löslichen Junctional Adhesion
Molecule A und dem F11 Rezeptor auf der
Thrombozytenoberfläche**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Rapp, Vera Christin

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp

Tag der Disputation: 13.11.2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | IX |
| Abkürzungsverzeichnis | X |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Thrombozyten | 1 |
| 1.1.1 Die Physiologie und Funktion von Thrombozyten..... | 2 |
| 1.1.2 Die Thrombozyten – Monozyten Interaktion beeinflusst die inflammatorische Funktion von Thrombozyten | 8 |
| 1.1.3 Thrombozyten beeinflussen die Monozyten-Differenzierung in Makrophagen und Schaumzellen | 15 |
| 1.2 Das Junctional Adhesion Molecule – A (JAM-A/JAM1/F11R)..... | 19 |
| 1.2.1 Sequenz, Struktur und zelluläre Herkunft von JAM-A/JAM1/F11R..... | 19 |
| 1.2.2 Funktionelle Eigenschaften von JAM-A/JAM1/F11R | 20 |
| 1.2.3 Der pathophysiologische Stellenwert von sJAM-A | 26 |
| 1.3 Fragestellung und Zielsetzung..... | 32 |
| 2. Material und Methoden..... | 34 |
| 2.1 Material | 34 |
| 2.2 Klinische Studie: Methoden und Patientenkollektiv | 41 |
| 2.3 Experimentelle Studie: Methoden | 44 |
| 2.3.1 Herstellung von PRP und Thrombozyten Isolation..... | 44 |
| 2.3.2 Monozyten Isolation | 46 |
| 2.3.3 Durchflusszytometrie..... | 47 |
| 2.3.4 Durchflusszytometrie: JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Thrombozytenoberfläche..... | 48 |
| 2.3.5 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie: Aktiviertes Endothelium als Quelle für JAM-A/JAM1/F11R | 49 |
| 2.3.6 Flusskammer zur Untersuchung der Thrombozyten Adhäsion auf aktivierten Endothelzellen | 51 |
| 2.3.7 Konfokalmikroskopie: Thrombozyten Adhäsion und Spreading auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche | 53 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.8 | GloMax: Thrombozyten Adhäsion auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche..... | 55 |
| 2.3.9 | Durchflusszytometrie: Thrombozyten Aktivierung und Degranulierung | 57 |
| 2.3.10 | Multielektroden-Impedanzaggregometrie (Multiplate®): Thrombozyten Aggregation..... | 58 |
| 2.3.11 | Flusskammer: ex vivo Thrombusformation | 59 |
| 2.3.12 | Durchflusszytometrie: Thrombozyten Funktionalität und ihre prokoagulatorische Wirkung | 61 |
| 2.3.13 | Durchflusszytometrie: Thrombozyten – Monozyten - Aggregatbildung | 62 |
| 2.3.14 | Durchflusszytometrie: Thrombozyten Phagozytose durch Monozyten | 63 |
| 2.3.15 | Thrombozyten-Monozyten – Cokultur: Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen | 64 |
| 2.3.16 | Statistische Auswertung | 66 |
| 3. | Ergebnisse..... | 68 |
| 3.1 | Die JAM-A/JAM1/F11R Expression ist unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert und kann zum sJAM-A Serumlevel beitragen..... | 70 |
| 3.2 | sJAM-A übt durch die homophile Interaktion mit JAM-A/JAM1/F11R einen prothrombotischen Effekt aus..... | 79 |
| 3.2.1 | sJAM-A unterstützt die Thrombozytenadhäsion..... | 79 |
| 3.2.2 | sJAM-A verstärkt die agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung und Degranulation..... | 85 |
| 3.2.3 | sJAM-A verstärkt die agonistenabhängige Thrombozytenaggregation..... | 88 |
| 3.2.4 | sJAM-A unterstützt die Thrombusformation | 91 |
| 3.2.5 | sJAM-A forciert die prokoagulatorische Aktivität von Thrombozyten und beeinflusst dadurch ihre Funktionalität..... | 94 |
| 3.3 | sJAM-A ermöglicht proinflammatorische Assoziationen zwischen Thrombozyten und Monozyten | 98 |
| 3.3.1 | sJAM-A unterstützt die Monozyten-Thrombozyten Aggregatbildung | 98 |
| 3.3.2 | sJAM-A verstärkt die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten | 100 |
| 3.3.3 | Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen wird durch sJAM-A gefördert..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| 4. Diskussion | 109 |
| 4.1 sJAM-A als Biomarker und sein pathologischer Stellenwert | 112 |
| 4.2 sJAM-A wirkt prothrombotisch | 114 |
| 4.3 sJAM-A wirkt proinflammatorisch | 120 |
| 4.4 Die membrandistale D1 Domäne von sJAM-A ist für den prothrombotischen und proinflammatorischen Effekt verantwortlich | 123 |
| 4.5 Therapeutische Möglichkeiten und Konsequenzen..... | 124 |
| 4.6 Schlussfolgerung und Forschungsausblick | 126 |
| 5. Zusammenfassung | 128 |
| 6. Literaturverzeichnis | 131 |
| 7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift | 152 |
| 8. Veröffentlichungen | 153 |
| 9. Danksagung | 154 |
| 10. Lebenslauf | 155 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombozytenfunktion bei der Hämostase | 8 |
| Abbildung 2: Die drei Säulen der Thrombozyten-Monozyten Interaktion | 14 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R Moleküls | 19 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der JAM-A/JAM1/F11R Interaktionen..... | 24 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des JAM-A/JAM1/F11R mit potentieller Spaltstelle..... | 27 |
| Abbildung 6: Mikrotiterplatte Konfokalmikroskopie Thrombozyten Adhäsion..... | 54 |
| Abbildung 7: Mikrotiterplatte Photometer Thrombozyten Adhäsion..... | 56 |
| Abbildung 8: Mikrotiterplatte Monozytendifferenzierung..... | 65 |
| Abbildung 9: Das JAM-A/JAM1/F11R Molekül mit 2 IgG-ähnlichen Domänen. | 68 |
| Abbildung 10: Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Endothelzelloberfläche..... | 71 |
| Abbildung 11: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur JAM-A/JAM1/F11R Expression auf aktivierten Thrombozyten (n=7) | 72 |
| Abbildung 12: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur CD62P Expression auf aktivierten Thrombozyten (n=7) | 73 |
| Abbildung 13: Boxplot Diagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche von Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit SAP..... | 74 |
| Abbildung 14: Serumkonzentration [pg/ml] von sJAM-A bei Patienten mit AKS oder stabiler AP | 77 |
| Abbildung 15: Korrelation von membranständigem JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche und löslichem sJAM-A im Serum. | 78 |
| Abbildung 16: Balkendiagramm zur photometrisch gemessenen Adhäsion von fluoreszenzmarkierten Blutplättchen (n=7) | 80 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 17: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen und konfokalmikroskopische Bilder zur Beurteilung der Thrombozytenadhäsion auf einer mit JAM-A D1, JAM-A D1D2 oder Kollagen-beschichteten Oberfläche (n=3) | 81 |
| Abbildung 18: Repräsentative Phasenkontrastbilder des Flusskammer-Versuchs zur Thrombozyten Adhäsion auf mit TNF α und INF γ aktiviertem Endothelium (n=5)..... | 83 |
| Abbildung 19: Balkendiagramm zur Thrombozytenadhäsion auf einer inflammatorisch veränderten Endothelmonoschicht (n=5)..... | 84 |
| Abbildung 20: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten der CD62P Oberflächenexpression zur Darstellung der Degranulation (n=5)..... | 87 |
| Abbildung 21: Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Datenerfassung der PAC-1 Bindung zur Veranschaulichung der Thrombozytenaktivierung (n=5)..... | 88 |
| Abbildung 22: Repräsentative Kurven der Impedanz-Aggregometriedaten der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation (n=5)..... | 90 |
| Abbildung 23: Analyse der erfassten Daten der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation per Impedanzaggregometrie (n=5) | 90 |
| Abbildung 24: Repräsentative Phasenkontrastbilder der Thrombusformation nach Vollblutperfusion durch die Flusskammer (n=3)..... | 93 |
| Abbildung 25: Balkendiagramm zum Flusskammer Versuch zur Erörterung der Thrombusformation gemessen an der Thrombenfläche (n=3)..... | 94 |
| Abbildung 26: links Balkendiagramm und rechts Histogramm Overlay aus durchflusszytometrisch erfassten Daten zur prokoagulatorischen Thromozytenfunktion anhand PS Externalisation (n=6) | 96 |
| Abbildung 27: links Balkendiagramm und rechts Histogramm Overlay aus durchflusszytometrisch erfassten Daten zur prokoagulatorischen Thromozytenfunktion anhand des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials (n=6) | 97 |
| Abbildung 28: Balkendiagramm der FACS-Daten zur Monozyten- Thrombozyten Aggregatformation (n=4)..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 29: Balkendiagramm der FACS Analyse zur Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten (n=5)..... | 102 |
| Abbildung 30: Repräsentatives Hellfeld-Phasenkontrastbild der Monozytendifferenzierung in einer angelegten Monozyten- Thrombozyten-Cokultur nach 10 Tagen Inkubation..... | 103 |
| Abbildung 31: Repräsentative Hellfeld-Phasenkontrastbilder der Monozytendifferenzierung in Makrophagen | 104 |
| Abbildung 32: Balkendiagramm aus Daten der ausgezählten Makrophagenanzahl nach Analyse der Monozytendifferenzierung in Makrophagen (n=10)..... | 105 |
| Abbildung 33: Repräsentative Bilder zur Monozytendifferenzierung in Schaumzellen nach Anlage einer Monozyten-Thrombozyten Cokultur in Oilred-Färbung (n=5) | 106 |
| Abbildung 34: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Monozyten- differenzierung durch Auszählung der Schaumzellen (n=5)..... | 107 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Funktionelle Eigenschaften von JAM-A/JAM1/F11R | 25 |
| Tabelle 2: Zirkulierendes sJAM-A als Biomarker für Pathologien | 31 |
| Tabelle 3: Baseline Charakteristika zur Klinischen Studie | 43 |
| Tabelle 4: JAM-A/JAM1/F11R Expression, Pipettierschema in μ l | 49 |
| Tabelle 5: Experimentelle Sets der Thrombozytenadhäsion auf aktivierten Endothelzellen | 52 |
| Tabelle 6: Thrombozyten Aktivierung und Degranulation, Pipettierschema 50 μ l System | 58 |
| Tabelle 7: Thrombozyten Aggregation, Pipettierschema | 59 |
| Tabelle 8: Thrombusformation, Pipettierschema..... | 60 |
| Tabelle 9: Thrombozyten Apoptose, Pipettierschema 50 μ l System | 62 |
| Tabelle 10: FACS Thrombozyten – Monozyten Aggregatbildung, Pipettierschema 50 μ l System..... | 63 |
| Tabelle 11: Thrombozyten Phagozytose durch Monozyten, Pipettierschema 50 μ l System | 64 |
| Tabelle 12: Baseline Charakteristika des Patientenkollektivs | 75 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| 5-(6-)-CFDA | 5-(6-)- Carboxyfluorescein-Diacetat (Fluoreszenzmarker) |
| ACD-Puffer | Zitronensäure-Citrat-Dextrose-Puffer |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| AKS | Akutes Koronarsyndrom |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| Art. Hypertonie | Arterielle Hypertonie |
| AUC | Area under the curve |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CAD | Coronary artery disease / Koronare Herzkrankheit |
| CCR-1 / CCR-5 | Chemokin Rezeptor Typ -1 / Chemokin Rezeptor Typ -5 |
| CD40L | CD40-Ligand |
| CPDA | Citrat Phosphat Dextrose Adenin |
| CRP | Collagen Related Peptide |
| cTn | Cardial Troponin |
| CXCL12 | SCF-1 |
| CXCL4 | PF4 |
| Diast. / syst. | Diastolisch / systolisch |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometrie |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| GP | Glykoprotein |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |

| | |
|--------------|---|
| HD | Hämodialyse |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure |
| HMGB1 | High mobility group box 1 |
| HMVECs | Human Microvascular Endothelial Cells |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cells |
| IAP | Instabile Angina Pectoris |
| ICAM-1 / -2 | Intercellular adhesion molecule-1 / -2 |
| IFN γ | Interferon gamma |
| JAM-A | Junctional Adhesion Molecule A |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LFA-1 | Leukozyten Funktionsantigen-1 |
| M | Molar |
| MAC-1 | Makrophagen Antigen-1 |
| MCP-1 | Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 |
| M-CSF | Macrophage-colony-stimulating-factor |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| MIF | Makrophagenmigrations inhibierender Faktor |
| min | Minuten |
| ml | Mililiter |
| MTA | Medizintechnische Assistentin |
| n | Anzahl Experimente |
| NaOH | Natronlauge / Natriumhydroxid |
| NSTEMI | Non-ST-elevated myokardial infarction / Nicht-ST-Hebungsinfarkt |
| OxLDL | Oxidiertes Low Density Lipoprotein |
| PAR-1 | protease-aktivierter Rezeptor, Thrombinrezeptor |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell |
| PBS | Phosphate buffered saline/ Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| Pen. Strep. | Penicillin Streptomycin |

| | |
|--------------|--|
| PF4 | Plättchenfaktor 4 = CXCL4 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIPES | Piperazin-N, N'-bis (2-Ethansulfonsäure) |
| PRP | Thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma) |
| PS | Phosphatidylserin |
| PSGL-1 | P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 |
| RAGE | receptor for advanced glycation end products |
| RANTES | Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted = CCL-5(Chemokin) |
| Ref. | Referenz |
| rpm | Revolutions per minute/Umdrehungen pro min |
| RT | Raumtemperatur |
| SAP | Stabile Angina Pectoris |
| SDF-1 | stromal cell-derived factor-1 = CXCL12 |
| SEM | Standard error of the mean / Standardfehler des Mittelwerts |
| sJAM-A | Soluble Junctional Adhesion Molecule A |
| SSc | Systemische Sklerose |
| STEMI | ST-elevated myokardial infarction / ST-Hebungsinfarkt |
| TLR4 | Toll-like Rezeptor 4 |
| TMRE | Tetramethylrhodaminethylester |
| TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TRAP | Thrombin receptor activating peptide |
| TXA2 | Thromboxan A2 |
| VCAM1 | vascular cell adhesion molecule |
| vWF | von- Willebrand- Faktor |
| vWR | von- Willebrand- Rezeptor |
| WBC | White blood cells |

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind wie Erythrozyten und Leukozyten Zellen des blutbildenden Systems und zählen demzufolge zu den zellulären Blutbestandteilen. Sie werden zudem auch als Blutplättchen bezeichnet. Im zirkulierenden Blut befinden sich die Thrombozyten, die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutplasmas, in einem inaktiven Zustand, haben eine charakteristische diskoide, bikonvexe Form und einen Durchmesser von 1-4 μm bei einer Dicke von 0,2 – 2 μm . Nach Aktivierung verändern Thrombozyten ihre Form indem sie Zellausläufer, beispielsweise Pseudopodien und Filopodien, ausbilden [1].

Die Entstehung der Thrombozyten, die Thrombopoese, gestaltet sich im Knochenmark durch Abschnürungen von Zytoplasmafragmenten von Megakaryozyten, den größten Knochenmarkszellen [2]. Thrombozyten gehören daher wie Erythrozyten zu den kernlosen Zellen.

Die Zellmembran weist multiple integrierte Proteine auf, die als Rezeptoren für eine Vielzahl von Adhäsionsproteinen und Stimulantien fungieren. Im Cytoplasma der Thrombozyten existieren drei verschiedene Formen von speziellen membranbegrenzten Organellen, die Granula: Lysosomen, α -Granula und die spezifischen thrombozytären dichte oder δ -Granula. Sie sind Speicherorgane für verschiedene Substanzen wie gerinnungsfördernde Mediatormoleküle, Thrombozytenaktivatoren und Wachstumsfaktoren. Nach ihrer Freisetzung wirken sie entweder parakrin auf weitere Thrombozyten, autokrin auf die eigene sezernierende Zelle oder auf umgebene Gefäßzellen. Die Inhaltsstoffe der δ -Granula sind unter anderem Serotonin, Thromboxan A₂, ADP und Calcium. Sie führen zur Aktivierung weiterer Thrombozyten und zur Gefäßkonstriktion [3]. Das Calcium stellt einen unverzichtbaren Cofaktor der Blutgerinnungskaskade dar. ADP wirkt über Bindung der ADP-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche auto- sowie parakrin.

Die größten und zahlreichsten α -Granula enthalten eine Vielzahl an Substanzen wie Adhäsionsproteine (z.B. Fibrinogen, Fibronectin, den vWF), Membranproteine

(z.B. P-Selektin), weitere Koagulationssfaktoren (z.B. Faktor V), Chemokine (z.B. CXCL4, CXCL12), Gremlin-1, Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) aber auch fibrinolytische Faktoren (z.B. Plasminogen) und sind somit hauptsächlich für die Adhäsion und anschließende Aggregation der Thrombozyten verantwortlich [3].

Die lysosomalen Granula stellen die kleinste Gruppe der Granula dar, beinhalten hydrolytische Enzyme wie Elastase, Kollagenasen oder saure Hydrolasen und haben keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion [3].

Die Thrombozyten Degranulation, die Freisetzung der Granulainhalte, wird durch Endotheldefekte und freiliegendes Gewebskollagen ausgelöst und spielen bei der Thrombozytenadhäsion, Aktivierung, Aggregation, Koagulation, Chemotaxis, Proliferation sowie bei der Inflammation eine maßgebliche Rolle [4].

Nach einer Lebensdauer von ca. 7 bis 12 Tagen werden die Thrombozyten im retikuloendothelialen System der Leber und Milz durch Phagozytose abgebaut.

Ein gesunder Erwachsener besitzt physiologisch 150.000 bis 300.000 Thrombozyten pro μl Blut, da die Bildung und der Abbau der Thrombozyten einem physiologischen Gleichgewicht unterliegen.

Ihre Hauptaufgabe im menschlichen Körper besteht in der Blutstillung, der Hämostase, nach Gewebsverletzungen [1, 5, 6].

Daneben beteiligen sie sich bei inflammatorischen Prozessen und interagieren mit Endothelien und Leukozyten.

Pathophysiologisch spielen sie unter anderem durch Bildung rasch okkludierender Thromben nach entsprechender Stimulation im Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen wie Thrombose und Atherosklerose mit ihren Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall, sowie bei Zuständen der akuten oder chronischen Entzündung, eine wichtige Rolle [7–10].

1.1.1 Die Physiologie und Funktion von Thrombozyten

Wird ein Blutgefäß, das mit Endothel ausgekleidet ist, verletzt, kommt es durch die Eröffnung zum Blutaustritt und innerhalb kurzer Zeit mit Hilfe von Thrombozyten und Fibrinbildung zur Blutstillung und Blutgerinnung, was die Gefäßwandintegrität aufrecht erhält und den Blutverlust auf ein Minimum reduziert. Dieser Vorgang wird

auch Hämostase genannt und in zelluläre und plasmatische Blutgerinnung eingeteilt. Die zelluläre Hämostase wird zum größten Teil von Thrombozyten bewältigt und daher auch als thrombozytäre Blutstillung bezeichnet. Diese bilden einen Thrombus, der zur Abdichtung des Gefäßdefektes führt und die Endothelverletzung verschließt. Weiterhin kann die Hämostase in Phasen unterteilt werden; die primäre Hämostase gefolgt von der sekundären Hämostase und der Fibrinolyse [11].

Die primäre Hämostase beginnt mit der Adhäsion, der Aktivierung und dem Ausbreiten, auch Spreading genannt, der Thrombozyten und endet mit der Thrombozytenaggregation, wodurch sich ein instabiler, primär hämostatischer Thrombus bildet.

Unter physiologischen Bedingungen verhindern antithrombotische Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin I₂ (PGI₂) das Anheften von Blutplättchen an die Gefäßwand. Durch die Gefäßwandverletzung mit Endothelschaden werden subendotheliale Strukturen, Bindegewebsproteine der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Thrombospondin, Laminin, Fibronectin, der an das Kollagen gebundene von-Willebrand-Faktor (vWF) aus dem Blut oder direkt Kollagen freigelegt, die, von den auf der Zellmembran befindlichen Glykoproteinrezeptoren (GP) zirkulierender Thrombozyten, erkannt werden und das Anheften ermöglichen [12, 13]. Nicht nur subendotheliale Strukturen tragen zum Anheften der Thrombozyten bei sondern auch Substanzen, die durch inflammatorische Aktivierung und Stimulation von Endothelzellen auf ihrer Oberfläche exprimiert werden ermöglichen die Thrombozytenbindung. Zu diesen als Rezeptor wirkenden Thrombozytenglykoproteinen und zur Integrin-Proteinfamilie gehörenden Membrankomplexen zählen unter anderem der Kollagenrezeptor GP Ia/IIa, der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa, der neben Fibrinogen auch vWF binden kann, der P-Selektin Rezeptor GPIb, das GP P-Selektin selbst (CD62P), das über PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) auf dem Endothel gebunden wird sowie thrombozytäres PSGL-1, das auch P-Selektin auf dem Endothel bindet und der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor GPIb-IX-V-Rezeptorkomplex, der die Thrombozyten über den im Endothel oder in den Thrombozytengranula gespeicherten vWF mit freigelegtem Kollagen verknüpft [7, 12, 14].

Dieser primäre Kontakt zwischen den Thrombozyten und dem geschädigten oder inflammatorisch aktiviertem Endothel wird als Thrombozytenadhäsion bezeichnet und kommt durch die teils spezifische oder unspezifische Bindung der großen Vielzahl an GP Rezeptoren und beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin, P-Selektin oder den von-Willebrand-Faktor zu Stande [3, 15].

Die Thrombozytenadhäsion führt zu morphologischen und funktionalen Veränderungen wie der Aktivierung und folgend zur Formveränderung der Thrombozyten, auch als Spreading oder „shape change“ bezeichnet. Die diskoiden Thrombozyten formen sich zu kugeligen, sphärischen Körpern und bilden lange Fortsätze, die Pseudopodien, aus. Damit vergrößern sie ihre Oberfläche deutlich und können somit das verletzte Areal bedecken [16].

Zusätzlich wird nach Thrombozytenaktivierung vermehrt das GP P-Selektin (CD62P) in die Zytoplasmamembran integriert, das hauptsächlich als Adhäsionsmolekül an Leukozyten, Endothelien oder weiteren Thrombozyten dient [17, 18]. Folglich kann die Expressionsrate von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche als Marker für die thrombozytäre Aktivierung angesehen werden.

Auf die Thrombozytenaktivierung folgt die Thrombozytendegranulation durch den Vorgang der Exozytose. Die Thrombozytendegranulation beschreibt die Sekretion der Granulainhalte, biologisch hochaktive Substanzen, wie adhäsive, vasoaktive, chemotaktische, zytokinähnliche Substanzen, ADP, Thromboxan A₂, Serotonin, Vasopressin oder plättchenaktivierendem Faktor (PAF), welche als Liganden der aktivierenden Rezeptoren wiederum zur autokrinen sowie parakrinen Aktivierung und Degranulation weiterer noch ruhender Thrombozyten und zur Thrombozytenrekrutierung führen (positive Rückkopplung) [1, 3, 13, 19]. Somit wirken Thrombozyten prothrombotisch sowie proinflammatorisch. Beendet wird die Sekretion der Mediatorstoffe durch die spezifische Expression von Oberflächenproteinen an der thrombozytären Plasmamembran. Zu einer Hemmung der Aktivierung führen inhibierende Rezeptoren wie ein Adenosin-, ein Prostazyklin- und ein β -adrenerger-Rezeptor.

Zusätzlich zur autokrinen Aktivierung gibt es auch weitere Thrombozytenaktivatoren, auch Thrombozytenagonisten genannt, wie zum Beispiel

Kollagen (GPVI, GP IaIIa / Integrin $\alpha 2\beta 1$), Thrombin (PAR1, GPIb α), Vasopressin (V1R) oder Fibrin (GPVI, GPIIbIIIa / Integrin α IIb β 3).

Zur Bildung eines Thrombus, Blutgerinnsels, das zur vollständigen und effektiven Abdichtung der Gefäßendothelverletzung nötig ist, legen die aktivierten, wandadhärenten Thrombozyten über eine Stimulation des GP IIB/IIIa und damit Konformationsänderung des α IIb β 3 Integrins die Bindungsstellen für Adhäsivproteine wie Fibrinogen oder Thrombospondin frei, um sich über irreversible Bindung des plasmatischen Fibrinogens aus dem Plasma zu einem dichten zellulären Netzwerk miteinander zu verknüpfen (Koadhäsion) [20–22]. Diese beschriebene Konformationsänderung des α IIb β 3 Integrins wird als inside- out Signal bezeichnet, da sie die verstärkte Fibrinogenbindung an der Plasmamembran hervorruft. Auf die Fibrinogenbindung folgt die Degranulation und Formveränderung des Thrombozyten, was folglich als outside- in Signal tituliert wird [23]. Die Thrombozyten sind nun durch Fibrinogen-Brücken miteinander verbunden, was letztendlich in der Thrombozytenaggregation und folgend in der Formation eines dreidimensionalen Netzwerks, eines instabilen primären, weißen Thrombus endet [12, 13]. Der Mechanismus der Thrombozytenadhäsion, -spreading, -aktivierung, -degranulation und -aggregation ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Die Thrombusstabilisierung erfolgt in der sekundären, plasmatischen Hämostase durch Aktivierung bestimmter Plasmaproteine, den sogenannten Gerinnungsfaktoren, der komplexen enzymatischen plasmatischen Gerinnungskaskade.

Die aktivierten Thrombozyten externalisieren des Weiteren PS auf ihre Zelloberfläche, worüber Gerinnungsfaktoren, der Prothrombinasekomplex, an Thrombozyten binden können. Somit stellen Thrombozyten ihre Membran den Gerinnungsenzymen als notwendige gemeinsame Reaktionsoberfläche zur Verfügung, da sie frei gelöst im Blutplasma ohne räumliche Nähe zueinander nicht reaktionsfähig sind [24]. Thrombozyten sind zudem eine wichtige Quelle für diese Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor V, XI und XIII) und für weitere regulatorische Komponenten der Blutgerinnung wie Polyphosphate und Prothrombin [24]. Bei der plasmatischen Hämostase kommt es somit durch eine gestaffelte Abfolge von Aktivierungsschritten am Ende der Kaskade zur Thrombinaktivierung, das die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin veranlasst. Fibrin lagert sich an Thrombozyten an und vermittelt dadurch die

Quervernetzung und Stabilisierung des primären Thrombus. Es entsteht ein fester roter Fibrin-Thrombus mit Einlagerung von weiteren Zellen wie Erythrozyten und Leukozyten, der den Endothelschaden stabil deckt [1].

Im letzten Schritt folgt die Fibrinolyse, bei der es teilweise zum Thrombusabbau oder sogar zur Auflösung des Thrombus kommt, um die Wundheilung voranzutreiben [1, 11].

Durch die Thrombozytenaktivierung kommt es neben der PS Externalisation auch zum Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials; beides Vorgänge die auch beim Prozess der Apoptose eine Rolle spielen und als Apoptoseindikatoren fungieren [25, 26]. Wie bereits oben beschrieben, steigern diese transienten Veränderungen nach Thrombozytenaktivierung zudem das prokoagulatorische Potential der Thrombozyten durch Beteiligung an der Gerinnungskaskade [27]. PS kann zum einen das prokoagulatorische und thrombotische Potential von Thrombozyten fördern indem es die Thrombinbildung begünstigt und damit das Wachstum eines Thrombus und die Blutgerinnung unterstützt und zum anderen auch die Apoptose von Thrombozyten beeinflussen. Thrombozyten Agonisten wie Thrombin, TRAP oder CRP induzieren nicht nur die Aktivierung sondern auch die Apoptose von Thrombozyten [26, 28].

Auch die Lebensdauer und das Voranschreiten des Alters der Blutplättchen bestimmen ihre funktionelle Kapazität und verändern die funktionellen Eigenschaften der Thrombozyten – die aggregatorische Funktion wird reduziert und die prokoagulatorische Funktion gefördert [29]. Prokoagulatorische Thrombozyten sind Zellen in der Phase des Zelluntergangs, der Apoptose, mit zunehmender Funktion [29]. Die Externalisierung von PS geschieht während der Aktivierung und während der Apoptose von Thrombozyten und führt zu prokoagulatorisch wirkenden Thrombozyten. In prokoagulatorischen Thrombozyten kommt es somit zum Überlappen der Prozesse der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenapoptose.

Die Apoptose bezeichnet den kontrollierten programmierten „Selbstmord/Suizid“ der Zelle und dient durch Eliminierung veränderter oder nicht mehr zu gebrauchender Zellen der physiologischen Entwicklung und Funktion des Organismus [30]. So wird die Zellzahl in Geweben kontrolliert, die Immunantwort reguliert und entartete oder potentiell schädliche Zellen beseitigt [31, 32]. Die Apoptose wird zur Nekrose abgegrenzt, dem Zelltod durch Schädigung der Zelle. Durch den Membrandefekt und

die Zellruptur mit folgendem Austritt des zytoplasmatischen Zellinhalts in das umgebende Gewebe entsteht dabei eine Entzündungsreaktion [33, 34]. Mögliche inflammatorische Reaktionen und Antworten können damit durch die Apoptose vermieden werden. Die Apoptose, ein genetisch festgelegtes Todesprogramm, ist daher ein extrem wichtiger Vorgang und verläuft in jeder Zelle als aktiver, intrazellulär gesteuerter, energieverbrauchender und geordneter Prozess ab, der oftmals von außen durch Molekülbindung an Todesrezeptoren initiiert wird. Auch Thrombozyten sind zur Apoptose fähig [26]. Ihre kurze Lebensdauer im Blutkreislauf von 5 - 12 Tagen wird durch apoptotische Vorgänge begrenzt. Zellorganellen der Thrombozyten, wie Mitochondrien, sind in den Regulationsmechanismus involviert. Eine Alteration der Permeabilität der Mitochondrienmembran führt zur Störung des Membranpotentials und damit zur Freisetzung des proapoptotisch wirkende Cytochrom C aus dem Intermembranraum ins Cytosol [35, 36]. Im letzten Schritt des programmierten Zelltodes steht die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) [37]. Auch adhärenzte Thrombozyten können zu einer aktivierungsinduzierten Apoptose führen und externalisieren Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche [28]. PS stellt einen festen Bestandteil jeder biologischen Membran dar und existiert im unstimulierten Zustand asymmetrisch verteilt an der Innenseite der Phospholipidmembran und wird am Ende des apoptotischen Prozesses auf der Außenseite der Membran externalisiert. PS wird auch als "eat me"-Signal bezeichnet, da es als Signalprotein für Phagozyten dient und ein Auslöser für die phagozytäre Aufnahme von Thrombozyten durch interagierende Monozyten und Makrophagen ist [28]. Dadurch kann einer Freisetzung zytoplasmatischen Inhalts mit nachfolgend ausgelöster Entzündungsreaktion vorgebeugt werden [31, 38–40].

Die Rolle der Thrombozyten kann somit nicht nur auf die primäre Hämostase mit Thrombozytenaggregation und folgender Formation eines instabilen Thrombus beschränkt werden. Thrombozyten sind auch bei der sekundären Hämostase maßgeblich beteiligt, indem sie prokoagulatorisch wirken und die Blutgerinnung und Endotheldefektdeckung bis hin zur Stabilisierung des Thrombus fördern [24].

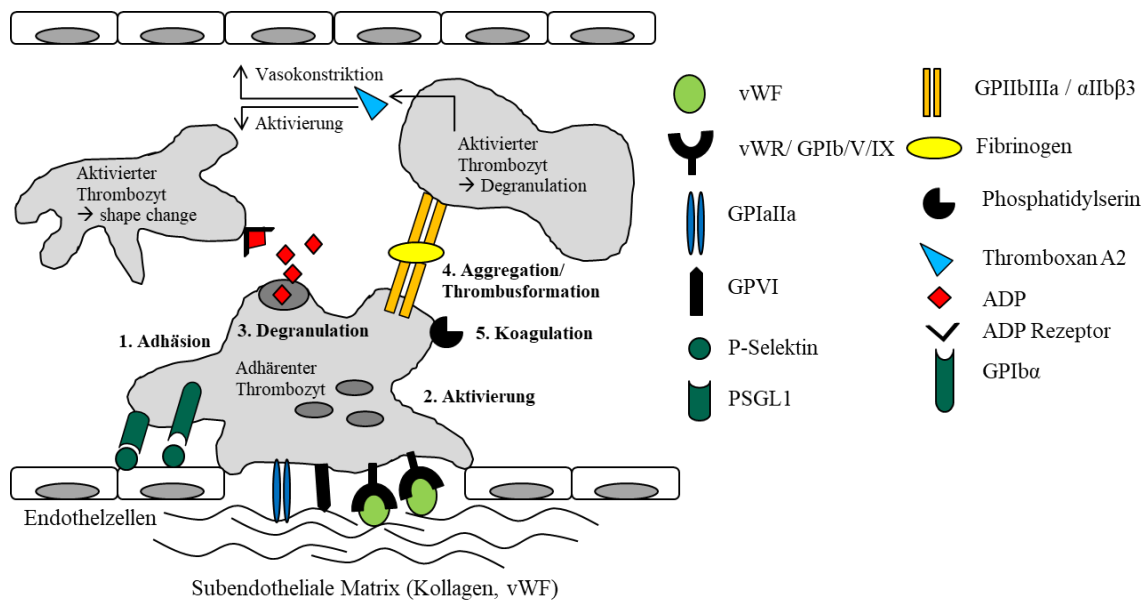


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombozytenfunktion bei der Hämostase. Der Mechanismus der Thrombozytenadhäsion, -spreading, -aktivierung, -degranulation und -aggregation [1, 7, 12–14, 16, 19–23, 27]

1.1.2 Die Thrombozyten – Monozyten Interaktion beeinflusst die inflammatorische Funktion von Thrombozyten

Monozyten gehören, wie Granulozyten und Lymphozyten, der Population der Leukozyten, den weißen Blutkörperchen, an und bilden davon ca. 2-8 % aus. Bei einem Durchmesser von etwa 12-20 μm bilden sie die größten Zellen im Blutkreislauf. Sie sind für wenige Stunden bis zu 3 Tage zelluläre Bestandteile des menschlichen Bluts, sind zur aktiven Migration fähig und differenzieren sich somit bei Verlassen des zirkulierenden Blutes in gewebsabhängig differenzierte Makrophagen aus, mit Ausbildung phagozytotischer, antigenprozessierender und präsentierender Eigenschaften [41, 42]. Monozyten sind eine der wichtigsten Effektorzellen des komplexen humanen Immunsystems und werden wie Lymphozyten zur zellulären, aber eben unspezifischen angeborenen Immunabwehr gezählt. Somit beeinflussen periphere Monozyten, wie auch ausdifferenzierte gewebsabhängige Makrophagen, die durch Zunahme des Zytoplasmas größer als Monozyten erscheinen, immunmodulatorische sowie inflammatorische Prozesse, die eine hohe Relevanz bei zahlreichen vaskulären Erkrankungen sowie auch bei der Atherogenese zeigen [39, 43–45]. Sowohl bei der Entstehung von Plaques im Frühstadium einer atherosklerotischen Läsion [46] wie auch

bei der Progression sind Monozyten in allen Phasen der Atherogenese präsent [8, 10, 47–50].

Die komplexe Interaktion und Kommunikation zwischen Monozyten und Thrombozyten geschieht durch direkte physikalische Interaktionen oder durch autokrine und parakrine Aktivierungsprozesse und führt zur gegenseitigen inflammatorischen Stimulation sowie zum Anliegen der Zellen an die Gefäßwand; begünstigende Faktoren für die Initiierung und den Progress der Atherosklerose. Zum einen interagieren die Zellen direkt miteinander, indem sie sich durch Ligand-Rezeptor Verbindungen miteinander verknüpfen. Zum anderen sezernieren sie Mediatoren, Zytokine, die inflammatorisch auf die Zellen wirken, die Zellen anlocken, rekrutieren und ihr Arrest und ihre endotheliale Adhäsion fördern [51].

Für die direkte Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten spielen drei monozytäre Adhäsionsrezeptoren für Thrombozyten eine Hauptrolle: der PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1), der MAC-1 (Makrophagen Antigen-1, Integrin $\alpha_M\beta_2$) und der LFA-1 (Leukozyten Funktionsantigen-1) Rezeptor [51–54]. Des Weiteren konnte EMMPRIN (Extrazellulär Matrixmetalloproteinase Inducer, CD147, basigin) als verbindender Glykoproteinrezeptor der Immunglobulin Superfamilie auf der Oberfläche von Thrombozyten und Monozyten identifiziert werden, der bei inflammatorischen Geschehen vermehrt exprimiert wird [55, 56]. Über Phosphatidylserinrezeptoren auf Monozyten entsteht zudem eine Monozyten-Thrombozyten Verbindung über das externalisierte Phosphatidylserin nach Thrombozytenaktivierung [1, 18, 57].

Thrombozyten externalisieren P-Selektin, stammend aus ihren α -Granula, auf die Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung oder Adhäsion an Endothelzelldefekte. Monozyten können anschließend durch die Expression des PSGL-1 auf ihrer Plasmamembran die Thrombozyten über P-Selektin / PSGL-1 Rezeptor-Ligand Interaktion binden [58, 59]. Huo et al. konnte zudem zeigen, dass durch Injektion aktivierter Thrombozyten von Wildtyp, aber nicht P-Selektin-defizienten, Mäusen die Anhaftung von Monozyten an atherosklerotische Läsionen und die Größe dieser bei ApoE defizienten Mäusen gesteigert war [60]. In einem weiteren in vitro Assay wurde, basierend auf der P-Selektin Expression aktivierter Thrombozyten, eine gesteigerte Monozytenadhäsion an Endothelzellen dargestellt [61].

Des Weiteren können Monozyten über ihren MAC-1 Rezeptor auch an bereits adhärenzte Thrombozyten binden, die eine Vielzahl an Rezeptoren besitzen, die MAC-1 binden können. Die Expression von ICAM-2 (Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-2) auf inaktiven Thrombozyten sowie JAM-C (Junctional Adhesion Molecule-C), ein transmembranes GP bestehend aus 2 Immunglobulindomänen und das GP Ib, zugehörig zum GP Ib-IX-V Komplex oder der CD40 Ligand (CD40L), der zur TNF Familie zählt, ermöglichen die Bindung an MAC-1 [62–65].

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Brückenmoleküle wie Fibrinogen (bindet an GP IIb/IIIa) oder Kininogen (bindet an GPIb) existieren, die Thrombozyten indirekt mit Monozyten über den MAC-1 Adhäsionsrezeptor verbinden können [18, 66, 67]. Des Weiteren ermöglicht der monozytäre CD36-Rezeptor über Thrombospondin als weiteres Brückenmolekül eine Bindung an Thrombozyten [68].

Der letzte zu erwähnende Monozyten Adhäsionsrezeptor, der zur Bindung der Thrombozyten über den ICAM-2 Rezeptor befähigt, ist der LFA-1 Rezeptor, ein β 2-Integrin der Immunoglobulin Superfamilie [62, 69, 70].

Die Anheftung von stimulierten Thrombozyten an Monozyten führt schließlich zur thrombozytären Sekretion von Zytokinen z.B. Interleukinen (IL-1, IL-6, IL- 8) oder $\text{TNF}\alpha$, welche Hauptbestandteile einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion darstellen und auch bei der Inflammation post-Myokardinfarkt auftreten [71]. Die thrombozytäre Interaktion mit PSGL-1 and MAC-1 führt über outside-in-signaling zur monozytären Sekretion von Zytokinen wie IL-1 β und $\text{TNF-}\alpha$ und „tissue factor“ [72–74].

Neben der direkten Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten über die oben beschriebenen Rezeptor-Ligand/Rezeptor-Rezeptor Verbindungen existieren auch mehrere parakrine Aktivierungsprozesse. Die Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und weiteren Mediatoren durch aktivierte Thrombozyten und zum Teil ihre Deponierung auf Endothel und Monozyten führen zur Monozytenrekrutierung sowie Endothelaktivierung. Zu diesen proinflammatorisch wirkenden Substanzen zählen IL-1 β , PF4, RANTES, CD40L, SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, CXCL12), CXCL14 (auch BRAK, BMAC, Mip-2 γ genannt), HMGB1 (high-mobility group box 1) und Gremlin-1 [75–78]. Newman et al. konnten zudem nachweisen, dass Thrombozyten

nach ihrer Degranulation proinflammatorische Mediatoren auf ihrer Zelloberfläche präsentieren [79].

Das Chemokin RANTES (CCL-5) wird von aktivierten Thrombozyten sezerniert und bewirkt P-Selektin-abhängig den Arrest von Monozyten an inflammatorisch oder atherosklerotisch verändertem Endothel [80, 81]. RANTES bindet an P-Selektin und wird damit auf dem mikrovaskulären oder aortalen Endothel deponiert bevor Monozyten über ihre RANTES Rezeptoren (CCR1 und CCR5) das immobilisierte RANTES binden können, dadurch aktiviert werden und an das Endothel adhären [80, 81]. Ferner konnte dargestellt werden, dass adhärenzte Blutplättchen an Monozyten RANTES und PF-4 auf ihrer Oberfläche zeigen. RANTES wurde zudem auf den Monozyten-Membranbereichen der adhärenzten Thrombozyten verteilt. RANTES und PF4 wurde auf Monozyten ohne Bindung an Thrombozyten jedoch nicht gefunden.

Der CD40L bindet an den CD40 Rezeptor auf der Zelloberfläche der Monozyten und aktiviert diese dadurch. Ferner wurde eine Korrelation zwischen dem zirkulierenden CD40L und einer gesteigerten inflammatorischen Antwort und vermehrt auftretender Restenose nach Koronarangioplastie nachgewiesen [82].

CXCL12 wird in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert und nach Aktivierung sezerniert [83, 84]. Es reguliert die Zellmigration, -adhäsion und das Überleben über Bindung seiner Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf der Zellmembranoberfläche von Monozyten und Makrophagen [85–87]. Die Chemotaxis von Monozyten wird vor allem über den CXCR4, und die Monozytenadhäsion über CXCR7 vermittelt. Während der Chemotaxis induziert CXCL12 eine CXCR4 Internalisierung und CXCR7 Externalisierung [28]. Chatterjee et al. konnten zudem bei einem Mausmodell mit Peritonitis eine gesteigerte Thrombozytenaggregation und Monozyten-Thrombozyten-Aggregatbildung mit gesteigerter CXCL12, CXCR4 und CXCR7 Expression auf den Monozyten nachweisen [28].

Das Chemokin CXCL14, verwandt in seiner Struktur mit dem CXCL12, wird auch von Thrombozyten exprimiert und freigesetzt. Nach Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer gesteigerten Oberflächenexpression und Freisetzung. CXCL14 induziert die Chemotaxis von Monozyten und unterstützt ihre Migration, die durch Blockierung des CXCR4 reduziert werden konnte, was auf die Beteiligung von CXCR4 bei der auf CXCL14-basierenden Chemotaxis von Monozyten hinweist [88].

Auch HMGB1 (high-mobility group box 1), das von Thrombozyten sezerniert wird und den monozytären Rezeptor namens RAGE (receptor for advanced glycation end products) binden kann, fördert neben der Monozytenrekrutierung die Monozytenmigration und verhindert über Bindung des toll-like receptor 4 (TLR4) ihre Apoptose [89].

Des Weiteren sezernieren Thrombozyten nach ihrer Aktivierung Gremlin-1, das mit P-Selektin colokalisiert existiert und auf Thrombozyten, Entzündungszellen und Endothelzellen exprimiert wird. Gremlin-1 fungiert durch Bindung an den antithrombotisch und antiapoptotisch wirkenden MIF (macrophage migration inhibitory factor) als funktioneller Antagonist und fördert damit die Monozytenadhäsion an Thrombozyten, die Monozytenmigration, das Monozytenüberleben und die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten-Cokultur [78].

Eine gesteigerte Interaktion von durch Thrombin aktivierte Thrombozyten mit Monozyten verdeutlichte die erhöhte Bindungsaktivität durch Aktivierung [90]. Eine Inhibierung der Thrombozytenaktivierung mit GPIIb/IIIa Antagonisten führte zu einer reduzierten Coaggregatbildung [51].

Auf diese geschilderten Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Monozyten folgt eine Thrombozyten-Monozyten-Aggregatformation, was wiederum beide Zellformen zur gegenseitigen oder endothelialen Adhäsion über Adhäsionsrezeptoren bewegt [91, 92], ein beschriebener Vorgang der Atherosklerose (Abbildung 2 links). Eine erhöhte Anzahl dieser Coaggregate zwischen Monozyten und aktivierten Thrombozyten wurde zudem bei Patienten mit Sepsis, stabiler AP und AKS nachgewiesen [91, 93–97], wobei es zu einer signifikanten Steigerung der Monozyten-Thrombozyten-Aggregatformation bei Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit stabiler AP kam [95]. Dies deutet darauf hin, dass Thrombozyten und ihre Coaggregate die Inflammation während eines kardialen Events triggern und die Entstehung von Thrombose fördern [98, 99]. Bei KHK-Patienten wurde zudem ein erhöhtes Vorkommen von apoptotischen Monozyten-Thrombozyten-Coagregaten im Vergleich zu ungebundenen Monozyten verzeichnet, wodurch die Messung der Apoptose dieser Coaggregate in Zukunft als potentieller prognostischer Marker herangezogen werden kann [95].

Auch aktivierte Thrombozyten sind im zirkulierenden Blut von Patienten mit instabiler Atherosklerose [100, 101], stabiler Koronarerkrankung [96] und Hypercholesterinämie [102] nachgewiesen.

Ley et al. konnte dann zum ersten Mal den aktiven und direkten Einfluss von zirkulierenden aktivierten Thrombozyten und Thrombozyten-Monozyten-Aggregate auf die Formation atherosklerotischer Läsionen in ApoE defizienten Mäusen nachweisen und bestätigte die Hypothese, dass aktivierte Thrombozyten die Atherosklerose aggravieren. Auf P-Selektin basierende thrombozytäre Interaktionen mit Monozyten und atherosklerotisch veränderten Arterien führen zur Sekretion und Ablage von aus Thrombozyten stammenden proinflammatorischen Faktoren wie RANTES und PF4 auf Monozyten und die Gefäßwand der atherosklerotischen Arterien, was zur monozytären Integrinaktivierung, Rekrutierung der Monozyten und zum atherosklerotischen Fortschritt führt [60].

Zusätzlich förderte die Anwesenheit von aktivierten Blutplättchen die Leukozytenbindung an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und erhöhte deren Adhäsionsfähigkeit an entzündetes oder atherosklerotisches Endothel, ein entscheidender Schritt, um die Atherosklerose zu initiieren [60, 103].

Einzelne Thrombozyten, die direkt an das Endothel binden, waren bei atherosklerotisch veränderten Arterien seltener zu finden als Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate, was darauf schließen lässt, dass aktivierte Thrombozyten sehr schnell an Leukozyten binden und ihr Arrest begünstigen [60].

Die Thrombozyten können zudem an Monozyten und an nicht nur geschädigte sondern auch intakte Endothelzellen binden, fungieren somit als Brückenmoleküle zwischen dem Endothel und den Monozyten und fördern auch auf diese Weise die Monozytenrekrutierung [51] (Abbildung 2 Mitte).

Zusätzlich zur direkten Thrombozyten-Monozyten-Interaktion ist die Adhäsion der Thrombozyten an Endothelzellen ein inflammatorischer Stimulus, der zur Expression von P-Selektin, E-Selectin und ICAM-1 auf der Endothelzelloberfläche und zur Freisetzung von verschiedenen monozytenanlockenden Chemokinen wie CD40L, SDF-1, MCP-1 („monocyte chemoattractant protein“) führt [81, 104]. Diese endotheliale Chemotaxis in Kombination mit den von Thrombozyten stammenden Chemokinen und

Zytokinen bilden die dritte Säule in der von Thrombozyten bestimmten Monozytenrekrutierung (Abbildung 2 rechts).

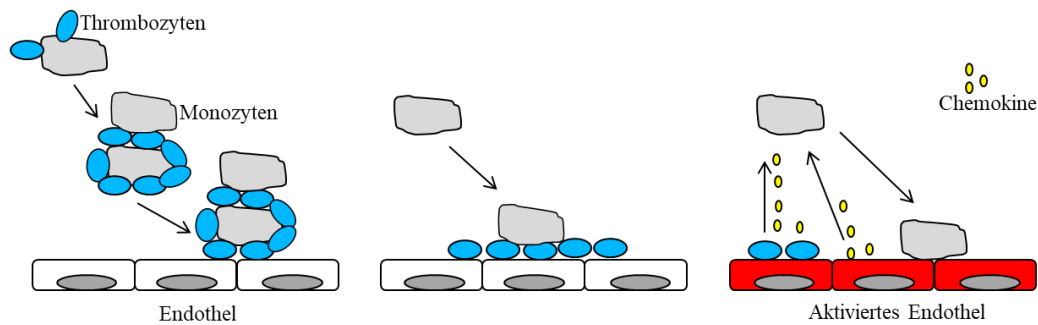


Abbildung 2: Die drei Säulen der Thrombozyten-Monozyten Interaktion. Links: Zirkulierende Monozyten-Thrombozyten-Coaggregate binden über Thrombozyten- oder Monozytenrezeptoren an das Endothel. Mitte: Zirkulierende Monozyten binden über die adhärennten Thrombozyten an das Endothel. Rechts: Chemotaxis der Monozyten durch, von aktivierten Thrombozyten und aktiviertem Endothel stammenden, Chemokinen nach Thrombozytenadhäsion mit direkter Monozytenadhäsion an das Endothel (nach Seizer et al. [51]).

Die durch Chemokine oder Bindung von aktivierten Thrombozyten verursachte Monozytenaktivierung [71] induziert jedoch nicht nur die Monozytenrekrutierung und –migration, sondern auch verschiedene prokoagulatorische und proadhäsive Prozesse bei inflammatorischen Geschehen. Aktivierte Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche MAC-1, L-Selektin und den Gewebefaktor („tissue factor“). Der Gewebefaktor initiiert den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade, MAC-1 bindet den Gerinnungsfaktor X, aktiviert diesen und beschleunigt damit die Fibrinbildung. L-Selektin initiiert den ersten Kontakt zwischen Monozyten und Endothelzellen. Zudem bindet das monozytäre MAC-1 das endothelial exprimierte ICAM-1 und fördert damit zusätzlich die Monozytenadhäsion an Endothel, gefolgt von der Monozytentransmigration [44]. Aktivierte Monozyten setzen ferner eine Vielzahl an inflammationsfördernden Mediatoren wie Interleukine und Leukotriene frei [44]. May et al. vermuten daher, dass diese Monozyten-Thrombozyten Interaktionen mit folgender Monozytenaktivierung und gesteigerter Expression von MAC-1 und Gewebefaktor bei KHK Patienten [105, 106]

eine wichtige Rolle bei thrombotischen Komplikationen nach koronaren Interventionen spielen [44].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur Rezeptor-Verbindungen sondern auch eine Vielfalt an Integrinmolekülen der Zellmembran und Mediatoren bei der interzellulären Kommunikation eine relevante Rolle spielen. Monozyten und Thrombozyten interagieren somit über Rezeptor-Verbindungen oder Mediatorsekretion miteinander und weisen eine gegenseitige Wechselwirkung bezüglich ihrer Funktion und Aktivierung auf mit Einfluss auf die Hämostase, Inflammation und Immunmodulation. Aktivierte Thrombozyten können durch Granulasekretion chemotaktische Signale aussenden, die die Monozyten aktivieren und zur Migration führen. Stimulierte Monozyten wirken im Gegenzug dazu prokoagulatorisch und proadhäsiv, also prothrombotisch [44, 107].

Aktivierte Thrombozyten binden über Adhäsionsrezeptoren Monozyten, bilden Thrombozyten-Monozyten-Aggregate und begünstigen zudem durch proinflammatorische Mediatorsekretion die Monozytenrekrutierung, ein entscheidender Prozess in der Initiierung und dem Progress von atherosklerotischen Läsionen [75, 101, 108]. Interventionen, die zu einer Reduktion der monukleären Zellrekrutierung bei Tieren führten, zeigten, dass sie vor Atherosklerose schützen können [103, 109, 110]. Daher ist die Thrombozytenaktivierung und die Interaktion zwischen Monozyten und aktivierten Thrombozyten eine wichtige Einflussgröße im gesamten atherosklerotischen Prozess.

1.1.3 Thrombozyten beeinflussen die Monozyten-Differenzierung in Makrophagen und Schaumzellen

Periphere Monozyten zirkulieren im Gefäßsystem und differenzieren sich gewebeabhängig nach Adhäsion an das Endothel durch Migration in verschiedene Gewebe nach chemotaktischen Signalen wie Elastin, Fibronectin, Kollagenfragmente, Peptide oder Proteine von anderer Zellen wie Thrombozyten oder Endothelzellen zu reifen Makrophagen mit charakteristischer Morphologie und antigenpräsentierender und phagozytotischer Funktion aus [111]. Dieser Vorgang ist bei inflammatorischen und

atherosklerotischen Situationen zu beobachten. Zusätzlich können Schaumzellen aus Monozyten entstehen, indem ein großer Anteil von Lipopolysaccharide ingestiert wird. Die Phagozytose beschreibt einen speziellen Prozess der Aufnahme von Molekülen durch Zellen in das Zellinnere, beginnend mit der endozytotischen Invagination und anschließender Prozessierung des ingestierten Materials [40, 41, 112–116]. Sie dient der Elimination und dem Abbau von körperfremden, pathogenen, veränderten, geschädigten, gealterten und auch apoptotischen Zellen durch multiple intrazelluläre Mechanismen, wie einem niedrigen pH, reaktive Metabolite oder Enzyme, wie Kollagenasen, Hydrolasen oder Elastasen [117].

Die Initiierung der Phagozytose durch Monozyten und Makrophagen beginnt mit der Erkennung und Adhäsion des zu phagozytierenden Materials über mannigfaltige Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten wurde in 1.1.2 detailliert beschrieben und führt unter anderem zur Formation von Coagregaten zwischen Monozyten und aktivierten Thrombozyten über Rezeptorinteraktionen mit PSGL-1, MAC-1, LFA-1 und EMMPRIN; eine Grundvoraussetzung zur Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten.

Auch apoptotische Thrombozyten werden von Phagozyten, zu denen Monozyten und Makrophagen zählen, durch Phagozytose eliminiert um die Entzündungsreaktion, folgend auf die Freisetzung von reaktiven Substanzen aus der apoptotischen Zelle, zu verhindern. Erkannt wird die Zellapoptose durch die Externalisation von einem speziellen Membranmolekül, dem Phosphatidylserin, auf der extrazellulären äußeren Plasmamembran [118]. Daher wird Phosphatidylserin auch als „eat-me“ Signal für Phagozyten bezeichnet, die über verschiedene Rezeptoren, wie den Scavenger-Rezeptoren CD36, den CD14 Rezeptor, CD68 Rezeptor und Annexin-Rezeptor, Phosphatidylserin erkennen [40, 118–121].

Daub et al. berichtete zudem, dass Thrombozyten in der Lage sind über ihre Scavenger Rezeptoren (z.B. CD36) LDL (Low Density Lipoprotein) sowie oxidiertes LDL (OxLDL) zu binden und anschließend zu internalisieren [122]. LDL bindet nicht nur an Thrombozyten, sondern aktiviert diese auch dadurch [123]. Des Weiteren adhären CD34+ Progenitorzellen und auch Monozyten nach thrombozytären chemotaktischen Signalen an Thrombozyten und differenzieren sich dadurch zu Makrophagen, die wiederum die LDL-beladenen und LDL-internalisierten

Thrombozyten phagozytieren und sich dann in Schaumzellen (Foamcells) ausdifferenzieren [122]. Die Phagozytose von mit LDL beladenen Thrombozyten durch Progenitorzellen mit anschließender Transformation in Schaumzellen konnte zudem mit Hilfe einer Thrombozyten-Progenitorzellen-Cokultur bestätigt werden, da die entstandenen Schaumzellen von einer thrombozytenfreien Zone umgeben waren [31]. Das, aus den Thrombozyten stammende, LDL und OxLDL befindet sich nun im Inneren der Schaumzelle [97]. Thrombozyten fördern somit durch diesen Mechanismus die Transformation von Zellen in Schaumzellen, die eine Hauptrolle bei der Initiierung und dem Fortschritt der Atherosklerose einnehmen [124].

Auch Chemokine, die von Thrombozyten freigesetzt wurden, spielen eine Rolle in der thrombozytenabhängigen Differenzierung in Makrophagen und Schaumzellen. Chatterjee et al. zeigte, dass aktivierte Thrombozyten das Chemokin CXCL12 freisetzen [28]. Wie bereits unter 1.1.2 berichtet, bindet CXCL12 an seine Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und fördert damit die Monozytenadhäsion an Thrombozyten und die Monozytenrekrutierung. Auch die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen wird durch das aus Thrombozyten stammende CXCL12 mit Bindung an CXCR4 und CXCR7 begünstigt, indem es die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten und Makrophagen steigert. Auch hier konnte in einer Monozyten-Thrombozyten Cokultur nachgewiesen werden, dass Monozyten zur Beseitigung von Thrombozyten beitragen, dargestellt anhand einer Reduzierung des thrombozytenbedeckten Bereichs [28]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von OxLDL durch Thrombozyten die Thrombozytenapoptose induziert, da diese LDL-reichen Thrombozyten das „eat-me“ Signal Phosphatidylserin externalisieren. Die darauffolgende Phagozytose der apoptotischen, LDL-bestückten Thrombozyten durch Monozyten und Makrophagen konnte durch CXCL12-CXCR4-CXCR7 Interaktion gesteigert werden und führte zur vermehrten Differenzierung in Schaumzellen [28]. Stellos et al. konnte bestätigen, dass das aus aktivierten Thrombozyten freigesetzte Chemokin CXCL12 neben der Monozytenrekrutierung auch die Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen in Makrophagen und Schaumzellen begünstigt, indem es die Thrombozytenphagozytose durch die Progenitorzellen fördert [83].

Darüber hinaus konnte Chatterjee et al. eine weitere, von aktivierten Thrombozyten stammende, Substanz namens Gremlin-1 für die gesteigerte Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen verantwortlich machen [78]. Gremlin-1 wird von Thrombozyten exprimiert, zusammen mit P-Selektin in den α -Granula gespeichert, nach Aktivierung vermehrt freigesetzt und trägt zur chemotaktischen Monozytenrekrutierung und Monozytenadhäsion an aktivierte Thrombozyten bei [78].

Thrombozyten speichern zudem eine große Anzahl an PF4, das nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt wird und die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen nach OxLDL Aufnahme induziert [125, 126].

Summa summarum fördern Thrombozyten durch LDL und OxLDL Aufnahme ihre Apoptose oder setzen nach Aktivierung Chemokine frei, die die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen, unter anderem auch durch Phagozytose der apoptotischen und LDL/OxLDL-reichen Thrombozyten, begünstigen; ein essenzieller Prozess der Atherogenese und des atherosklerotischen Fortschritts.

1.2 Das Junctional Adhesion Molecule – A (JAM-A/JAM1/F11R)

1.2.1 Sequenz, Struktur und zelluläre Herkunft von JAM-A/JAM1/F11R

Das Junctionale Adhesion Molecule A (JAM-A/JAM1/F11R) ist ein transmembranöses Zelladhäsionsmolekül, das zur Immunglobulin-Superfamilie zählt [127]. Diese Moleküle zeichnen sich durch einen extrazellulären Part mit zwei immunglobulinähnlichen Domänen, einen membrandistalen V-Typ und einen membranproximalen C2-Typ, ein einzelnes Transmembransegment und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz mit einem PDZ-Bindemotiv aus. JAM-A/JAM1/F11R hat eine einzige Disulfidbrücke in jeder immunglobulinähnlichen Domäne. Die distal der Membran befindliche immunglobulinähnliche Domäne von JAM-A/JAM1/F11R ist zur Dimerisierung fähig und bildet somit Homodimere aus. Der zytoplasmatische Teil von JAM-A/JAM1/F11R kann durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden und ist an der intrazellulären Signaltransduktion und Bindung von zytoplasmatischen Molekülen beteiligt [128].

1990 wurde der F11-Rezeptor (alias JAM-A aka JAM1) erstmals beschrieben und als Glykoprotein charakterisiert, das auf der Außenfläche menschlicher Blutplättchen exprimiert wird und die Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen durch einen stimulierenden monoklonalen Antikörper induziert [129].

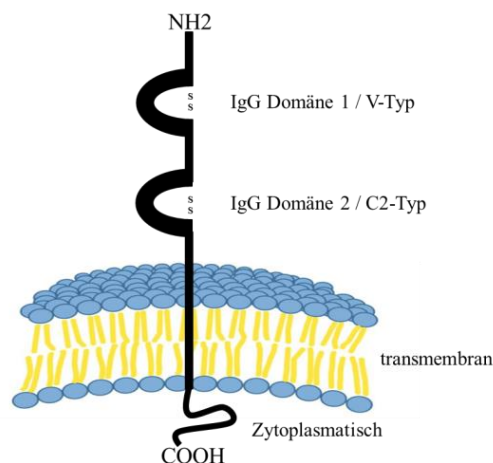


Abbildung 3: Schematische Darstellung des membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R Moleküls mit seiner extrazellulären, transmembranen und zytoplasmatischen Komponente (nach Ebnet et al. [130]).

Genkartographie Analysen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigten die Lokalisation auf Chromosom 1q21.1-21.1-21.3. [131]. Der genetische Code von JAM-A/JAM1/F11R besteht aus 13 Exons (E1a, 1b, 1c, E1-E10), die für die mRNA kodieren [127]. Außerdem wurde die gesamte Aminosäuresequenz des menschlichen JAM-A/JAM1/F11R-Proteins aus cDNA-Klonen gewonnen, die von Thrombozyten und Epithelzellen geliefert wurden [131–134].

Des Weiteren wurden zwei Formen des JAM-A/JAM1/F11R-Proteins mit einem Molekulargewicht von 32kDA oder 35 kDa entdeckt, die sich aufgrund ihres N-Glykosylierungsgrades unterscheiden [135].

JAM-A wird auf der Oberfläche von Epithelzellen multipler Organe wie Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt und Plazenta sowie von Zellen des Gefäßsystems wie Endothelzellen, aber auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen und zirkulierenden peripheren vaskulären Zellen, wie Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert [127, 128, 136–140].

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften von JAM-A/JAM1/F11R

JAM-A/JAM1/F11R wurde bereits von vielen Forschungsgruppen weltweit auf Funktion, Aufbau, Prozessmodulation und –entwicklung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass JAM-A/JAM1/F11R eine bedeutende Rolle bei multiplen zellulären Prozessen im Körper, wie der Thrombozytenaktivierung und Leukozytenmigration, im Zusammenhang mit Hämostase, Inflammation und der Zellphysiologie, wie beispielhaft der Ausbildung von Tight-Junctions, spielt.

JAM-A/JAM1/F11R beeinflusst die endotheliale und epitheliale Zellorganisation indem es zur Bildung und Erhaltung der apikal-basalen Zellpolarität beiträgt [138, 139].

Junctional adhesion molecules (JAMs) wirken zudem bei der Ausbildung von einigen homophilen und heterophilen Verbindungen in cis und trans Form auf Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten mit. Durch diese Funktion unterstützen sie die Entstehung und Festigung des Zellzusammenhalts durch „cell junctions“, die Rekrutierung von mononuklearen Zellen und die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen [128, 136, 140].

Die Bildung von JAM-A/JAM1/F11R-Homodimeren durch homophile Wechselwirkungen interzellulärer epithelialer enger Kontakte scheint ein wichtiges Element der Stabilisierung der Zellübergänge und der Regulierung der epithelialen Barrierefunktion zu sein [141, 142]. So beeinträchtigt JAM-A/JAM1/F11R die vaskuläre und parazelluläre Permeabilität und ist somit auch an der transendothelialen Migration von Leukozyten, beispielhaft an der Monozytenmigration, beteiligt [128, 132, 136, 137]. Die Progression von Entzündungen wird demzufolge durch das Molekül JAM-A/JAM1/F11R gefördert.

Bei vorangegangenen Studien wurde die extrazelluläre Domäne des murinen JAM-A/JAM1/F11R Rezeptors als rekombinantes lösliches Protein (rsJAM-A) generiert, um die molekularen Determinanten der JAM-A/JAM1/F11R Funktion zu untersuchen. Bei der Erforschung der strukturellen Eigenschaften stellte sich heraus, dass rsJAM-A die Fähigkeit besitzt nicht kovalente Homodimere durch rsJAM-A-Dimerisierung zu bilden oder an murines JAM-A/JAM1/F11R auf der epithelialen Oberfläche von Ovarzellen des chinesischen Hamsters zu binden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass sich in der Fluidphase befindliches rsJAM-A mit sich in der Festphase befindliches rsJAM-A verbindet, um eine homotypische Verbindung zu entwickeln, die durch einen Antikörper namens Anti-JAM Fab BV11 gehemmt werden kann [136]. Abzuleiten aus diesen Erkenntnissen über die rsJAM-A Dimerisierung und homophile Interaktion ist eine intrinsische Eigenschaft der extrazellulären Domäne von JAM-A/JAM1/F11R, die für die adhäsive Funktion und die junctionale Organisation von JAM-A/JAM1/F11R verantwortlich ist.

Des Weiteren kann JAM-A/JAM1/F11R auch heterophile Bindungen, zum Beispiel mit dem LFA1 Rezeptor, auf Leukozyten eingehen und beeinflusst damit die mononukleäre Zelladhäsion von Leukozyten an JAM-A/JAM1/F11R exprimierende Strukturen wie Endothelzellen. Neben JAM-A/JAM1/F11R existieren auch zwei sehr ähnliche und eng verwandte Proteine namens JAM-B und JAM-C. Heterophile Interaktionen zwischen endotheliale JAM-B und JAM-C auf Leukozyten wurden von Ebnet et al. beschrieben [130, 143].

Zudem reglementiert membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R das Reaktionsvermögen von Thrombozyten. Es reguliert die Thrombozyten-Adhäsion, das -Spreading, die -Aktivierung, -Sekretion und -Aggregation insbesondere unter

entzündlichen Bedingungen, die zu Atherosklerose und Thrombose führen können [129, 144, 145].

Bei JAM-A/JAM1/F11R defizienten Mäusen konnte ein verstärktes Spreading, eine gesteigerte Thrombozytenaggregation und Thrombusformation verzeichnet werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass JAM-A/JAM1/F11R Einfluss auf die negative Regulierung des Integrins α IIb β 3 ausübt, somit das Integrin outside-in signalling inhibiert und die Thrombozytenakkumulation, gefolgt von der Thrombusformation, verhindert [146].

Das Integrin α IIb β 3 bindet Fibrinogen und trägt damit zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten bei. Inaktive Thrombozyten besitzen ein phosphoryliertes JAM-A/JAM1/F11R, das mit α IIb β 3 assoziiert ist. Diese Assoziation zwischen JAM-A/JAM1/F11R und α IIb β 3 führt zu einem inaktiven Status des Integrins [147]. Durch Aktivierung der Thrombozyten wird JAM-A/JAM1/F11R dephosphoryliert, was die Aktivierung des α IIb β 3 Integrins erlaubt [147].

Experimente mit ApoE und JAM-A/JAM1/F11R defizienten Mäusen, die hohe Plasmacholesterinwerte und Atherosklerose entwickelten, haben zusätzlich gezeigt, was für eine relevante inhibierende Wirkung JAM-A/JAM1/F11R auf Thrombozyten ausübt und welche Rolle JAM-A/JAM1/F11R in der Pathogenese der Atherosklerose einnehmen kann [148]. ApoE und JAM-A/JAM1/F11R defiziente Mäuse zeigten eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion an der geschädigten Endothelstelle ihrer Arteria carotis communis, eine vermehrte Monozytenadhäsion an JAM-A/JAM1/F11R defiziente Thrombozyten und als Folge eine gesteigerte Rekrutierung mononuklearer Zellen und Makrophagenakkumulation mit vergrößerter Neointimaläsion und Proliferation glatter Muskelzellen [148].

Durch eine weitere Studie konnte bestätigt werden, dass ApoE (-/-) Mäusen mit JAM-A/JAM1/F11R defiziente Thrombozyten, die einer starken fetthaltigen Diät unterzogen wurden, eine vermehrte aortale Plaqueformation und gesteigerte Rekrutierung inflammatorischer Zellen zeigten [149].

Dies deutet darauf hin, dass ein genetischer Mangel an membrangebundenem JAM-A/JAM1/F11R bei Mäusen zu einer Hyperreaktivität der Blutplättchen führt und dieser Zustand zu einer erhöhten thrombotischen Disposition, zur Bildung eines

atherosklerotischen Plaques und zum arteriosklerotischen Progress beiträgt [146, 148–150].

In arteriosklerotischen Plaques konnte ferner eine Überexpression an JAM-A/JAM1/F11R nachgewiesen werden [144, 151]. Eine substanzielle Hochregulierung der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf frühem murinen atherosklerotischen Endothel wurde ebenfalls berichtet [152]. Das auf Endothelzellen exprimierte JAM-A/JAM1/F11R steuert zudem Entzündungszellen wie Monozyten an, damit diese sich am prädisponierten Ort des atherosklerotischen Geschehens beteiligen [137].

Eine spezielle synthetisierte Form von löslichem JAM-A/JAM1/F11R (sJAM-A.Fc) hemmt dosisabhängig die LFA-1 (Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1) abhängige statische Adhäsion von mononukleären Zellen an JAM-A/JAM1/F11R exprimiertem Zytokin-kostimuliertem Endothel (Abbildung 4). Darüber hinaus ist die Reduktion von SDF-1 α (stromal cell-derived factor)-getriggelter transendothelialer Chemotaxis und die Migration von aktivierten T-Lymphozyten sowie anderen Leukozyten und deren SDF-1 α -getriggelter Arrest auf entzündetem Endothel ebenfalls auf sJAM-A.Fc zurückzuführen. Diese Ergebnisse konnten durch Vorbehandlung von mononukleären Zellen mit der synthetisierten Form des löslichen JAM-A (sJAM-A.Fc), die zu einer Hemmung ihrer sehr späten Antigen (VLA)-4 -unabhängigen Adhäsion und Akkumulation auf atherosklerotischem Gewebe geführt haben, untermauert werden [152].

Demnach ist membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R für die Initiierung der Plaquebildung und somit für die Entwicklung der Atherosklerose relevant, da es die Adhäsion von Thrombozyten und mononukleären Zellen an die endothelialen prädisponierten atherogenetischen Abschnitte, die vor allem durch Entzündungsreaktionen entstehen, unterstützt (Abbildung 4).

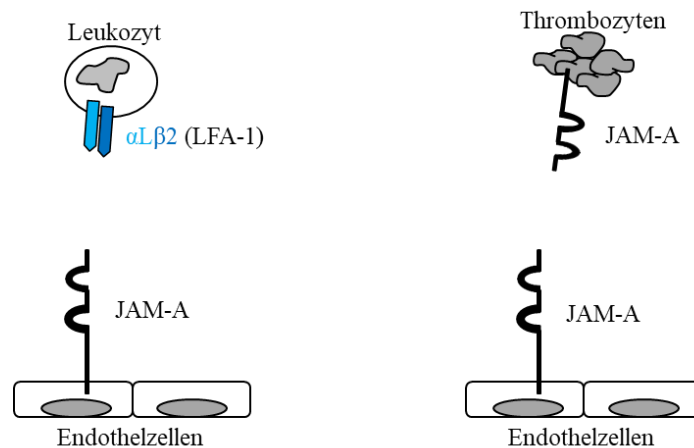


Abbildung 4: Schematische Darstellung der JAM-A/JAM1/F11R Interaktionen. Bindung zwischen Leukozyten LFA-1 (links) oder Thrombozyten JAM-A/JAM1/F11R (rechts) und endothelialelem JAM-A/JAM1/F11R (nach Weber et al. [128]).

Studien mit dem synthetisierten löslichen und blockierenden rekombinanten JAM-A zur Untersuchung der Funktion von JAM-A/JAM1/F11R bei entzündlicher Thrombose haben gezeigt, dass die Thrombozytenbindung an mit Zytokinen-stimulierte Endothelzellen mit resultierender gesteigerter JAM-A/JAM1/F11R Expression gehemmt und signifikant reduziert wurde [140]. Eine Verbesserung der Thrombozytenadhäsion an einer immobilisierten Matrix aus rekombinatem löslichem JAM-A (rsJAMA) wurde im Vergleich zur Thrombozytenadhäsion an Rinderserumalbumin nachgewiesen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte die JAM-A/JAM1/F11R Assoziation auf der Oberfläche der Plasmamembran dieser adhärenen Thrombozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine bedeutende Bindung von nicht-stimulierten Thrombozyten an immobilisiertem rsJAM-A durch einen unabhängigen Mikrotiter-Well-Binding-Assay bestätigt, die durch thrombozytäre Stimulation mit natürlichen Agonisten, Kollagen und/oder ADP verstärkt wurde. Interessanterweise wird diese Thrombozytenadhäsion durch die Zugabe einer blockierenden Form von rsJAM-A fast vollständig gehemmt. Darüber hinaus wurde die JAM-A/JAM1/F11R unterstützte Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen mit Hilfe von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) untersucht. Ruhende, nicht aktivierte Thrombozyten binden nur an $TNF\alpha$ oder $INF\gamma$ stimulierte HUVECs und nicht an unbehandelte HUVECs. Die Vorbehandlung der Thrombozyten mit Kollagen,

einer natürlichen Stimulanz, erhöhte ihre Adhäsionsrate an aktiviertem Endothel. Diese JAM-A/JAM1/F11R gestützten Interaktionen können durch das synthetisierte blockierende rsJAM-A unterdrückt werden, das spezifisch die Wirkung von JAM-A/JAM1/F11R verhindert. Folglich sind Thrombozytenaffinität, Adhäsion und die damit verbundene Aktivierung und Bildung von Thrombozytenaggregaten und mögliche Thrombose durch die JAM-A/JAM1/F11R-vermittelte feste Verknüpfung und homophilen Interaktion zwischen aktiviertem, entzündetem Endothel und Thrombozyten geprägt [140].

Demnach wirkt JAM-A/JAM1/F11R potentiell thrombogen und ist an der Genese entzündlicher Thrombose beteiligt. Zusätzlich führt die Exposition von Entzündungsreagenzien wie Zytokinen zu einer vermehrten und de novo Expression und Umverteilung von JAM-A/JAM1/F11R auf der Oberfläche von Endothelzellen, was eine mononukleäre Zellrekrutierung und erleichterte Thrombozytenadhäsion zur Folge hat [128]. Das Endothel wirkt damit basierend auf JAM-A/JAM1/F11R prothrombotisch und führt demzufolge zu einer Prädisposition und Initiation von entzündlicher Thrombose [140].

Tabelle 1: Funktionelle Eigenschaften von JAM-A/JAM1/F11R

| Ref. | Pathologie | sJAM-A Form | Funktion von sJAMA | Detektionsmethode | Funktionelle Konsequenzen |
|-------|------------------------------|---|---|--|---|
| [136] | Vaskuläre Inflammation | Synthese der extrazellulären Domäne des murinen JAM-A = rsJAM-A | rsJAM-A Dimerisierung, lösliches rsJAM-A bindet an gebundenes rsJAM-A | Ultra-zentrifugation, Immunpräzipitation, Western Blot | Vereinfachte Transmigration durch Adhäsion zwischen JAM-A auf Endothelzellen und Leukozyten. |
| [140] | Thrombose | Synthese von blockierendem rsJAM-A | rsJAM-A blockiert JAM-A | Adhäsions-Assay mit Thrombozyten und HUVECs | JAM-A forciert die Thrombozytenadhäsion an aktiviertem Endothel |
| [152] | Atherosklerose, Inflammation | Synthese von blockierendem rsJAM-A | Interaktion zwischen blockierendem rsJAM-A und JAM-A auf Endothelzellen | Adhäsions-Assay, Immunofluorescence, Perfusions-Assay | rsJAMA inhibiert die auf LFA-1 und JAM-A Interaktion basierende mononukleäre Zellrekrutierung |

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine spezielle blockierende lösliche Form von JAM-A/JAM1/F11R verschiedene Prozessabschnitte der Thrombozytenadhäsion auf Endothel oder der mononukleären Zellrekrutierung durch entzündetes oder

atherosklerotisches Endothel hemmt und daher als potenzieller therapeutischer Wirkstoff in der Therapie der inflammatorischen Thrombose und Atherosklerose angesehen werden kann.

1.2.3 Der pathophysiologische Stellenwert von sJAM-A

Das Molekül JAM-A/JAM1/F11R kann in Form eines membranständigen Rezeptors als Transmembranprotein oder in löslicher Form, dem soluble JAM-A (sJAM-A), mit ähnlicher Molekularstruktur vorliegen [153, 154]. Die extrazelluläre Domäne des membranständigen JAM-A/JAM1/F11R Rezeptors wird von seiner Ursprungszelle durch die Wirkung von Disintegrin- und Metalloproteasen ADAM17 und in geringererem Maße ADAM10 als enzymatischen Spaltungsmechanismus abgeschieden und als lösliche Form, dem soluble JAM-A, in das extrazelluläre Milieu, dem Blutplasma, freigesetzt [151, 155–157]. In vitro Studien mit kultivierten Endothelzellen, die nicht nur eine 43 kDa schwere zelluläre Form des JAMA-Proteins auf ihrer Oberfläche exprimieren, sondern auch kleinere JAM-A/JAM1/F11R Moleküle mit einem Molekulargewicht von 33 kDa freisetzen, unterstützen diese Aussage [154]. Solche Ablöse- und Spaltungsmechanismen wurden auch für L-Selektin und für das Beta-Integrin-Glykoprotein IIIa untersucht [158, 159]. Zelluläre Herkunft des im Blutkreislauf zirkulierenden sJAM-A können somit, wie bereits oben beschrieben, Epithelzellen, Endothelzellen und Zellen des blutbildenden Systems sein. Die Konzentration von sJAM-A im Blutplasma ist folglich abhängig vom Expressionsgrad des transmembranen JAM-A/JAM1/F11R-Rezeptors auf Endothel- oder im Kreislauf zirkulierenden Zellen und der Freisetzungsrates seiner extrazellulären Domäne in den Blutkreislauf [128].

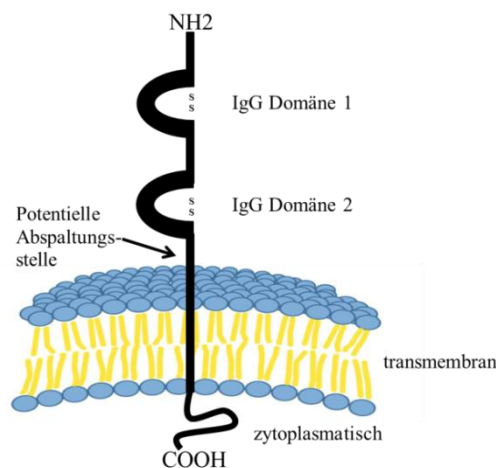


Abbildung 5: Schematische Darstellung des JAM-A/JAM1/F11R mit potentieller Spaltstelle (nach Ebnet et al. [130]).

In vitro- und *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass sJAM-A eine wichtige Rolle in der Gefäßpathogenese von Inflammation, Atherogenese und KHK, Hypertension und systemischer Sklerose spielt; zusammengefasst dargestellt in Tabelle 2. Erhöhte Plasmaspiegel von sJAM-A wurden bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz [155], entzündlichen Prozessen [155], Hypertension [156, 157], Atherosklerose [151] und koronarer Herzkrankheit [151] nachgewiesen.

Eine Vielzahl von humanen Erkrankungen, insbesondere systemische Erkrankungen, werden durch Entzündungen verursacht oder verlaufen unter entzündlichen Bedingungen. Die Identifizierung von JAM-A/JAM1/F11R, das unter anderem auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird und die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion an inflammatorischem Endothel unterstützt, deutet auf seine Mitwirkung bei der Atherogenese, einer vor allem inflammatorisch bedingten Erkrankung, hin. Mehrere Studien implementieren zudem die partielle Umverteilung von JAM-A/JAM1/F11R auf die apikale Oberfläche entzündetem Endothel und damit eine kumulative Rolle koordinierter JAM-A/JAM1/F11R-Interaktionen bei der Rekrutierung von Leukozyten, Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten, Zelladhäsion und transendothelialer Migration; Prozesse, die in allen Fällen eine Gefäßentzündung vermitteln und zur Atherosklerose beitragen [132, 152, 160–162]. Ferner konnten hohe Konzentrationen von JAM-A/JAM1/F11R-Transkripten und eine JAM-A/JAM1/F11R Überexpression oder Hochregulation mit vermehrter

Makrophageninfiltrationen in instabilen, atherosklerotischen Plaques von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und in Plaques, die aus Arterien von atherosklerotisch anfälligen apoE (-/-) Mäusen gewonnen wurden, gezeigt werden. Dies verdeutlicht erneut die Assoziation von JAM-A/JAM1/F11R mit frühen und späteren Stadien des atherosklerotischen Fortschritts und der Entwicklung endothelialer Läsionen [144, 151, 152, 163].

Dementsprechend ist der Einfluss von membranständigem JAM-A/JAM1/F11R auf die Entzündung bereits berichtet, der Beitrag von sJAM-A in der entzündlichen Pathogenese muss jedoch noch genauer evaluiert werden. Aus diesem Grund wurde der Zusammenhang zwischen sJAM-A und Entzündungsmarkern untersucht. Eine Augmentation der endothelial-verknüpften JAM-A/JAM1/F11R Expression und des Plasmaspiegels der löslichen, freigesetzten Form von JAM-A/JAM1/F11R mit positiver Korrelation zwischen sJAM-A und bekannten Entzündungsreagenzien wie Zytokinen als inflammatorische Marker namens TNF α , Interleukin-6 und Interleukin-10 konnte in ersten Untersuchungen von Patienten mit Hämodialyse (HD) beobachtet werden [151, 155, 164]. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD) konnte neben der Erhöhung der Oberflächenexpression von JAM-A/JAM1/F11R gleichzeitig auch ein signifikant vermehrtes Auftreten der löslichen Form, dem sJAM-A, im Serum aufgezeigt werden [151, 164]. Die kardiale Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien führt zur koronaren Herzkrankheit. Erhöhte Plasmakonzentrationen von sJAM-A, gemessen mit einem neuartigen ELISA, wurden unabhängig voneinander mit dem Vorhandensein und der Schwere angiographisch definierter koronarer Herzkrankheit in Verbindung gebracht. Die progredient zunehmenden sJAM-A Plasmawerte sind mit dem Schweregrad der Erkrankung von normaler oder nichtobstruktiver Erkrankung bis hin zu leichter oder mittelschwerer Erkrankung und schwerem Krankheitszustand assoziiert [151]. Diese Korrelationen konnten durch einen Zuwachs von JAM-A/JAM1/F11R-Transkripten, verbunden mit einer gesteigerten JAM-A/JAM1/F11R Expression und Freisetzung von sJAM-A nach Behandlung und Aktivierung von kultivierten, aus humanen Aorten und Venen isolierten, Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und INF γ und folgend eine Reduktion der endothelialen Expression von transmembranen JAM-A/JAM1/F11R-Proteinen, erklärt werden [144, 165].

Dies lässt darauf zurückschließen, dass Thrombozyten und entzündlich, atherosklerotisch verändertes Endothel als eine suffiziente und reich an JAM-A/JAM1/F11R bestückte Quelle für das lösliche Protein sJAM-A im Plasma fungieren könnten, wie es bei Patienten mit systemischer Inflammation nach Polytrauma, bei Patienten mit KHK oder bei Patienten, die zu Atherosklerose neigen, beobachtet werden konnte [151, 166].

Diese Ergebnisse verfestigen die Annahme, dass TNF α die Plasmaspiegel von sJAM-A und die Expression von JAM-A/JAM1/F11R auf der Oberfläche kultivierter Endothelzellen erhöht, was darauf hindeutet, dass sie eine Rolle bei der Mediation von Entzündungen an der Gefäßwand und der Eskalation des atherosklerotischen Fortschritts spielen [151]. Außerdem erhöhte die Zytokin-Behandlung von Mäusen ihren Plasma-JAM-A-Spiegel und war mit einer höheren Aktivität von ADAM10 und ADAM17 verbunden [154]. Im Einklang mit den zuvor berichteten Effekten der Disintegrin- und Metalloprotease ADAM17 und ADAM10 auf die Abspaltung des endothelialen JAM-A/JAM1/F11R Rezeptors, wird durch eine reduzierte ADAM10- und ADAM17-Aktivität die Reduktion der sJAM-A-Plasmaspiegel verursacht [163]. Demgemäß könnte die gesteigerte endotheliale Freisetzung von sJAM-A aufgrund von inflammatorisch verändertem Gefäßendothel als Biomarker für Gefäßentzündungen angesehen werden [154]. Experimente mit blockierendem löslichem JAM-A, das die Akkumulation von mononukleären Zellen und die Adhäsion von Leukozyten an Endothel hemmt, zeigen erneut die Beteiligung von JAM-A/JAM1/F11R bei der vaskulären Inflammation und frühen atherosklerotischen Phasen [152]. Die Analyse zur Untersuchung der antiatherogenen Wirkung von Fischöl bei männlichen Mäusen wies darauf hin, dass verminderte atherosklerotische Läsionen bei LDLR $-/-$ Mäusen, die mit Fischöl gefüttert wurden, mit einer Verminderung des zirkulierenden sJAM-A verbunden sind [163].

Inflammatorische Vaskulopathie und entzündliche Zellinfiltration deuten jedoch nicht nur auf das Krankheitsbild der Atherosklerose hin, sondern sind auch wichtige pathologische Merkmale der systemischen Sklerose (SSc). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Pathogenese von SSc durch JAM-A/JAM1/F11R und sJAM-A beeinflusst wird. Hou et al. berichtete über eine Beteiligung von sJAM-A im Kontext der systemischen Sklerose. Es wurde eine Erhöhung des sJAM-A-Spiegels im

Serum von SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten beschrieben. Des Weiteren hat die Arbeitsgruppe eine Freisetzung von sJAM-A durch kultivierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVECs) nachgewiesen, die, in dem mit TNF α stimulierten Überstand, verstärkt zu finden war [167].

Die Hypertension ist neben der Atherosklerose ein weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor, der durch JAM-A/JAM1/F11R und seinem löslichen Produkt beeinflusst wird. Die Pathogenese der Hypertonie bei Ratten wird durch den membranständigen Rezeptor JAM-A/JAM1/F11R unterstützt. Ein erhöhter systolischer Blutdruck und eine verminderte Herzfrequenz ohne spontanen Einsatz des kardialen Baroreflexes ist auf die JAM-A/JAM1/F11R Überexpression im Gehirn von Ratten zurückzuführen [168]. Zudem begünstigt JAM-A/JAM1/F11R die Anhaftung von Leukozyten an Endothelzellen, was zu Gefäßwandentzündungen und auch zum Teil zu erhöhtem peripheren Widerstand führt und bei Ratten mit spontaner Hypertension beobachtet wurde [152, 169]. Die ursächliche Rolle von löslichem JAM-A bei humanem Bluthochdruck ist dagegen noch unbekannt. Der Zusammenhang zwischen sJAM-A und Bluthochdruck wurde jedoch bereits untersucht. Interessanterweise ist in vivo das Plasmalevel des zirkulierenden sJAM-A bei hypertensiven Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu normotensiven Patienten. Der systolische und diastolische Blutdruck korreliert mit dem sJAM-A Plasmaspiegel. Darüber hinaus konnte der sJAM-A Plasmaspiegel durch Bluthochdruck und Fibrinogenspiegel unabhängig und signifikant korrekt vorhergesagt werden. Folglich spielt sJAM-A auch eine Rolle in der Pathophysiologie der menschlichen Hypertonie [156].

Resümierend ist die Hypertonie neben Atherosklerose und vaskulärer Inflammation ein weiterer wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor, die alle durch erhöhte sJAM-A Plasmakonzentrationen gekennzeichnet sind und progredient verlaufen. Daher könnte die Hochregulierung von sJAM-A Plasmawerten als ein mutmaßlicher prognostischer Biomarker für Bluthochdruck, Atherosklerose, KHK und SSc verwendet werden [157].

Tabelle 2: Zirkulierendes sJAM-A als Biomarker für Pathologien

| Ref. | Pathologie | Detektios - medium / - methode | Popula- tion | sJAM-A Steigerung / Reduktion | Funktionelle Konsequenzen |
|-------|-------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| [155] | Inflammation | Humanes Plasma / ELISA | HD - Patienten | sJAMA↑ | sJAMA als neuer kardiovaskulärer Risikofaktor und Biomarker für Inflammation |
| [151] | Atherosklerose / KHK | Humanes Plasma / ELISA | KHK - Patienten | sJAMA↑ | Beteiligung von sJAMA an der Initiierung und Progression von vaskulärer Inflammation, Atherosklerose |
| [163] | Atherosklerose | Blut von Mäusen / ELISA | LDLR -/- Mäuse | sJAMA↓ | Reduktion des sJAMA- Plasmaspiegels durch reduzierte ADAM10/17- Aktivität bei verminderter Atherosklerose → sJAMA trägt zur Atherogenese bei |
| [167] | Systemische Sklerose (SSc) | Humanes Serum, Überstand von HMVECs / ELISA | SSc Patienten | sJAMA↑ | sJAMA wird von HMVECs freigesetzt und ist bei SSc vermehrt im Serum zu finden → sJAM-A Beitrag zur systemischen Inflammation |
| [156] | Hypertension | Humanes Plasma / ELISA | Patienten mit art. Hypertonie | sJAMA↑ | Korrelation von Plasma sJAMA Level mit diast. und syst. Blutdruckwerten → sJAM-A fördert den hyper- tensiven Progress und gilt als Biomarker für Bluthochdruck |

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Es stellte sich die Frage, wie das Molekül sJAM-A, das bei der Erkrankung Atherosklerose erhöht im Plasma zu finden ist und mit der Krankheitsschwere korreliert, die thrombotische und hämostatische Funktion von Thrombozyten beeinflussen kann.

In verschiedenen Publikationen und Vorarbeiten wurde bereits die zentrale Rolle des membranständigen JAM-A/JAM1/F11R für die Thrombozytenfunktion, Hämostase und vaskuläre Inflammation verdeutlicht. Dabei werden die Aktivität der Thrombozyten und die zellulären Interaktionen zwischen Endothelzellen, Monozyten und Thrombozyten durch JAM-A/JAM1/F11R beeinflusst.

Obwohl es bekannt ist, dass bei KHK Patienten im Blutkreislauf zirkulierende Thrombozyten in einem hyperaktiven Zustand existieren und thromboischämische und thromboinflammatorische Prozesse unterstützen [170, 171], ist der Einfluss von thrombozytärem JAM-A/JAM1/F11R im Rahmen der KHK bisher noch unerforscht. Da zusätzlich das Plasmalevel von sJAM-A bei Atherosklerose- und Bluthochdruckpatienten erhöht ist, war Ziel dieser Arbeit, die potenziellen Auswirkungen von sJAM-A auf die Thrombozytenfunktion und seine pathologische Relevanz zu untersuchen [151, 155, 156, 163].

Im Rahmen meiner Dissertation werden der zugrunde liegende Mechanismus und Effekt von sJAM-A auf das thrombozytäre Überleben und die thrombotische, hämostatische und inflammatorische Funktion von, im Körperkreislauf zirkulierenden, Thrombozyten durch Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung, der Thrombusformation, der Thrombozyten Apoptose und der inflammatorischen Prozesse validiert. So soll diese Arbeit zum Verständnis der Rolle des sJAM-A als wichtiger Akteur im Prozess der Thrombozytenaktivierung und Inflammation beitragen.

Für die Experimente wurde das synthetisierte, lösliche und verkürzte JAMA-D1 mit einer IgG-ähnlichen Domäne und JAMA-D1D2, mit zwei IgG-ähnlichen Domänen, welches dem nativen sJAM-A entspricht [172, 173], verwendet, um die funktionelle Domäne des Proteins zu bestimmen.

Ebenfalls Gegenstand meiner Arbeit war die Untersuchung des molekularen Mechanismus zwischen JAM-A/JAM1/F11R Proteinen durch Einsatz eines humanen anti-JAM-A Antikörpers, der JAM-A/JAM1/F11R blockiert.

In einer weiteren Studie wurde Blut von Patienten mit koronarer Herzkrankheit analysiert, um Rückschlüsse der Auswirkung von sJAM-A auf das humane Gefäßsystem und vor allem auf die Koronarien zu ziehen und sJAM-A möglicherweise als neuen Biomarker zu identifizieren.

Die zu gewinnenden Erkenntnisse über den zugrunde liegenden Mechanismus und die Teilnahme des sJAM-A an Entzündungsprozessen und der Formation von Thrombozytenaggregaten können die Genese und Pathophysiologie des Krankheitsbildes der Atherothrombose und der Atherosklerose mit Folgen wie koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt genauer beleuchten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

| | |
|---|---|
| Sterilbank Heraeus® | Thermo Electron Corporation, Langen-selbold, Deutschland |
| Tischzentrifuge: Heraeus Multifuge 3S+ Centrifuge | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Rührgerät mit Rührfischchen: IKAMAG® RCT | IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| pH-Meter : HI 9025 microcomputer | Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA |
| Sysmex | Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Durchflusszytometer FACS Calibur | BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Wasserbad M20LAUDA Typ MS/2 | LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Zählkammer C chip Neubauer improved | Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Konfokales Mikroskop: Axioplan 2, LSM 510 Meta Laserscan - Mikroskop | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Lichtmikroskop Axiovert 200 | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Kamera: Axio Cam MR | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Perfusor | kd Scientific, Holliston, Massachusetts, USA |

| | |
|--|---|
| Flusskammer | Sonderanfertigungen |
| GloMax® Multi Detection System | Promega, Madison, Wisconsin, USA |
| Multiplate® Analyzer | Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz |
| Präzisionswaage | Denver Instrument / Sartorius, Bohe-mia, New York |
| Brutschrank: incu-safe | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Pipettierhilfe für sterile Einmalpipetten, accu- jet® pro | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Software | |
| ZEN lite (Analyse-Software für Bilder des Konfokalmikroskops) | Version 2012, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| GloMax®Discover System+csv Importer | Promega, Madison, Wisconsin, USA |
| BD CellQuest Pro Software Version 0.3.7 fbb ©1994-2005 (FACScan Software) | BD Biosciences CellQuest™, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Multiplate® Software | Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz |
| PC-Programm zur Zellauszählung: ImageJ Software | National Institutes of Health, USA |
| AxioVision Rel.4.8 | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Statistiksoftware GraphPad Prism | GraphPad Software, La Jolla, Californien, USA |
| Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics Version 21.0 | IBM SPSS Inc, Chicago, USA |
| Gebrauchsgüter | |
| CPDA Monovetten | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Serum Monovette | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| r-Hiruridin Röhrrchen | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Spritze (1 ml, 10 ml, 20 ml) | B. Braun AG, Melsungen, Deutschland |
| Membranadapter für Spritze | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Falcons (15 ml, 50ml) | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Filter MILLEX GP 0,22 µm | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Flügelkanüle / Butterfly | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Pasteur Pipette steril | Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland |
| Zellkulturflaschen T75 Flusk / T175 Flusk | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |
| FACS-Röhrrchen | BD Biosciences Europe, Erembodegem-Aalst, Belgien |
| Petrischale (94x16mm) | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Injektomat Line Spritzenpumpleitung PVC (für Flusskammer) | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland |
| Eppendorf-Gefäße 1ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Deckgläser 24x60mm | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Mikrotiterplatte (24 well plate) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Mikrotiterplatte (96 well plate) Corning® Costar® | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Messzelle für Multiplate | Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz |
| Pipettenspitzen | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Objektträger | R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| Human anti-JAM-A ELISA kit | USCN Life Science Inc., Houston, USA |
| Chemikalien und Reagenzien | |
| steriler ACD-Puffer (Zitronensäure-Citrat- Dextrose-Puffer) | Eigenherstellung (siehe 2.3.1) |
| Tyrodes-Puffer pH 6,5 + 0,1% BSA/Glucos | Eigenherstellung (siehe 2.3.1) |
| Tyrodes 10x | Eigenherstellung (siehe 2.3.1) |
| D (+)-Glucose | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V (pH 7,0) | AppliChem Panreac ITW Companies, Chicago, Illinois, USA |
| HI Fetal bovine/calf serum (FBS/FCS) (HI=Hitze inaktiviert) | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| HCL 1N (Salzsäure) | AppliChem Panreac ITW Companies, Chicago, Illinois, USA |
| NaOH 1N (Natriumhydroxid) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| PBS (Phosphate buffered saline /Phosphat- gepufferte Salzlösung) + Ca ²⁺ | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |

| | |
|--|--|
| Dulbeccos Phosphat Buffered Saline / PBS (ohne Calcium) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Ficoll-Paque™ PLUS | GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden |
| RPMI 1640 Medium (mit 2mM L- Glutamin) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| VascuLife VEGDF LifeFaktors Kit (HUVEC Medium) | LifeLine cell technology, Frederick, USA |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Penicillin Streptomycin | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA / Invitrogen AG, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin / EDTA | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Trypan Blue | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| TRAPtest | Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz |
| TRAP | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| ADP | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| CRP | Von Prof. Richard Farndale, University of Cambridge, UK zur Verfügung gestellt |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Gelatine | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |

| | |
|---|---|
| 70%iges Ethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Isopropanolol | Merck AG, Darmstadt, Deutschland |
| TNF α | Pepto Tech, Rocky Hill, New York, USA |
| INF γ | Pepto Tech, Rocky Hill, New York, USA |
| Triton-X-100 | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Tween®-20 | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Collagenreagens HORM® [100 μ g/ml] | Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich |
| 5-(6-)-CFDA (Carboxyfluorescein-Diacetat) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Oil Red O Pulver | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dako Fluorescent Mounting Medium | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Proteine | |
| JAM-A D1 [10 μ g/ml] | Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle |
| JAM-A D1D2 [30 μ g/ml] | Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen, Prof. Thilo Stehle |
| Antikörper und Isotype | |
| Goat polyclonal anti-human JAM-A-F11R-FITC | R&D systems, Minneapolis, USA |

| | |
|---|--|
| Goat polyclonal anti-human JAM-A-F11R unconjugated antibody | R&D systems, Minneapolis, USA |
| Goat IgG control [10 µg/ml] | Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Texas, USA |
| anti-human CD62P/P-Selektin-Wug.E9-FITC | Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA |
| Primärer anti - Tubulin Antikörper | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Phalloidin - Alexa Fluor 488 | Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| PAC 1 - FITC | BD Biosciences / Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA |
| AnnexinV - FITC | ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland |
| Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) | Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| CD42b/GPIb - PE | Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA |
| CD42b - FITC | Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA |
| CD14 - APC | R&D systems, Minneapolis, USA |
| Zellen / Probe | |
| CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Vollblut zur Thrombozytengewinnung | Freiwillige gesunde humane Spender * |
| CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Vollblut zur Gewinnung plättchenreiches Plasma (PRP) | Freiwillige gesunde humane Spender * |
| ACD-Vollblut zur Herstellung von Washed Platelets / gewaschene Thrombozyten | Freiwillige gesunde humane Spender * |
| Leukozyten Kegel zur Monozytengewinnung | Transfusionsmedizin Tübingen |

| | |
|--|--------------------------------------|
| HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) | Promocell, Heidelberg, Deutschland |
| Hirudin Vollblut | Freiwillige gesunde humane Spender * |

* Freiwillige gesunde Spender = keine Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme in den letzten 14 Tagen

2.2 Klinische Studie: Methoden und Patientenkollektiv

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine randomisierte klinische Studie mit 80 konsekutiven Patienten durchgeführt. Einschlusskriterien der Patienten waren eine bekannte symptomatische koronare Herzkrankheit und die Aufnahme in die Klinik für Kardiologie und Herzkreislaufkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen in Deutschland. Die Anamnese, Untersuchung und Aufklärung der Patienten gewährleistete der diensthabende Arzt mit resultierender schriftlicher Einverständniserklärung zur Studienteilnahme vor Studienbeginn. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission genehmigt (270/2011B01) und erfüllte die Bestimmungen der Erklärung von Helsinki und die Richtlinien „good clinical practice guidelines“ [28, 174].

Die „Baseline Charakteristika“ der Patientenkohorte mit koronarer Herzkrankheit wird in Tabelle 3 beschrieben. Die Daten wurden von der TuePIC Datenbank bereitgestellt.

Die symptomatische koronare Herzkrankheit auf dem Boden der kardialen Ischämie wurde unterteilt in stabile Angina pectoris (SAP) und akutes Koronarsyndrom (AKS), zu dem die instabile Angina pectoris (IAP), der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) zählen. Die stabile Angina pectoris ist definiert als ein klinisches Syndrom, welches durch häufig anfallsartig auftretendes Unbehagen oder Schmerzen vor allem in der Brust, aber auch im Kiefer, in der Schulter, im Rücken oder im Arm charakterisiert ist. Typischerweise wird sie durch körperliche Verausgabung oder emotionalen Stress hervorgerufen und nach Nitroglyceringabe oder Ruhe gemindert oder verschwindet vollständig. Unter dem akuten Koronarsyndrom wird die *de novo*, sich verschlechternde oder in Ruhe auftretende Angina pectoris, auch

instabile Angina pectoris genannt, und der akute Myokardinfarkt, der in NSTEMI und STEMI differenziert wird, verstanden. Die Diagnose akuter Myokardinfarkt wurde gestellt bei einem Anstieg des kardialen Biomarkers Troponin (cTn) im Blut auf einen Wert über der 99. Perzentile über dem Referenzlimit und einem der folgenden pathologischen Veränderungen: Symptome der kardialen Ischämie wie thorakale Schmerzen, neu aufgetretene ischämische EKG-Veränderungen wie eine ST-Streckenveränderung, ein neuer oder vorbestehender Linksschenkelblock oder die Entwicklung von pathologischen Q-Zacken, ein bildgebendes Verfahren, das den Verlust von vitalem Myokard oder kardiale regionale Wandbewegungsstörungen darstellt oder der angiographische Beweis eines intrakoronaren Thrombus [174].

Die Oberflächenexpression von F11R auf Thrombozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde im Vergleich zu gesunden Probanden (n=80, AKS=65, SAP=15) mittels Vollblutdurchflusszytometrie gemessen. Die Thrombozyten aus dem Vollblut wurden auf den thrombozytenspezifischen Marker CD42b (GPIb α) untersucht.

Von den konsekutiven Patienten wurde Blut in CPDA-Röhrchen entnommen, mit PBS auf 1:50 verdünnt und mit den entsprechenden fluorochromkonjugierten anti-human JAM-A/F11R-FITC- und anti-human CD42b/GPIb-PE – Antikörpern inkubiert. Der Schwellenwert wurden mit Hilfe entsprechender Isotypenkontrollen ermittelt und am Durchflusszytometer eingestellt. Die Proben wurden 30 Minuten lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit 0,5% PFA fixiert und die JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert [174, 175]. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden durch die Medizinsch-technische Assistentin Frau Lydia Laptev erfasst.

Die Serumwerte von JAM-A, somit also das sJAM-A, wurden mit Hilfe des Anti-JAM-A-ELISA-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers durch die Medizinsch-technische Assistentin Frau Ingrid Epple quantifiziert. Dafür wurde 40 Patienten aus der zuvor beschriebenen Patientenkohorte mit koronarer Herzkrankheit Blut in Serum-Röhrchen abgenommen und das Serum durch Zentrifugation bei 1800 g für 10 Minuten mit Bremse gewonnen.

Tabelle 3: Baseline Charakteristika zur Klinischen Studie

| Baseline Characteristics | |
|--|---------------------|
| No of patients | 80 |
| Male | 58 (72.5 %) |
| Female | 22 (27.5 %) |
| Age, years (mean±SD) | 66.7 (±11.9) |
| Groups | |
| Stable CAD | 15 (18.8 %) |
| Unstable CAD | 13 (16.3 %) |
| NSTEMI | 29 (36.3 %) |
| STEMI | 23 (28.8 %) |
| Cardiovascular risk factors | |
| Arterial Hypertension | 53 (67.1 %) |
| Hyperlipidemia | 30 (38.0 %) |
| Diabetes mellitus | 24 (30.4 %) |
| Family history | 14 (17.7 %) |
| Smoking | 24 (30.4 %) |
| Atrial fibrillation | 19 (24.1 %) |
| Medication on admission | |
| Acetylsalicylic acid | 32 (46.4 %) |
| Clopidogrel | 7 (10.1 %) |
| Prasugrel | 5 (7.2 %) |
| Ticagrelor | 2 (2.9 %) |
| Marcumar | 4 (5.8 %) |
| Xarelto | 5 (7.2 %) |
| Eliquis | 2 (2.5 %) |
| β-blockers | 46 (66.7 %) |
| Angiotensin-converting enzyme inhibitors | 34 (50.0 %) |
| Angiotensin II receptor antagonists | 9 (13.0 %) |
| Calcium Channel Blockers | 20 (29.4 %) |
| Statins | 34 (49.3 %) |
| Loop Diuretics | 4 (5.9 %) |
| Thiazide Diuretics | 14 (20.6 %) |
| Potassium-sparing Diuretics | 3 (4.4 %) |
| 2 or more Diuretics | 7 (10.3 %) |
| Functional parameters (mean±SD) | |
| LVEF (%) | 49.2 (±11.7) |
| Troponin (µg/l) | 17.3 (±39.7) |
| CRP (mg/dl) | 1.6 (±2.1) |
| CK(U/l) | 371.9 (±573.5) |
| Leucocytes (1/µl) | 11725.0 (±21753.9) |
| Platelets (1/µl) | 229828.3 (±71334.4) |
| GFR (ml/min) | 75.2 (±20.1) |

2.3 Experimentelle Studie: Methoden

2.3.1 Herstellung von PRP und Thrombozyten Isolation

Herstellung ACD-Puffer = Säure-Zitrat-Dextrose -Puffer

116 mM Natriumcitrat, 70 mM Zitronensäure und 110 mM Glucose in ein Reagenzglas geben, mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen und gut vermischen. Dieses Gemisch mit NaOH auf pH 4,69 einstellen, steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren.

Herstellung Thyrodes 10x Puffer

1,4 M Natriumchlorid, 120 mM Natriumhydrogencarbonat und 26 mM Kaliumchlorid in ein Reagenzglas geben, ad 1000ml Aqua dest. und gut vermischen. Anschließend steril filtrieren, und bei 4°C aufbewahren.

Herstellung Thyrodes Puffergebrauchslösung

20 ml Tyrodes 10x mit 0,1% Glucose und 0,1% BSA in ein Reagenzglas geben, mit Aqua dest. auf 200 ml Gesamtmenge auffüllen, mit Hilfe eines Magneten gut mischen und durch HCl 1M Zugabe auf pH 6,5 titrieren.

Herstellung von Platelet Rich Plasma (PRP) aus humanem Vollblut

Blutentnahme eines gesunden und freiwilligen Spenders in CPDA-Monovette. Das Blut in ein 15ml Falcon vorsichtig überführen. Anschließend die Zentrifugation bei 1000 rpm (190xg) ohne Bremse für 20 min bei RT vornehmen. Im Falcon setzt sich oberhalb der abzentrifugierten Zellen das PRP ab, das mit einer Pasteur-Pipette abgenommen werden kann. Zur Thrombozyten-Konzentrationsbestimmung durch Sysmex 10 µl PRP mit 90 µl PBS suspendieren (Verdünnung 1:10).

Thrombozyten Isolation aus humanem Vollblut: Herstellung von Washed Platelets (gewaschene Thrombozyten) unter sterilen Bedingungen bei Verwendung zur Zellkultivierung

Zur Vorbereitung der Blutentnahme von humanem Vollblut eines gesunden und freiwilligen Spenders wird eine Spritze (20 ml) mit 4 ml steril filtrierten ACD-Puffer befüllt und anschließend für 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für die Blutentnahme wird eine Butterfly Nadel verwendet und die mit ACD-Puffer vorbefüllte Spritze langsam unter gleichmäßigem Zug mit Blut gefüllt, damit es zu keiner Stimulation der Thrombozyten kommt. Nach der Blutentnahme sollte die Spritze vorsichtig gewendet werden, damit sich das Blut mit dem ACD-Puffer gleichmäßig vermischt. Anschließend werden Falcons (15 ml) langsam mit jeweils 10 ml Blut befüllt und bei 1000 rpm (190xg) ohne Bremse für 20 min bei RT zentrifugiert. Es entsteht PRP, eine klare gelbliche Schicht oberhalb der abzentrifugierten Zellen.

Zur Herstellung von Washed Platelets 20 ml Tyrodes-Puffer (pH 6,5) in jeweils ein Falcon (50 ml) filtrieren, das PRP aus jeweils einem Falcon mit der Pasteur-Pipette abnehmen und langsam über den Tyrodes-Puffer geben. Als nächstes werden die Falcons mit filtriertem Tyrodes-Puffer auf 35ml aufgefüllt und bei 2100 rpm (900xg) mit Bremse für 10min bei RT zentrifugiert. Im nächsten Schritt den Überstand verwerfen und das Thrombozytenpellet, das sich am Boden des Falcons gebildet hat, mit 1 ml PBS Ca^{2+} vorsichtig suspendieren. Bei Verklumpung des Pellets ist es nicht zu gebrauchen und zu verwerfen. Mit dem Sysmex-Hämatologiegerät kann nun die Thrombozytenkonzentration des Gemisches der Washed Platelets /Thrombozytenanzahl bestimmt werden (Verdünnung mit PBS 1:10) und je nach Versuch die Zellzahl eingestellt werden.

2.3.2 Monozyten Isolation

Die Isolation von Monozyten ist von zweitägiger Dauer und wird unter der Sterilbank durchgeführt. Daher müssen auch alle benötigten Materialien steril sein.

Tag 1: Das Blut aus jeweils einem Leukozyten-Kegel wird in jeweils eine Zellkulturflasche (T75 Flusk) überführt. Mit PBS wird die Flasche auf 75 ml aufgefüllt und leicht geschwenkt. Pro Donor werden 3 Falcons (50 ml) mit 20 ml Ficoll-Paque befüllt. 30 ml des mit PBS verdünnten Blutes wird jeweils langsam und vorsichtig mit Hilfe des Pipettenboys über das Ficoll-Paque geschichtet sodass zwei gut voneinander getrennte Phasen entstehen. Als nächstes werden die Falcons bei 2100 rpm ohne Bremse für 20 min zentrifugiert. Mit einer sterilen Transferpipette wird die weißliche, einer Milchhaut ähnelnde, PBMC-reiche Intermediärschicht abgenommen und in ein Falcon (50 ml), das zuvor mit 5 ml PBS befüllt wurde, transferiert und suspendiert. Pro Donor wird ein Falcon (50 ml) verwendet und dieses schließlich auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgt zum Pelletieren eine zweimalige Zentrifugation bei 1600 rpm mit Bremse für 5 min. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wird der Überstand verworfen, das entstandene Pellet mit PBS resuspendiert, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und nach dem zweiten Zentrifugationsschritt auf 30 ml aufgefüllt. Zur Thrombozytenreinigung erfolgt die zweimalige Zentrifugation bei 800 rpm mit Bremse für 12 min und zwischenzeitlichem Überstandsabwurf, Resuspension und Wiederauffüllen mit PBS auf 30 ml. Um die Monozytenkultivierung vorzubereiten, wird während der Zentrifugation RPMI-Medium complete hergestellt, indem 10% FCS und 1% Pen. Strep zu dem RPMI-Medium hinzugefügt wird. Dieses wird bei 37°C angewärmt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 4 ml RPMI-Medium complete resuspendiert, bevor die Monozytenzahl (PBMC oder WBC) mit Hilfe des Sysmex bei einer 1:10 Verdünnung mit PBS (10 µl Zellsuspension + 90 µl PBS) bestimmt wird. Nun werden maximal 2×10^8 PBMCs in eine Zellkulturflasche (T75 Flusk) gegeben, die zuvor mit 15 ml angewärmtem RPMI-Medium complete benetzt wurde. Über Nacht werden die Zellen bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Tag 2: Als erstes wird das Medium aus den Kulturflaschen entfernt und verworfen. Mit 15 ml PBS pro Kulturflasche werden die nicht adhärenen PBMCs in einem dreimaligen Waschgang abgelöst und das PBS erneut komplett entfernt. Diesen

Vorgang unter mikroskopischer Kontrolle so oft wiederholen bis alle beweglichen Zellen entfernt sind. Um die intakten am Boden der Zellkulturflasche anhaftenden PBMCs zu lösen, muss 2 ml Trypsin pro Zellkulturflasche hinzugefügt und durch leichtes Schwenken auf dem Boden verteilt werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen abgelöst haben und sie beweglich erscheinen. Gegebenenfalls muss die Inkubationszeit bei nicht Ablösen der Zellen verlängert werden. Durch Zugabe von 12 ml RPMI-Medium complete wird die Trypsin Reaktion beendet. Mit dem hinzugefügten Medium wird der mit Monozyten bedeckte Boden der Zellkulturflasche mit starkem Pipettenstrahl zehn Mal abgespült, um möglichst alle gelösten Monozyten aufzufangen. Das Medium wird schließlich pro Donor in 2 Falcons (50 ml) transferiert und bei 1600 rpm mit Bremse für 10 min zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wird das Pellet mit 500 µl RPMI-Medium complete suspendiert und mit Hilfe der C-Kammer die Monozytenzahl unter dem Mikroskop (20x Objektiv) ausgezählt. Dafür werden 10 µl Monozytenmedium mit 10 µl Trypanblau und 80 µl PBS gemischt und davon 10 µl in die C-Kammer gegeben. Zur Konzentrationsbestimmung des Monozytenmediums gilt: $(n / 4) \times 10^5 / \text{ml}$ mit n = in C-Kammer gezählte Monozyten.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine laserbasierte Methode, womit in kürzester Zeit fluoreszenz-markierte Zellen in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom detektiert werden können. Die Durchflusszytometrie wird auch „fluorescent activated cell sorting“, kurz FACS, genannt.

Durch Erfassung der sich bildenden Lichtstreuung und der Fluoreszenz kann eine Zellzählung und Zellsortierung nach Größe (forward scatter), Granularität (sideward scatter) sowie nach Oberflächenexpression der Zellen durch Biomarkerdetektion erfolgen. Diese Technologie ermöglicht somit eine simultane und multiparametrische Klassifizierung und Analyse der Zelleigenschaften. Markiert werden beispielsweise Thrombozyten durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers über ihre spezifischen Membranproteine, damit sie während der durchflusszytometrischen Messung durch Konjugation dieses Antikörpers mit fluoreszierenden Substanzen wie Phycoerythrin

(PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) identifiziert werden können. Die genauere Technik der Durchflusszytometrie wird in [84, 176, 177] beschrieben.

Sämtliche in dieser Dissertation beschriebenen Messungen erfolgten an einem Durchflusszytometer namens FACS Calibur der Firma BD Biosciences. Zur Datenauswertung wurde das am Gerät angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm des Herstellers (BD CellQuest Pro Software) verwendet.

2.3.4 Durchflusszytometrie: JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Thrombozytenoberfläche

Die durchflusszytometrische Bestimmung der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Oberfläche aktivierter menschlicher Thrombozyten wurde mit Hilfe von anti-JAM-A-F11R-FITC-Antikörper und anti-CD62P/P-Selektin-Wug.E9-FITC als bekannter Marker der Thrombozytenaktivierung durchgeführt. Zu Beginn wurde die Isolation von PRP aus humanem Vollblut vorgenommen (siehe 2.3.1) und die gewünschte Konzentration von 20.000 Thrombozyten/ μl mit PBS Ca^{2+} eingestellt. Die zu messenden Versuchsreihen und das gesamte Pipettierschema sind in Tabelle 4 abgebildet. Jede Probe wurde doppelt angelegt. Das Gesamtvolumen pro FACS-Röhrchen betrug 50 μl und wurde bei Bedarf mit PBS aufgefüllt. Zu Beginn wurden die Thrombozyten mit Agonisten wie TRAP [25 μM], ADP [10 μM], CRP [5 $\mu\text{g/ml}$] oder ohne Stimulationsreagenz für 30 min bei RT inkubiert und somit stimuliert. In jedes FACS-Röhrchen wurden anschließend 10^6 dieser Thrombozyten gegeben. Die Thrombozyten wurden mit fluorochromkonjugierten Antikörpern, jeweils 10 μl anti-JAM-A-F11R-FITC-Antikörper und 5 μl anti-CD62P/P-Selektin-Wug.E9-FITC angefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit jeweils 300 μl 0,5%igem PFA fixiert. Nun konnte die Analyse der gefärbten Zellen am Durchflusszytometer FacsCalibur (BD Bioscience) erfolgen [78]. Es wurden 7 unabhängige Experimente durchgeführt (n=7).

Tabelle 4: JAM-A/JAM1/F11R Expression, Pippettierschema

| Sets [μ l] | PRP | PRP+ TRAP | PRP+ ADP | PRP+ CRP | antiJAM-A FITC | antiCD62P FITC | PBS |
|-----------------|-----|--------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-----|
| Resting | 5 | - | - | - | 10 | 5 | 30 |
| TRAP | - | 5 | - | - | 10 | 5 | 30 |
| ADP | - | - | 5 | - | 10 | 5 | 30 |
| CRP | - | - | - | 5 | 10 | 5 | 30 |

2.3.5 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie:

Aktiviertes Endothelium als Quelle für JAM-A/JAM1/F11R

Versuchsvorbereitung: HUVEC Kultivierung

Für dieses Experiment wurden spezielle menschliche Endothelzellen der Nabelschnurvene, die Human Umbilical Vein Endothelial Cells, kurz HUVECs, verwendet. HUVECs werden aus dem Endothel der Venen der Nabelschnur gewonnen. Heutzutage werden sie in der medizinischen Forschung als Modellsystem zur Untersuchung der Pathophysiologie von Endothelzellen genutzt, da sie robust sind und leicht proliferieren. Die Isolation und in vitro Kultivierung von HUVECs gelang Jaffe et al. zum ersten Mal in den 1970er Jahren [178].

Die HUVECs werden in Eppendorf-Gefäßen (0,5 ml, 3×10^6 Zellen pro Gefäß) bei -150°C gelagert und müssen daher erstmals im Wasserbad bei 37°C aufgetaut werden. Alle künftigen Arbeiten müssen steril unter der Sterilbank vollzogen werden. Anschließend wurden die Zellen in einem mit 5 ml bei 37°C angewärmtem speziellen HUVEC – Medium (VascuLife VEGDF LifeFaktors Kit) befüllten Falcon (15 ml) suspendiert. Dieses spezielle HUVEC - Medium wurde in den folgenden Schritten immer verwendet und jeweils mit 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Nach der Zentrifugation bei 1400 rpm ohne Bremse bei RT für 5 min wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet erneut in 10 ml Medium gelöst. Die Zellkulturflaschen (T175 Flasks) wurden mit 0,2% Gelatine beschichtet, für 10 min bei 37°C inkubiert, die Gelatine wieder abgenommen und anschließend 5 ml der Zellsuspension in ihnen ausgesät, bevor sie mit 15 ml Medium befüllt und im

Brutschrank bei 37°C aufbewahrt wurden. Unter dem Mikroskop konnte die Dichte der ausgesäten Endothelzellen kontrolliert werden.

Versuchsdurchführung

Am Versuchstag 1 müssen die HUVECs auf Deckgläschen (24 x 60 mm) kultiviert werden, damit diese eine einheitliche, konfluente, das Deckgläschen bedeckende, Monoschicht an Zellen ausbilden können. Dazu wird die Flüssigkeit der Kulturflasche abgenommen und die HUVECs mehrmals mit PBS gewaschen: Mit 4 ml Trypsin und einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Endothelzellen vom Kulturflaschenboden gelöst. Durch Zugabe von 20 ml Medium wurde die Trypsin Reaktion gestoppt und die gesamte Flüssigkeit nach mehrmaligem Schwenken in ein Falcon (50 ml) überführt. Nach der anschließenden 5 minütigen Zentrifugation mit 1400 rpm ohne Bremse bei RT wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml Medium gelöst. Unter Verwendung der C-Kammer unter dem Mikroskop mit 10 µl der Lösung, bestehend aus 80 µl PBS, 10 µl Trypanblau und 10 µl der Endothelzelllösung, konnte die Anzahl der gewonnenen Endothelzellen bestimmt werden [179]. Im nächsten Schritt wurden jeweils 2 sterile Deckgläschen, die zuvor 30 min in Ethanol eingelegt und getrocknet wurden, in 2 Petrischalen gelegt. Auf jedes Deckgläschen wurden mit einem Lipidstift zwei Begrenzungslinien im Abstand von ca. 40 mm gezogen. Dieser Bereich wurde mit 0,2%iger Gelatine beschichtet und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden je $0,7 \times 10^6$ HUVECs gut verteilt auf die Gelatine gegeben und die Petrischalen bei 37°C für 30 min inkubiert, damit die HUVECS auf den Deckgläschen adhäreren konnten. Am Ende Zugabe von 8 ml Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C. Dabei war darauf zu achten, dass die Deckgläschen vollständig mit Medium bedeckt sind und separiert liegen. Der verbliebene Rest der HUVECS wurde für weitere Versuche in eine Kulturflasche (max. 2×10^8 HUVECS pro T 175 Flusk) mit 20ml Medium ausgesät und bei 37°C gelagert.

Der Versuchstag 2 beginnt mit der Entfernung des Mediums aus den Petrischalen. Eine Suspension aus Endothelzellaktivierungsreagenzien (pro Petrischale 5 ml Medium mit TNF α [50 ng / ml] und INF γ [20 ng / ml]) wurde angelegt, zu den HUVECS gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Eine Probe (eine Petrischale mit 2 mit HUVECS bedeckten Deckgläschen) bleibt unbehandelt.

Um die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie für den nächsten Tag vorzubereiten, wurde nach der Inkubationszeit das Medium vollständig entfernt und die konfluierende Monoschicht von unstimulierten HUVECS oder mit TNF α und INF γ aktiveirten inflammatorischen HUVECS auf den Deckgläschen mit 4%igem PFA fixiert. Anschließend wurden die Endothelzellen mit 0,3% Triton-X-100 permeabilisiert und mit PBS mit 1% BSA für 30 min blockiert. Danach wurden die Zellen mit einem entsprechenden primären Antikörper gegen JAM-A/JAM-1/F11R [1: 250] gefärbt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am Versuchstag 3 wurden die Zellen zuerst mit einem entsprechenden sekundären fluoreszierenden Antikörper belassen und daraufhin mit dem Waschpuffer (PBS ergänzt mit 0,3% Triton-X-100 und 0,1% Tween-20) sorgfältig gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Fluorescent mounting medium (Dakro) eingedeckelt und mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Die konfokalen Bilder wurden mit einem Laserscan - Mikroskop (Carl Zeiss, LSM 510 Meta, Axioplan 2 Imaging Confocal) aufgenommen [28, 78]. Zur Analyse wurde die Software ZEN lite (Version 2012) herangezogen. Die Arbeiten am dritten Versuchstag und die Analyse erfolgte durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee. Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt (n=3).

2.3.6 Flusskammer zur Untersuchung der Thrombozyten Adhäsion auf aktivierten Endothelzellen

Mit der Flusskammer kann man unter arterieller Scherrate (12,86 ml/h oder 1700 s⁻¹) die dynamischen Bedingungen in einem arteriellen Gefäß nachahmen und somit die statische Adhäsion von Thrombozyten auf mit TNF α und INF γ aktivierten Endothelzellen, die die Arterie auskleiden, untersuchen [180].

Der Aufbau der Flusskammer beginnt mit der Installation und Einstellung des Perfusors neben dem Mikroskop, dem Zusammenbau der Flusskammer, bestehend aus dem Metallrahmen, dem Plexiglasbau mit Durchflussrinne, ein zuführender und abführender Schlauch, zwei Feststellschrauben und einer Petrischale auf dem Mikroskop Objektisch als Ablage für die Flusskammer.

Zuerst wurden dafür, wie bereits in 2.3.5 beschrieben, HUVECs als konfluente Monoschicht auf Deckgläschen (24x60 mm) in Petrischalen kultiviert und anschließend mit TNF α und INF γ aktiviert und inflammatorisch stimuliert, um die Oberflächenexposition von JAM-A/JAM1/F11R auszulösen. Die Proben wurden dann für 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zwischen der Stimulation der HUVECs einer Versuchsreihe immer ein Abstand von 1 h belassen damit die Stimulationszeit zwischen den verschiedenen Sets annähernd gleich bleibt. 2 Petrischalen mit HUVECs beschichteten Deckgläschen werden nach Abnahme des Mediums mit blockierendem Anti-JAM-A-F11R-Antikörper [10 $\mu\text{g/ml}$] oder mit der entsprechenden Kontrolle IgG goat [10 $\mu\text{g/ml}$] für 30 min bei RT inkubiert um eine Blockierung der JAM-A/JAM1/F11R Expression der aktivierten HUVECs vorzunehmen bevor der Flusskammer Versuch damit gestartet wurde. Als nächstes wurde die Reagenzienherstellung von JAM-A D1 [10 $\mu\text{g/ml}$], JAM-A D1D2 [30 $\mu\text{g/ml}$], antiJAM-A [10 $\mu\text{g/ml}$] und IgG goat [10 $\mu\text{g/ml}$] vorgenommen. Anschließend wurde von einem freiwilligen, gesunden Spender Blut in CPDA – Röhrchen abgenommen und daraus PRP mit einer Konzentration von $100 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Thrombozyten durch Verdünnung mit PBS Ca²⁺ erstellt (siehe 2.3.1). Pro Versuchset wurde ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml PRP und entsprechendem Reagenz oder ohne Reagenz für 30 min bei RT angesetzt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Experimentelle Sets der Thrombozytenadhäsion auf aktivierten Endothelzellen

| Set | Bestandteile |
|-----|--|
| 1 | Stimulierte HUVECs + unbehandelte Thrombozyten |
| 2 | Stimulierte HUVECs + mit JAM-A D1 vorbehandelte Thrombozyten |
| 3 | Stimulierte HUVECs + mit JAM-A D1D2 vorbehandelte Thrombozyten |
| 4 | Stimulierte HUVECs + mit antiJAM-A vorbehandelte Thrombozyten |
| 5 | Stimulierte HUVECs + mit IgG vorbehandelte Thrombozyten |
| 6 | HUVECs mit anti JAM-A vorbehandelt + unbehandelte Thrombozyten |
| 7 | HUVECs mit IgG vorbehandelt + unbehandelte Thrombozyten |

Um die Thrombozyten über die auf dem Deckgläschen adhärenen HUVECs fließen lassen zu können muss das Deckgläschen zuerst mit dem Plexiglasbau mit Kontakt der Durchflussrinne mit den HUVECs bedeckt und in den Metallrahmen

eingespannt werden. Vor der Perfusion der Thrombozyten mit arterieller Scherrate (12,86 ml/h oder 1700 s^{-1}) durch die Flusskammer, wurde diese mit PBS Ca^{2+} Puffer sorgfältig durchgespült damit alle Luftblasen aus der Flusskammer entfernt werden. Die mit 1 ml PRP befüllte Spritze wird in den Perfusor eingelegt und mit einem Schlauch mit der Flusskammer verbunden. Nun wird die bestückte Flusskammer unter das Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200 von Zeiss gelegt, das 20er Objektiv eingestellt, das Computerprogramm Axio Vision gestartet und die Schwarz-Weiß-Kamera AxioCamMR ausgewählt. Die Perfusion wird mit einer kontinuierlichen Laufrate von 12,86 ml/h, die dem gewünschten arteriellen Scherstress entspricht, für 4min begonnen.

Nach dem Lauf der Flusskammer mit den Blutplättchen wurde eine 10 ml Spritze mit PBS Ca^{2+} als Waschgang unter einem Fluss von 7,53 ml/h für ca. 1 min angehängt um das noch verbliebene Blut in der Flusskammer zu beseitigen um die Thrombozytenadhäsion gut sichtbar zu machen. Danach wurden mindestens vier Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie Fotos aus zufällig gewählten, optischen Bereichen der Flusskammer aufgenommen und unter dem Originalformat .zvi in der Axio-Vision-Software gespeichert.

Abschließend wurde die Flusskammer deinstalliert und alle Bestandteile mit PBS ordentlich gereinigt bevor der Versuch fortgesetzt werden konnte.

Zur Auswertung der Fotos wurde die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten mit Hilfe der ImageJ-Software ausgezählt [28]. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt (n=5).

2.3.7 Konfokalmikroskopie: Thrombozyten Adhäsion und Spreading auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche

Das Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop, das immer nur ein Teil des Präparats beleuchtet und erst durch Summation der optischen Schnittbilder mit hohem Kontrast das endgültige Produkt konstruiert wird. Somit kann die konfokale Mikroskopie durch serielle und partielle Fluoreszenz-Aufnahmen das Vorhandensein oder die Expression von mit fluoreszierenden Antikörpern gelabelten Stoffen oder Zellen sichtbar machen. Die Analyse der mit der Konfokalmikroskopie erfassten Daten in meiner Dissertation erfolgte durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee.

Zur Versuchsvorbereitung wurde eine Mikrotiterplatte mit 24 Nöpfchen mit 24 Deckgläschen, die zuvor mit 70%igem Ethanol gesäubert wurden, bestückt. Die Mikrotiterplatte wurde, wie in Abbildung 6 beschrieben, befüllt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Nöpfchen belief sich auf 150 µl damit die Deckgläschen komplett bedeckt sind. Die Verdünnung der Reagenzien, BSA [1%] als Negativkontrolle, Kollagen [100 µg/ml] als Positivkontrolle, JAM-A D1 [10 µg/ml], JAM-A D1D2 [30 µg/ml] wurde mit PBS Ca²⁺ vorgenommen.



Abbildung 6: Mikrotiterplatte Konfokalmikroskopie Thrombozyten Adhäsion.

Am zweiten Versuchstag wurde nach der Isolation von washed platelets, wie in 2.3.1 vorbeschrieben, zuerst die Flüssigkeit aus den Nöpfchen abgezogen und dann 150 µl entsprechend ca. $1-2 \times 10^6$ Thrombozyten pro Nöpfchen (Verdünnung mit PBS Ca²⁺) zugegeben und für mindestens eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser ersten Inkubationszeit wird die Flüssigkeit wieder entfernt, alle Kammern mit 500 µl PBS unter schwenkenden Bewegungen gewaschen und mit 150 µl 2 %igem PFA fixiert und das PFA nach jeweils 20 min Fixationszeit bei RT wieder abgenommen. Nach einem Waschgang mit 300 µl PBS pro Nöpfchen wurden die adhärenenten Thrombozyten mit jeweils 150 µl 0,3%igem Triton X-100 und einer Einwirkdauer von 10 min bei RT permeabilisiert. Im nächsten Schritt wurde die gesamte Flüssigkeit abpipettiert und ein Waschgang mit 300 µl PBS mit 0,3%igem Triton X-100 + 0,1 % Tween-20 eingelegt. Zur Blockierung wurde dann jeweils 150 µl PBS mit 1 % BSA verwendet und nach 1h Inkubationszeit bei RT erneut abgenommen. Zuletzt wurden jeweils 150 µl des primären anti-Tubulin Antikörpers (Verdünnung 1:100 in PBS mit 1% BSA + 0,3% Triton X-100), der gegen Tubulin gerichtet ist, und das Phalloidin

Alexa Fluor-488 (Verdünnung 1:300 in PBS mit 1% BSA + 0,3% Triton X-100), das gegen Aktin gerichtet ist, zugegeben und die Mikrotiterplatte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C belassen

Der dritte Versuchstag wurde vollständig durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee ausgeführt. Die Thrombozyten wurden mit den entsprechenden sekundären fluoreszierenden Antikörpern versehen. Abschließend wurden die Deckgläschen auf sauberen Objektträgern mit fluorescent mounting medium (Dakro) beschichtet, in eine Mappe einsortiert und vor der weiteren Analyse bei 4°C und unter Lichtabschluss aufbewahrt. In diesem Zustand können die Objektträger etwa einen Monat verweilen.

Die Bilder wurden durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee mit einem konfokalen Laserscan - Mikroskop (LSM 510 Meta, Axioplan 2 Imaging Confocal von Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen und mit der Software ZEN lite (Version 2012) analysiert. Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt (n=3).

2.3.8 GloMax®: Thrombozyten Adhäsion auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche

GloMax® ist ein Photometer, mit dem unter anderem die Fluoreszenz, die von mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen ausgeht, gemessen und quantifiziert werden kann. Dadurch können Rückschlüsse auf die sich präsentierende Zellzahl gezogen werden.

Zur Versuchsvorbereitung wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen, wie in Abbildung 7 beschrieben, bestückt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Nöpfchen betrug 25 µl. BSA 1 % wurde als Negativ-Kontrolle und Kollagen [100 µg/ml] als Positiv-Kontrolle verwendet.

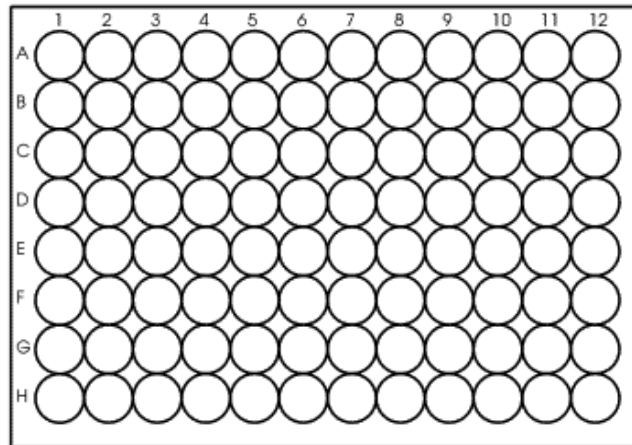


Abbildung 7: Mikrotiterplatte Photometer Thrombozyten Adhäsion. Reihe 1-2 BSA [1%], Reihe 3-4 Kollagen [100 µg/ml], Reihe 5-8 JAM-A D1 [10 µg /ml], Reihe 9-12 JAM-A D1D2 [30 µg /ml]

Am Versuchstag wurden zuerst Thrombozyten isoliert (siehe 2.3.1 Herstellung von washed platelets) und diese anschließend mit dem Fluoreszenzmarker 5-(6)-CFDA [10 µM] markiert und für 10 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach der Resuspension der gelabelten Thrombozyten in PBS und einer Zentrifugation bei 2100 rpm mit Bremse für 5 min wurde der Überstand verworfen, die Zellen in PBS Ca^{2+} gelöst und mit Hilfe des Sysmex die Thrombozytenzahl festgestellt. Jedes Näpfchen wurde nach Abnahme der darin befindlichen Flüssigkeit mit $0,1 \times 10^6$ Thrombozyten (in einem Volumen von 30 µl resuspendiert) versehen, die zuvor jeweils zu einem Drittel unbehandelt oder mit einem blockierenden Antikörper gegen JAM-A-F11R/antiJAM-A [10 µg/ml] oder mit seiner Kontrolle IgG goat [10 µg/ml] für 30 min bei RT und Dunkelheit inkubiert waren (siehe Abbildung 7 Reihe A-D/5-12 Thrombozyten+IgG, Reihe E-H/5-12 Thrombozyten+antiJAM-A). Die Thrombozyten wurden nun für 1 h bei RT und Dunkelheit in der mit BSA, Kollagen oder JAM-A beschichteten Oberfläche der Mikrotiterplatte inkubiert, bevor die gesamte Flüssigkeit abgenommen wurde und die Näpfcchen vorsichtig mit jeweils 100 µl PBS Ca^{2+} zweimal gewaschen wurden, um die nicht-adhärenenten Thrombozyten zu entfernen. Abschließend wurden 100 µl PBS Ca^{2+} pro Näpfchen zugegeben und die Intensität des Fluoreszenzsignals von adhärenenten Thrombozyten entschlüsselt, indem die Platte in einem Photometer (GloMax®) bei einer Wellenlänge von 460 nm EX und 515-575 nm EM gelesen und analysiert wurde [28, 78]. Es wurden 7 unabhängige Experimente durchgeführt (n=7).

2.3.9 Durchflusszytometrie: Thrombozyten Aktivierung und Degranulierung

Die Thrombozyten Aktivierung und Degranulation kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen werden. Das Verfahren wird unter 2.3.3 genauer beschrieben. Der Aktivierungsgrad wird über die α IIb β 3-Integrin-Aktivierung auf Thrombozyten durch PAC-1-Bindung bestimmt. Die Thrombozyten Degranulation von α -Granula wird über die Expression von CD62P (P-Selektin) dargestellt.

Zu Beginn wurde plättchenreiches Plasma (PRP) von gesunden, menschlichen Probanden hergestellt (siehe 2.3.1). Die zwei Versuchsreihen zur Untersuchung der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytendegranulation wurden immer doppelt angelegt und sind mit dem Pipettierschema in Tabelle 6 aufgezeigt. Das Gesamtvolumen pro FACS-Röhrchen betrug 50 μ l und wurde bei Bedarf mit PBS Ca²⁺ aufgefüllt. In jedes FACS-Röhrchen wurden zunächst 10⁶ Thrombozyten und zur Analyse der Thrombozytenaktivierung 5 μ l des Fluoreszenzantikörpers Anti-Human CD62P-FITC oder zur Analyse der Thrombozytendegranulation 5 μ l des Fluoreszenzantikörpers PAC-1 FITC verteilt. Als nächstes wurden die Zellen für 30 min bei RT und unter Lichtabschluss mit antiJAM-A [10 μ g/ml], IgG goat [10 μ g/ml] oder ohne Zusatz inkubiert, bevor sie erneut für 30 min bei RT und unter Lichtabschluss mit JAM-A D1 [10 μ g/ml] oder JAM-A D1D2 [30 μ g/ml] belassen wurden. Der Thrombozytenagonist TRAP [25 μ M] wurde schließlich allen Proben hinzu gegeben und wie zuvor für 30 min bei RT und unter Lichtabschluss inkubiert. Im letzten Schritt und am Ende der Inkubationszeit wurden die Proben mit jeweils 300 μ l PFA 0,5 % fixiert und zügig auf die CD62P - Oberflächenexpression oder PAC-1-Bindung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte durch das Datenverarbeitungsprogramm FACScan des Geräteherstellers (BD CellQuest Pro Software) [174]. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt (n=5).

Tabelle 6: Thrombozyten Aktivierung und Degranulation, Pipettierschema 50 µl System

| Sets [µl] | PBS Ca ²⁺ | antiCD62P/ PAC1-FITC | PRP | IgG goat | anti JAM-A | JAM-A D1 | JAM-A D1D2 | ADP | TRAP |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----|-------------|---------------|-------------|---------------|-----|------|
| Resting | 40 | 5 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| TRAP | 35 | 5 | 5 | - | - | - | - | - | 5 |
| IgG+JAM-A D1 +TRAP | 25 | 5 | 5 | 5 | - | 5 | - | - | 5 |
| IgG+JAM-A D1D2+TRAP | 25 | 5 | 5 | 5 | - | - | 5 | - | 5 |
| antiJAM-A+ JAM-A D1 +TRAP | 25 | 5 | 5 | - | 5 | 5 | - | - | 5 |
| antiJAM-A+ JAM-A D1D2 +TRAP | 25 | 5 | 5 | - | 5 | - | 5 | - | 5 |

2.3.10 Multielektroden-Impedanzaggregometrie (Multiplate®): Thrombozyten

Aggregation

Mit dem Multiplate® Analyzer wird die Diagnostik der zellulären Gerinnung durch eine schnelle Analyse der Thrombozytenfunktion im Vollblut auf Basis der Impedanzaggregometrie durchgeführt. Die Parallelbestimmung von zwei unabhängigen Sensorpaaren, die in eine Blutprobe getaucht werden, dient der Qualitätskontrolle. Die durch ein Stimulationsreagens aktivierten Thrombozyten heften sich an die silberbeschichteten Sensordrähte an, aggregieren und ändern damit den bestehenden elektrischen Widerstand bzw. die Impedanz zwischen den Drähten. Diese Widerstandsänderungen werden während der Analyse kontinuierlich aufgezeichnet. Somit können Aussagen zur Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen getroffen werden.

Bei einem freiwilligen, gesunden und medikamentenfreien Spender wird Blut in hirudinisierte Röhrchen zur Durchführung der TRAP-induzierten Aggregation abgenommen. In je einem Eppendorf-Gefäß (1 ml) wird 300 µl auf 37°C angewärmtes PBS Ca²⁺ zusammen mit 300 µl Blut mit den Zusätzen wie in Tabelle 7 beschrieben inkubiert. Zuerst wird das Blut mit antiJAM-A [10 µg/ml] oder der Antikörper Kontrolle IgG goat [10 µg/ml] für 15 min bei RT inkubiert und im Anschluss mit JAM-A D1 [10 µg/ml] oder JAM-A D1D2 [30 µg/ml] für 30 min bei RT belassen. Anschließend wurde das inkubierte Blut in je eine Messzelle gegeben, diesem Gemisch nach 3 min den

Thrombozyten aktivierenden Zusatzstoff TRAPtest [10 μ M] hinzu pipettiert, um die Aggregation und das Testverfahren mit einer Laufzeit von 6 min zu starten. Die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) wurde als Maß für die gesamte Thrombozytenaggregation [174] verwendet. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt (n=5).

Tabelle 7: Thrombozyten Aggregation, Pipettierschema

| Set 1 | Set 2 | Set 3 | Set 4 | Set 5 |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 300 μ l Blut | 300 μ l Blut | 300 μ l Blut | 300 μ l Blut | 300 μ l Blut |
| 300 μ l PBS Ca ²⁺ | 300 μ l PBS Ca ²⁺ | 300 μ l PBS Ca ²⁺ | 300 μ l PBS Ca ²⁺ | 300 μ l PBS Ca ²⁺ |
| - | IgG goat [10 μ g/ml] | antiJAM-A [10 μ g/ml] | IgG goat [10 μ g/ml] | antiJAM-A [10 μ g/ml] |
| - | JAM-A D1 [10 μ g/ml] | JAM-A D1 [10 μ g/ml] | JAM-A D1D2 [30 μ g/ml] | JAM-A D1D2 [30 μ g/ml] |

2.3.11 Flusskammer: ex vivo Thrombusformation

Die Formation eines Thrombus aus Thrombozyten lässt sich optimal mit der Methode der Flusskammer untersuchen. Thrombozyten werden mit einer kontinuierlichen Flussrate über ein mit Kollagen beschichtetes Deckgläschen geführt und anschließend die Thrombusformation unter dem Mikroskop beobachtet. Unter der speziell ausgewählten Flussrate, die der arteriellen Scherrate entspricht, können ähnliche Bedingungen wie im arteriellen Gefäßsystem im menschlichen Körper hergestellt werden.

Zur Versuchsvorbereitung wurden Deckgläschen mit jeweils 300 μ l Kollagen [100 μ g/ml] in einem, mit einem Fettstift mittig des Deckgläschens ca. 3 cm abgegrenzten Bereich beschichtet und diese bei 4°C über Nacht gelagert. Um die Deckgläschen folgend zu blockieren, wurde jeweils 300 μ l BSA 1 % für 30 min auf, den mit Kollagen beschichteten Bereich gegeben. Nun konnte der Aufbau der Flusskammer, wie bereits in 2.3.6 beschrieben, und die Blutabnahme eines freiwilligen und gesunden Spenders in CPDA-Röhrchen erfolgen. Die Versuchsreihen/Sets sind in Tabelle 8 abgebildet und jeweils doppelt angelegt. Das Blut wurde anschließend entsprechend des Pipettierschemas in Tabelle 8 in Eppendorf - Gefäße (1 ml) pipettiert und zuerst mit dem blockierenden antiJAM-A Antikörper [10 μ g/ml] oder der entsprechenden IgG goat

Kontrolle [10 µg/ml] und danach mit JAM-A D1 [10 µg/ml] oder JAM-A D1D2 [30 µg/ml] versehen und bei RT für jeweils 30 min inkubiert. Das Gesamtvolumen pro perfundiertem Set betrug 1ml und wurde mit PBS Ca²⁺ aufgefüllt.

Tabelle 8: Thrombusformation, Pippetierschema

| Set 1 | Set 2 | Set 3 | Set 4 | Set 5 |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 900 µl Blut | 900 µl Blut | 900 µl Blut | 900 µl Blut | 900 µl Blut |
| 100 µl PBS Ca ²⁺ | IgG goat [10 µg/ml] | antiJAM-A [10 µg/ml] | IgG goat [10 µg/ml] | antiJAM-A [10 µg/ml] |
| - | JAM-A D1 [10 µg/ml] | JAM-A D1 [10 µg/ml] | JAM-A D1D2 [30 µg/ml] | JAM-A D1D2 [30 µg/ml] |

Bevor der Flusskammer Versuch gestartet werden konnte, musste die Fettstift-Linie auf den Deckgläschen mittig unterbrochen werden, damit das Blut über die Kollagenschicht fließen konnte. Das Deckgläschen wurde mit dem Plexiglasbau mit Kontakt der Durchflussrinne (Rinntiefe 50 µm) mit dem Kollagen bedeckt und in den Metallrahmen fest eingespannt. Bevor nun das Blut durch die transparente Flusskammer perfundiert, muss diese mit auf 37°C angewärmten PBS Ca²⁺ Puffer sorgfältig durchgespült werden, damit alle Luftblasen aus der Flusskammer entfernt werden. Die mit 1 ml vorbehandeltem Blut befüllte Spritze wird in den Perfusor eingelegt und mit einem Schlauch mit der Flusskammer verbunden. Nun wird die bestückte Flusskammer unter das Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200 von Zeiss gelegt, das 20er-Objektiv eingestellt, die Software Axio Vision gestartet und die Schwarz-Weiß-Kamera AxioCamMR eingestellt. Der Blutfluss wurde mit einer kontinuierlichen Laufrate von 12,86 ml/h, die dem gewünschten arteriellen Scheerstress von 1700s⁻¹ entspricht, für 4 min gestartet. Nach dem Lauf der Flusskammer mit dem vorbehandelten Vollblut wurde eine 10 ml Spritze mit PBS Ca²⁺ als Waschgang unter einem Fluss von 7,53 ml/h für ca. 1 min angehängt um das noch verbliebene Blut in der Flusskammer zu beseitigen und die Sicht zu verbessern.

Zur Dokumentation wurden danach mindestens 6 Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie Fotos von zufällig ausgewählten, mikroskopischen Bereichen aufgenommen und unter dem Originalformat .zvi in der Axio-Vision-Software abgespeichert, damit die Größeninformationen für die spätere Auswertung erhalten

bleiben. Abschließend wurde die Flusskammer deinstalliert und alle Bestandteile mit PBS ordentlich gereinigt, bevor der Versuch fortgesetzt werden konnte. Zur Datenanalyse wurde die Software AxioVision von Carl Zeiss verwendet, um die Flächen der sich gebildeten Thromben zu berechnen [181]. Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt (n=3).

2.3.12 Durchflusszytometrie: Thrombozyten Funktionalität und ihre prokoagulatorische Wirkung

Zur Evaluierung der Funktionalität der Thrombozyten mit ihrer prokoagulatorischen Wirkung wurde die Methode der Durchflusszytometrie genutzt, die unter 2.3.3 genauer erklärt ist. Der Effekt von sJAM-A konnte hierbei auf zwei Weisen beobachtet werden: die Phosphatidylserin-Externalisierung wird durch Bindung von AnnexinV evaluiert und die TMRE-Fluoreszenz, die die mitochondriale Membrandepolarisation ($\Delta\psi_m$) detektiert.

Anfangs stand die Herstellung von PRP (siehe 2.3.1) von gesunden Probanden. Die Versuchsreihen wurden jeweils doppelt angelegt und sind mit dem Pipettierschema in Tabelle 9 dargestellt. Das Gesamtvolumen pro FACS-Röhrchen betrug 50 μl und wurde bei Bedarf mit PBS Ca^{2+} aufgefüllt. In jedes FACS-Röhrchen wurden zuerst 10^6 Thrombozyten pipettiert und anschließend laut Pipettierschema (siehe Tabelle 9) zuerst mit antiJAM-A [10 $\mu\text{g/ml}$] oder der Kontrolle IgG goat [10 $\mu\text{g/ml}$] für 15 min und danach mit JAM-A D1 [10 $\mu\text{g/ml}$] oder JAM-A D1D2 [30 $\mu\text{g/ml}$] für 30 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde bei der Hälfte der Versuchsreihen der bekannte Thrombozytenagonist und Apoptosestimulator TRAP [25 μM] hinzugefügt und erneut eine Inkubation von 1 h bei RT vorgenommen. Zuletzt wurde das Gemisch der einen Hälfte der Versuchsreihen mit 5 μl des Fluoreszenzantikörpers AnnexinV und die andere Hälfte mit 5 μl des Fluoreszenzantikörpers TMRE [25 μM] für 30 min in Dunkelheit bei RT inkubiert, bevor pro FACS-Röhrchen 300 μl PBS Ca^{2+} hinzu pipettiert wurde. Jetzt konnten die Analyse mit dem Durchflusszytometer und die Auswertung durch das Datenverarbeitungsprogramm FACScan des Geräteherstellers (BD CellQuest Pro Software) stattfinden [85, 182]. Es wurden 6 unabhängige Experimente durchgeführt (n=6).

Tabelle 9: Thrombozyten Apoptose, Pipettierschema 50 µl System

| Sets | PBS Ca ²⁺ | PRP | IgG goat | anti JAM-A | JAM-A D1 | JAM-A D1D2 | TRAP |
|----------------------------|----------------------|-----|----------|------------|----------|------------|------|
| Resting | 45 | 5 | - | - | - | - | - |
| IgG+JAM-A D1 | 35 | 5 | 5 | - | 5 | - | - |
| IgG+JAM-A D1D2 | 35 | 5 | 5 | - | - | 5 | - |
| antiJAM-A+JAM-A D1 | 35 | 5 | - | 5 | 5 | | - |
| antiJAM-A+JAM-A D1D2 | 35 | 5 | - | 5 | -- | 5 | - |
| TRAP | 40 | 5 | - | - | - | - | 5 |
| IgG+JAM-A D1+TRAP | 30 | 5 | 5 | - | 5 | - | 5 |
| IgG+JAM-A D1D2+TRAP | 30 | 5 | 5 | - | - | 5 | 5 |
| antiJAM-A+JAM-A D1 +TRAP | 30 | 5 | - | 5 | 5 | - | 5 |
| antiJAM-A+JAM-A D1D2 +TRAP | 30 | 5 | - | 5 | - | 5 | 5 |

2.3.13 Durchflusszytometrie: Thrombozyten – Monozyten - Aggregatbildung

Der Einfluss von sJAM-A auf die Aggregation von Monozyten und Thrombozyten kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie experimentell erforscht werden. Dazu werden die Zellen mit dem Monozytenfluoreszenzmarker anti-CD14 APC und dem Thrombozytenfluoreszenzmarker CD42b FITC gelabelt.

Zur Versuchsvorbereitung werden Monozyten, wie in 2.3.2 beschrieben, und PRP, wie in 2.3.1 beschrieben, isoliert. Die Monozyten wurden bei 37 °C in RPMI-Medium bis zu ihrem Einsatz aufbewahrt. Die Versuchsreihen wurden doppelt angelegt und sind mit dem Pipettierschema in Tabelle 10 dargestellt. Das Gesamtvolumen pro FACS-Röhrchen betrug 50 µl und wurde bei Bedarf mit PBS Ca²⁺ aufgefüllt. In jedes FACS-Röhrchen wurden zuerst 0,5 x 10⁶ Monozyten und 3 x 10⁶ Thrombozyten pipettiert und die Zellen anschließend laut Pipettierschema zuerst mit antiJAM-A [10 µg/ml] oder IgG goat [10 µg/ml] für 30 min und danach mit JAM-A D1 [10 µg/ml] oder JAM-A D1D2 [30 µg/ml] für 1 h bei RT inkubiert. Während der letzten 30 min der Inkubationszeit der Proteine wurden 5 µl CD42b FITC und 10 µl anti-CD14 APC hinzugefügt und die Inkubation anschließend unter Lichtabschluss fortgeführt. Am Ende werden pro FACS-Röhrchen die Zellen mit 300 µl PFA 1% fixiert, um letztendlich die FACS Analyse

starten zu können. Die Datenauswertung erfolgte durch das Datenverarbeitungsprogramm FACScan des Geräteherstellers (BD CellQuest Pro Software). Es wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt (n=4).

Tabelle 10: FACS Thrombozyten – Monozyten Aggregatbildung, Pipettierschema 50 µl System

| Set 1 | Set 2 | Set 3 | Set 4 | Set 5 |
|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ |
| PRP | PRP | PRP | PRP | PRP |
| Monozyten | Monozyten | Monozyten | Monozyten | Monozyten |
| - | IgG goat [10µg/ml] | antiJAM-A [10µg/ml] | IgG goat [10µg/ml] | antiJAM-A [10µg/ml] |
| - | JAM-A D1 [10µg/ml] | JAM-A D1 [10µg/ml] | JAM-A D1D2 [30µg/ml] | JAM-A D1D2 [30µg/ml] |

2.3.14 Durchflusszytometrie: Thrombozyten Phagozytose durch Monozyten

Um die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten zu untersuchen, wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewendet (siehe 2.3.3). Wichtig ist hierbei, dass ausschließlich die Monozyten, die Thrombozyten phagozytiert haben, zur Darstellung kommen. Um die Phagozytose aufzeigen zu können, werden die Thrombozyten mit dem Thrombozytenfluoreszenzmarker CD42b FITC markiert. Durch die Trypan Blue Färbung können die phagozytierten Thrombozyten indirekt sichtbar gemacht werden.

Die Vorbereitung des Experiments beginnt mit der Monozytenisolation (siehe 2.3.2) und Isolation von gewaschenen Thrombozyten (siehe 2.3.1). Die Monozyten wurden bis zu ihrem Gebrauch bei 37°C in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS und 1% Pen. Strep. zurück gestellt. Die Versuchsreihen wurden doppelt angelegt und sind zusammen mit dem Pipettierschema in Tabelle 11 aufgezeigt. Das Gesamtvolumen pro FACS-Röhrchen betrug 50 µl und wurde bei Bedarf mit PBS Ca²⁺ aufgefüllt. Das Verhältnis von Monozyten zu Thrombozyten sollte ca. 1:200 betragen. Zu Beginn wurde in jedes FACS-Röhrchen 10 x 10⁶ Thrombozyten pipettiert und die Zellen folgend laut Pipettierschema zuerst mit antiJAM-A-F11R-Antikörper [10 µg/ml] oder der entsprechenden Kontrolle IgG goat [10 µg/ml] für 30 min und danach mit JAM-A

D1 [10 µg/ml] oder JAM-A D1D2 [30 µg/ml] für 1 h bei RT inkubiert. Nach den ersten abgelaufenen 30 min der Inkubationszeit der Proteine wurden die Thrombozyten mit jeweils 5 µl des thrombozytenspezifischen Markers CD42b-FITC markiert und die Inkubation anschließend unter Lichtabschluss fortgeführt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 5×10^4 Monozyten pro FACS-Röhrchen mit anschließender Inkubation von 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank, bevor schließlich die Zellen mit jeweils 300 µl PFA 1 % fixiert wurden. Die Datenanalyse mittels Durchflusszytometer verlief in zwei Runden; die erste Runde ohne Zusatz und die zweite Runde mit Zugabe von 20 µl Trypan Blue pro FACS-Röhrchen. Mit Trypan Blue wurde die Oberflächenfluoreszenz von adhärenenten aber nicht phagozytierten Thrombozyten abgefangen. Die Analyse und Auswertung mit dem Datenverarbeitungsprogramm FACScan des Geräteherstellers erfolgte dann auf CD42b+ Monozytenpopulationen, die phagozytierte Thrombozyten aufweisen und daher nur intrazelluläre Signale abgeben. Die phagozytotische Aufnahme von Thrombozyten wurde als % der CD42b+ Monozyten ausgewertet [28]. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt (n=5).

Tabelle 11: Thrombozyten Phagozytose durch Monozyten, Pipettierschema 50 µl System

| Set 1 | Set 2 | Set 3 | Set 4 | Set 5 |
|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ | PBS Ca ²⁺ |
| Thrombozyten | Thrombozyten | Thrombozyten | Thrombozyten | Thrombozyten |
| - | IgG goat [10 µg/ml] | antiJAM-A [10 µg/ml] | IgG goat [10 µg/ml] | antiJAM-A [10 µg/ml] |
| - | JAM-A D1 [10 µg/ml] | JAM-A D1 [10 µg/ml] | JAM-A D1D2 [30 µg/ml] | JAM-A D1D2 [30 µg/ml] |
| CD42b-FITC | CD42b-FITC | CD42b-FITC | CD42b-FITC | CD42b-FITC |
| Monozyten | Monozyten | Monozyten | Monozyten | Monozyten |

2.3.15 Thrombozyten-Monozyten – Cokultur: Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen

Um eine Monozyten-Thrombozyten Cokultur in einer 24-well Mikrotiterplatte anlegen zu können, muss jeder Arbeitsschritt steril ablaufen. Zunächst wurden dazu gewaschene Thrombozyten und Monozyten isoliert (siehe 2.3.2 und 2.3.1). Das Verhältnis von Monozyten zu Thrombozyten pro Nöpfchen wurde auf 1:200

entsprechend 50.000 Monozyten : 10.000.000 Thrombozyten gewählt. Das Gesamtvolumen pro Nöpfchen betrug 200 μl und wurde mit complete RPMI 1640-Medium (RPMI 1640-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 10% FBS und 1% Pen.Strep) bei Bedarf aufgefüllt. Die gewaschenen Thrombozyten wurden in PBS, die Monozyten in complete RPMI 1640-Medium resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt (Monozyten [1000/ μl], Thrombozyten [20.000/ μl]). Alle sonstigen Lösungen wurden mit complete RPMI 1640-Medium hergestellt. Die Thrombozyten wurden zuerst mit dem blockierenden Antikörper gegen JAM-A [10 $\mu\text{g/ml}$] oder mit der entsprechenden IgG goat Kontrolle [10 $\mu\text{g/ml}$] oder ohne Zusatz für 30 min bei RT und darauf folgend mit JAM-A D1 [10 $\mu\text{g/ml}$] oder JAM-A D1D2 [30 $\mu\text{g/ml}$] für 1 h bei RT inkubiert. Zuletzt wurden die Monozyten hinzugegeben und die bestückte Mikrotiterplatte (siehe Abbildung 8) bei 37°C für 10 Tage im Brutschrank kultiviert [28].

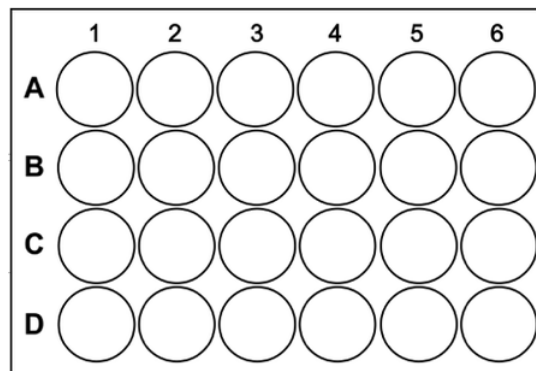


Abbildung 8: Mikrotiterplatte Monozytendifferenzierung. In jedem Nöpfchen 10×10^6 Thrombozyten, 50×10^3 Monozyten und zusätzlich Reihe 1 ohne Zusatz, Reihe 2 JAM-A D1, Reihe 3 JAM-A D1D2, Reihe 4 antiJAM-A +JAM-A D1, Reihe 5 antiJAM-A + JAM-A D1D2, Reihe 6 A+B IgG+JAM-A D1, Reihe 6 C+D IgG+JAM-A D1D2.

Um die Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen zu analysieren wurde die Monozyten-Thrombozyten Cokultur, wie oben beschrieben, angelegt und anstelle von 10 Tagen Inkubationszeit, wie bei der Analyse der Makrophagendifferenzierung, eine Inkubationszeit von 15 Tage gewählt. Zur Identifikation der Schaumzellen wurde die Oilred-Färbemethode verwendet. Dazu wurde zuerst die Stammlösung, bestehend aus 0,5 g gelöstem Oil Red O Pulver in 100 ml 98%igem Isopropanolol, hergestellt, um

daraus die Gebrauchslösung, 6 ml Stammlösung mit 4 ml Aqua verdünnt, zu gewinnen, zu filtrieren und für 24 h ruhen zu lassen. Zur Färbung wird die Flüssigkeit in den Näpfchen abgezogen und die Zellen anschließend mit jeweils 300 µl PFA 4% pro Näpfchen für 5 min fixiert. Folgend wird die Flüssigkeit erneut abgezogen und die Näpfchen mit jeweils 300 µl PBS für 5 min inkubiert und danach gewaschen. Nach 3 minütigem Einlegen der Zellen in jeweils 100 µl 50 %igem Isopropanolol werden die Zellen mit jeweils 300 µl der Oilred - Gebrauchslösung für 10 min eingefärbt. Zum Schluss wurde die Mikrotiterplatte noch einmal mit 50 %igem Isopropanolol gespült und mit Aqua dest. ausgewaschen.

Nach 10/15 Tagen Inkubationszeit konnte die Analyse der Monozytendifferenzierung in Makrophagen und Schaumzellen unter dem Mikroskop bei einem 20x Objektiv visualisiert und aus jeweils 4 verschiedenen optischen Feldern der einzelnen Näpfchen der Versuchsreihen als Fotoformat gespeichert werden. Die Bildanalyse und das Auszählen der sich entwickelten und ausdifferenzierten Makrophagen und Schaumzellen erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software. Es wurden 10 unabhängige Experimente zur Differenzierung in Makrophagen und 5 unabhängige Experimente zur Differenzierung in Schaumzellen durchgeführt (n=10 Makrophagendifferenzierung, n=5 Schaumzellendifferenzierung).

2.3.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc. USA). Die Datenanalyse wurde nach dem Test auf Normalverteilung bei normalverteilten Ergebnissen mit einem t-Test oder einer einfaktoriellem Varianzanalyse (1-way ANOVA) mit Tukey post-hoc Test durchgeführt. In den Abbildungen wird die Signifikanz mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$), der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts als SEM (Mittelwert \pm SEM) sowie n als Anzahl der durchgeführten Experimente dargestellt. P-Werte von $< 0,05$ galten als statistisch signifikant in einem 95 % Konfidenzintervall, von $< 0,001$ als hochsignifikant. Ergebnisse der Durchflusscytometrie Experimente werden als MFIs (Mittlere Fluorescence Intensität) mittels den Medianwerten mit 25. und 75. Perzentile angegeben.

Die klinischen Daten (Mittelwert \pm SEM) wurden mit dem Softwareprogramm SPSS Version 21.0 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ausgewertet. Der Vergleich nicht normalverteilter Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines nicht parametrischen Testverfahrens, dem Mann-Whitney U Test. Spearman's rank Korrelationskoeffizient (ρ) wurde zur Analyse der Korrelation von nicht normalverteilten Ergebnissen und Pearson's Korrelationkoeffizient (r) zur Analyse von normalverteilten Ergebnissen herangezogen. Die statistische Analyse zu Korrelationen wurde von Herrn Dr. Dominik Rath durchgeführt.

3. Ergebnisse

Durch Vorarbeiten ist bekannt, dass der transmembrane Rezeptor JAM-A/JAM1/F11R bei zahlreichen Prozessen wie der Hämostase und Zellphysiologie, jedoch auch bei pathophysiologischen Vorgängen wie Thrombose, Inflammation und Atherosklerose, beteiligt ist [128, 129, 136, 140, 144–146, 148–152, 154, 156, 163, 164, 168, 169].

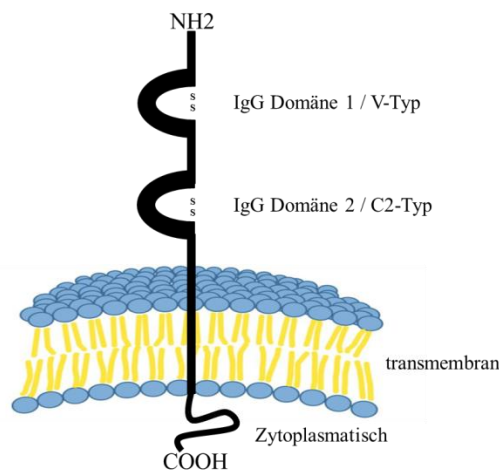


Abbildung 9: Das JAM-A/JAM1/F11R Molekül mit 2 IgG-ähnlichen Domänen. Die proximale Membrandomäne C2 = D2 und die distale Membrandomäne V = D1 (nach Ebnet et al. [130]).

Das auf der Zellmembran exprimierte Adhäsionsmolekül JAM-A/JAM1/F11R besitzt distal der Transmembrankomponente zwei IgG-ähnliche Domänen, die als D1 und D2 bezeichnet werden (Abbildung 9) [40].

Die lösliche Form sJAM-A entsteht nach Abspaltung des extrazellulären Parts des Adhäsionsrezeptors, zirkuliert im Blutkreislauf und wurde vermehrt bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Inflammation, Atherosklerose, KHK und Hypertension detektiert [151, 152, 154–157, 163, 164, 166–169]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass sJAM-A diese Pathologien und seine Akteure, wie die Thrombozyten beeinflusst, was bisher jedoch experimentell noch nicht validiert wurde.

Das primäre Ziel dieser Studie war es somit den Effekt von sJAM-A auf die thrombotische und hämostatische Funktion der Thrombozyten zu überprüfen sowie zu untersuchen, wie sJAM-A das thromboinflammatorische Potential dieser Zellen beeinflusst.

Um die Auswirkungen von sJAM-A auf die Thrombozytenfunktionen und Interaktionen mit anderen Zellen wie Endothelzellen und Monozyten zu erforschen, kamen neben Methoden zur funktionellen Untersuchung von Thrombozyten, multiple Zellformen (HUVEC, Thrombozyten, Monozyten), die Anlage von Zellkulturen und eine Färbemethode mit Oilred O zum Einsatz. Durch Verwendung eines antiJAM-A Antikörpers konnte das JAM-A/JAM1/F11R Molekül blockiert werden.

Zur Identifikation der funktionellen Komponente des Moleküls wurde zusätzlich zur kristallisierten nativen Form von JAM-A mit einer proximalen (D1) und einer distalen (D2) Membrandomäne, daher JAM-A D1D2 benannt, eine verkürzte Form des Moleküls mit nur einer der distalen Membrandomäne D1 ähnelnden Domäne, daher JAM-A D1 benannt, erzeugt und für alle Versuche verwendet. Die kristallographische Molekularstruktur von JAM-A D1 und JAM-A D1D2 wurde bereits von Stehle et al. beschrieben [183].

3.1 Die JAM-A/JAM1/F11R Expression ist unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert und kann zum sJAM-A Serumlevel beitragen

Das membranständige Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A/JAM1/F11R) wird bekanntermaßen auf der Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert [127, 128, 136–140].

Ziel des ersten Experimentes war es zu untersuchen, ob die JAM-A/JAM1/F11R Expression durch spezielle Bedingungen, wie eine inflammatorische Stimulation mit Zytokinen oder durch die Aktivierung mit Agonisten, beeinflusst werden kann.

Zuerst wurden dazu spezielle Endothelzellen, HUVECs, kultiviert und anschließend zum Teil in einem inflammatorischen Setting mit Zytokinen, wie TNF α und INF γ , aktiviert. Um die JAM-A/JAM1/F11R Expression mit der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie darstellen zu können, wurden die Zellen mit einem entsprechenden primären Antikörper gegen JAM-A/JAM1/F11R und nachträglich mit einem entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper gefärbt. Auf den Fotos der Konfokalmikroskopie in Abbildung 10 ist das Protein JAM-A/JAM1/F11R in einem leuchtenden Rot dargestellt.

Deutlich ist zu verzeichnen, dass inflammatorisch aktivierte Endothelzellen verstärkt das Adhäsionsmolekül JAM-A/JAM1/F11R auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Hierdurch konnte einerseits bestätigt werden, dass Endothelzellen JAM-A/JAM1/F11R auf ihrer Oberfläche in inaktivem, ruhendem Zustand exprimieren und diese Expression andererseits nach Aktivierung eklatant und unverkennbar gesteigert wird.

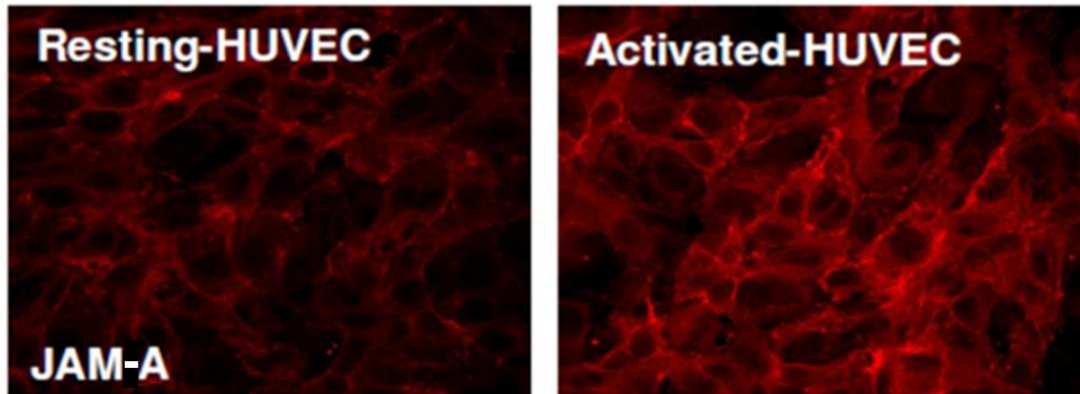


Abbildung 10: Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Endothelzelloberfläche. Das linke Foto zeigt die JAM-A/JAM1/F11R Expression inaktiver Endothelzellen (Resting-HUVEC), das rechte Foto weist eine verbesserte apikale Expression von JAM-A/JAM1/F11R (Alexa Fluor 647-in rot) auf Endothelzellen auf, die mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IFN γ behandelt wurden (Activated-HUVEC). Die Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängige konfokale immunfluoreszenzmikroskopische Analysen. Die Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen und die folgenden konfokalmikroskopischen Analysen wurden durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee durchgeführt.

Somit konnte eine gesteigerte JAM-A/JAM1/F11R Expression auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen nach Zytokinbehandlung verzeichnet werden.

Zur Analyse der Steigerungsmöglichkeit der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Thrombozytenoberfläche wurden isolierte Thrombozyten *in vitro* mit natürlichen Agonisten wie ADP (Adenosindiphosphat), CRP (collagen-related peptide) und TRAP (Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid) und einer Stimulationsdauer von 30 Minuten aktiviert und anschließend mit dem Durchflusszytometer die JAM-A/JAM1/F11R Expression mit Hilfe eines spezifischen fluoreszierenden Anti-JAM-A-FITC-Antikörpers gemessen. Der bekannte Thrombozytenagonist ADP wirkt über den thrombozytären Rezeptor P2Y1, P2Y12 und P2X1, CRP über den Kollagenrezeptor GP VI und TRAP bindet an den Thrombinrezeptor PAR-1 (protease-aktivierter Rezeptor) auf der Thrombozytenoberfläche [184–186].

Das signifikant gesteigerte Auftreten des JAM-A/JAM1/F11R Moleküls auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten ist durch die durchflusszytometrisch gemessenen MFI (Mean Fluorescence Intensity) des Anti-JAM-A-FITC Antikörpers nachgewiesen und in Abbildung 11 dargestellt. Um die JAM-A/JAM1/F11R Expression

auf aktivierten und inaktiven Thrombozyten vergleichen zu können, wurde der Versuch parallel mit unbehandelten Thrombozyten durchgeführt. Die inaktiven Thrombozyten weisen, wie vermutet, einen signifikant reduzierten JAM-A/JAM1/F11R Gehalt auf ihrer Oberfläche auf.

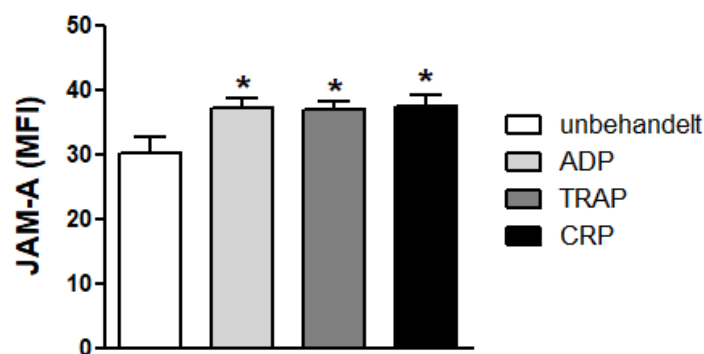


Abbildung 11: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur JAM-A/JAM1/F11R Expression auf aktivierten Thrombozyten (n=7). Dargestellt ist eine signifikante Verbesserung der Oberflächenassoziation von JAM-A/JAM1/F11R nach Thrombozytenaktivierung mit Agonisten wie ADP [100 μ M], TRAP [25 μ M] oder CRP [5 μ g/ml] im Vergleich zu ruhenden, inaktiven, unbehandelten Thrombozyten als Kontrolle. *(P<0,05) zeigt statistisch signifikante Unterschiede an. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten.

Als Kontrollmarker für die Thrombozytenaktivierung diente P-Selektin Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten durch die MFI des P-Selektin-FITC Antikörpers gemessen, der spezifisch an P-Selektin bindet. P-Selektin, auch CD62P genannt, existiert in der thrombozytären α -Granulamembran und wird nach Thrombozytenaktivierung und folgender Degranulation verstärkt auf der thrombozytären Zellmembran verzeichnet. Es dient der Interaktion zwischen aktiven Thrombozyten und Neutrophilen und unterstützt die Neutrophilenadhäsion an aktivierte Endothelzellen [187].

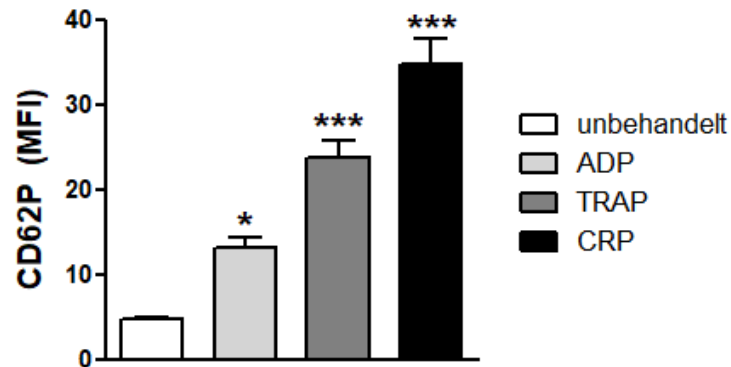


Abbildung 12: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur CD62P Expression auf aktivierten Thrombozyten (n=7). Dargestellt ist eine gesteigerte Oberflächenassoziation von CD62P nach Thrombozytenaktivierung mit Agonisten wie ADP, TRAP oder CRP im Vergleich zu ruhenden, inaktiven, unbehandelten Thrombozyten als Kontrolle. Die Signifikanz wird mit * $P < 0,05$ und *** $P < 0,001$ vs. unbehandelte oder ruhende Thrombozyten angegeben. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten.

Wie erwartet, konnte auch hier eine signifikante Steigerung der CD62P-Expression nach Aktivierung der Thrombozyten mit den gleichen natürlichen Agonisten in der gleichen Konzentration wie beim zu vergleichenden Versuch zur thrombozytären JAM-A/JAM1/F11R Expression aufgezeigt werden (Abbildung 11, Abbildung 12).

Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Expression von JAM-A/JAM1/F11R auf der Membranoberfläche von aktivierten Thrombozyten nach agonisteninduzierter Thrombozytenaktivierung gesteigert ist.

In einer klinischen Studie konnten wir ferner zeigen, dass die Oberflächenverfügbarkeit von JAM-A bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (AKS), differenziert in NSTEMI, STEMI und instabile AP, im Vergleich zu Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, auch stabile AP genannt (SAP) erhöht ist (Abbildung 13). Dazu wurde den Patienten kurz nach dem Eintreffen in die Klinik und vor allen Interventionen und medikamentösen Therapieformen Blut abgenommen und die Thrombozyten in dem Vollblut mit dem thrombozytenspezifischen Fluoreszenzmarker CD42b markiert und mit dem antiJAM-A FITC Antikörper versehen, um im letzten Schritt die JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche mit dem Durchflusszytometer zu analysieren. Die Baseline Charakteristika für das

Patientenkollektiv sind in Tabelle 12 abgebildet. Die Daten wurden von der TuePIC Datenbank bereitgestellt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde von der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Lydia Laptev durchgeführt.

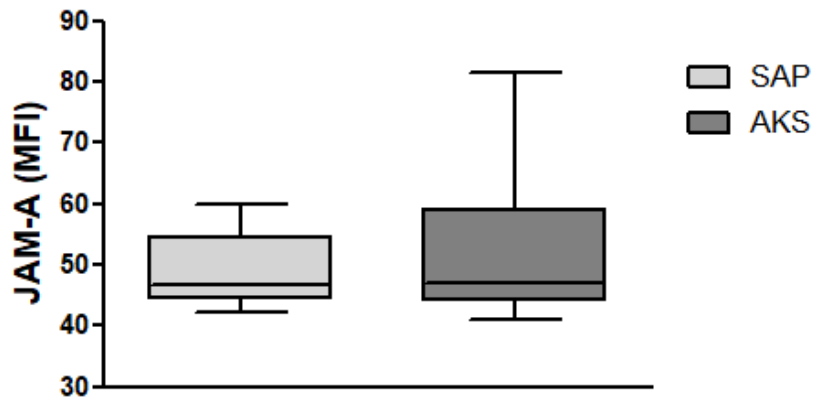


Abbildung 13: Boxplot Diagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten zur JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche von Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit SAP. Nachweis einer verstärkten thrombozytären Oberflächenassoziation von JAM-A bei Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit SAP. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm SEM bei einem Patientenkollektiv von insgesamt 80 Personen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Baseline Charakteristika des Patientenkollektivs

| Baseline Characteristics | |
|--|---------------------|
| No of patients | 80 |
| Male | 58 (72.5 %) |
| Female | 22 (27.5 %) |
| Age, years (mean±SD) | 66.7 (±11.9) |
| Groups | |
| Stable CAD | 15 (18.8 %) |
| Unstable CAD | 13 (16.3 %) |
| NSTEMI | 29 (36.3 %) |
| STEMI | 23 (28.8 %) |
| Cardiovascular risk factors | |
| Arterial Hypertension | 53 (67.1 %) |
| Hyperlipidemia | 30 (38.0 %) |
| Diabetes mellitus | 24 (30.4 %) |
| Family history | 14 (17.7 %) |
| Smoking | 24 (30.4 %) |
| Atrial fibrillation | 19 (24.1 %) |
| Medication on admission | |
| Acetylsalicylic acid | 32 (46.4 %) |
| Clopidogrel | 7 (10.1 %) |
| Prasugrel | 5 (7.2 %) |
| Ticagrelor | 2 (2.9 %) |
| Marcumar | 4 (5.8 %) |
| Xarelto | 5 (7.2 %) |
| Eliquis | 2 (2.5 %) |
| β-blockers | 46 (66.7 %) |
| Angiotensin-converting enzyme inhibitors | 34 (50.0 %) |
| Angiotensin II receptor antagonists | 9 (13.0 %) |
| Calcium Channel Blockers | 20 (29.4 %) |
| Statins | 34 (49.3 %) |
| Loop Diuretics | 4 (5.9 %) |
| Thiazide Diuretics | 14 (20.6 %) |
| Potassium-sparing Diuretics | 3 (4.4 %) |
| 2 or more Diuretics | 7 (10.3 %) |
| Functional parameters (mean±SD) | |
| LVEF (%) | 49.2 (±11.7) |
| Troponin (µg/l) | 17.3 (±39.7) |
| CRP (mg/dl) | 1.6 (±2.1) |
| CK(U/l) | 371.9 (±573.5) |
| Leucocytes (1/µl) | 11725.0 (±21753.9) |
| Platelets (1/µl) | 229828.3 (±71334.4) |
| GFR (ml/min) | 75.2 (±20.1) |

Nach bisheriger Kenntnis stammt die lösliche Form, das sJAM-A, vom membranständigen Adhäsionsrezeptor JAM-A/JAM1/F11R und wird von Metalloproteasen von der Zellmembran abgelöst und somit freigesetzt. Dieser Erkenntnis zufolge sind die Konzentrationen von zirkulierendem sJAM-A im Blut abhängig von der Expression des JAM-A auf der zellulären Oberfläche. JAM-A/JAM1/F11R wird auf Epithelzellen, Endothelzellen, aber auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen und zirkulierenden peripheren vaskulären Zellen wie Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert. Diese Zellen bilden somit eine potentielle Quelle für das zirkulierende sJAM-A.

Somit wurde eine Korrelationsanalyse zwischen membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R und zirkulierendem sJAM-A durchgeführt, um herauszufinden, ob membrangebundenes JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche eine potentielle Quelle für das zirkulatorische, gelöste sJAM-A darstellen könnte. Die statistische Analyse zur Korrelation erfolgte durch Herrn Dr. Dominik Rath.

Für diese Analyse wurde zudem der Serumspiegel von sJAM-A der Patienten untersucht. Nach der Blutabnahme der Patienten wurde zur sJAM-A Konzentrationsbestimmung ein ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) mit dem Human anti-JAM-A ELISA kit angefertigt. Der ELISA wurde von der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Ingrid Epple durchgeführt.

Ebenso wurde hier eine Erhöhung des Serumspiegels der löslichen Form des Adhäsionsrezeptors bei Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit stabiler AP nachgewiesen (Abbildung 14).

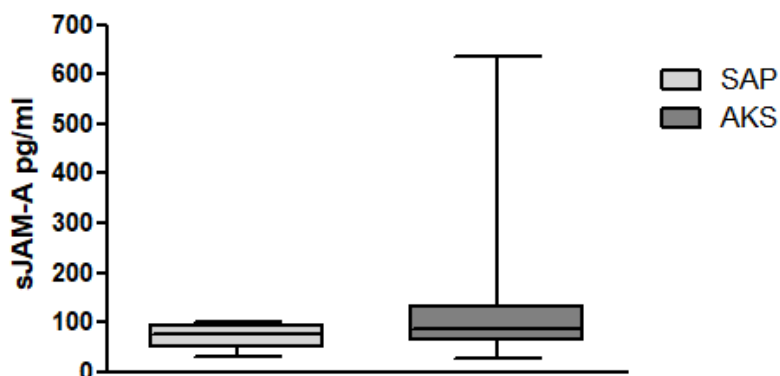


Abbildung 14: Serumkonzentration [pg/ml] von sJAM-A bei Patienten mit AKS oder stabiler AP. Es wurde eine gesteigerte Konzentration von sJAM-A bei AKS Patienten im Vergleich zu Patienten mit SAP belegt. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm SEM bei einem Patientenkollektiv von 40 Personen.

Da es nach der Thrombozytenstimulation und bei KHK Patienten zu einer signifikanten Steigerung der JAM-A Expression kommt und JAM-A als zelluläre Quelle für die lösliche Form sJAM-A fungiert, liegt eine Korrelation zwischen dem Auftreten der membranständigen und löslichen Form des JAM-A nahe. In Abbildung 15 wird diese Annahme bestätigt. Serumspiegel von sJAM-A bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit korrelieren signifikant mit der erhöhten JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche.

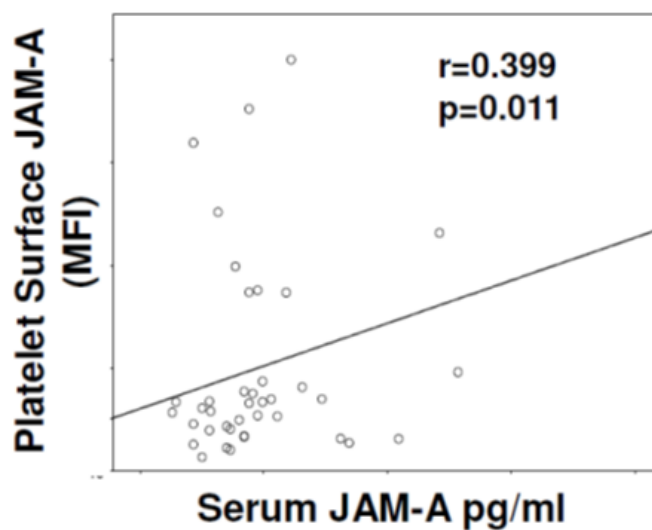


Abbildung 15: Korrelation von membranständigem JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche und löslichem sJAM-A im Serum. Statistische Auswertung durch Herrn Dr. Dominik Rath. Pearson's Korrelationskoeffizient $r = 0.399$ und $***p=0,011$ zeigen eine Signifikanz in der Korrelation auf.

Dies zeigt, dass membrangebundenes JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche eine potentielle Quelle für das zirkulatorische, gelöste sJAM-A bei KHK Patienten darstellt. Untermauern lässt sich damit auch die Aussage, dass Thrombozyten nach Aktivierung membranassoziertes JAM-A vermehrt exprimieren und es bei Aktivierung zudem abgeben könnten.

3.2 sJAM-A übt durch die homophile Interaktion mit

JAM-A/JAM1/F11R einen prothrombotischen Effekt aus

Um die potenzielle Wirkung von einer erhöhten sJAM-A Plasmakonzentration, wie es derzeit bei Patienten mit KHK registriert wird, zu analysieren, wurde der Effekt von kristallisiertem rekombinanten (s)JAM-A, das dem humanen sJAM-A ähnelt, auf die thrombotischen und hämostatischen Funktionen von Thrombozyten erforscht. Zum experimentellen Einsatz kamen zwei Formen des kristallisierten rekombinanten JAM-A, das JAM-A D1 und das JAM-A D1D2, um zusätzlich die funktionelle Domäne des Moleküls zu ermitteln, die für die zu beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Zur Validierung dieser Möglichkeit wurde unter anderem die Adhäsion, Aktivierung, Degranulation und Aggregation von Thrombozyten und die Thrombusformation mit speziellem Augenmerk auf die Bindung und homophile Interaktion mit dem membrangebundenem zellulärem JAM-A/JAM1/F11R unter Verwendung eines JAM-A/JAM1/F11R blockierenden antiJAM-A Antikörpers untersucht.

3.2.1 sJAM-A unterstützt die Thrombozytenadhäsion

Ziel des ersten Experiments war es die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem sJAM-A zu untersuchen.

Nach Isolierung der gewaschenen Blutplättchen gesunder Spender wurden diese mit dem Fluoreszenzmarker 5-(6-)-CFDA markiert und auf eine mit immobilisiertem sJAM-A (JAM-A D1 vs. JAM-A D1D2), Kollagen oder BSA beschichtete Oberfläche gegeben. Auf eine einstündige Inkubation mit anschließendem Waschgang folgte die Messung der Anzahl adhärenter Thrombozyten am Photometer. Dieser Versuch hat bewiesen, dass Thrombozyten auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche adhären und sich ausbreiten (Abbildung 16). Als Positivkontrolle wurde Kollagen verwendet, das für Thrombozyten als schon lang bekannte Adhäsionskomponente der subendothelialen Matrix über Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI fungiert [188]. Dadurch kommt es zu einer festen Bindung der noch diskoiden Blutplättchen mit dem Subendothel [3].

Als Negativkontrolle wurde BSA 1% eingesetzt und diese Ergebnisse als Ausgangswert angesehen. Durch die Verwendung eines blockierenden Antikörpers

konnte die homophile Interaktion zwischen immobilisiertem sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) und dem membrangebundenen JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche verhindert werden. Zur Kontrolle des JAM-A Antikörpers wurde das entsprechende goat IgG eingesetzt. In Abbildung 16 ist eine, im Vergleich zur Zahl der adhärenen Blutplättchen nach Verwendung des JAM-A Antikörpers, signifikant gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten dargestellt.

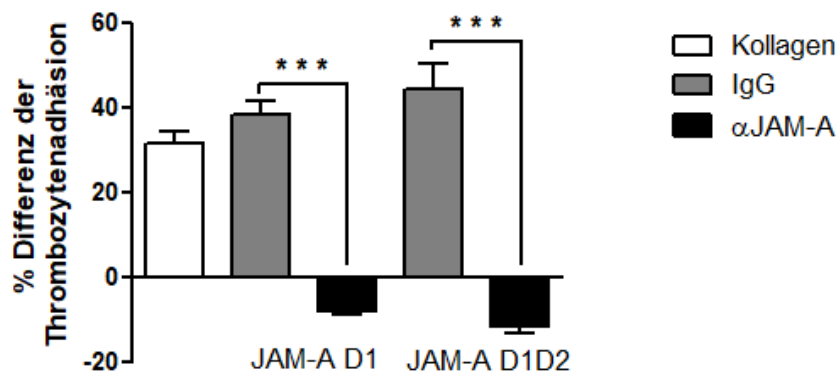


Abbildung 16: Balkendiagramm zur photometrisch gemessenen Adhäsion von fluoreszenzmarkierten Blutplättchen (n=7). Es wird eine Verbesserung der Thrombozytenadhäsion an der immobilisierten Oberfläche von sJAM-A-D1 [10 μ g/ml] und sJAM-A-D1D2 [30 μ g/ml] im Vergleich zur Adhäsion auf einer Kollagen beschichteten Oberfläche gezeigt, die durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit einem blockierenden Antikörper gegen JAM-A (α JAM-A) aufgehoben wird. BSA 1% als Negativkontrolle, Kollagen [100 μ g/ml] als Positivkontrolle. ***($p < 0,001$) Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von 7 unabhängigen Analysen dar.

Die Thrombozyten Adhäsion wurde ein weiteres Mal mit Hilfe der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie visuell veranschaulicht (Abbildung 17). Kollagen wurde erneut als Positivkontrolle angesehen. Thrombozyten wurden isoliert und ihr Anhaften und Ausbreiten nach zweimaliger Markierung mit entsprechenden primären und sekundären Antikörpern zur Fluoreszenzvisualisierung auf einer mit JAM-A D1, JAM-A D1D2 und einer mit Kollagen beschichteten Oberfläche überprüft. In Abbildung 17 werden adhärenente und sich ausbreitende Thrombozyten als rot, grün oder rot-grün leuchtende Gebilde repräsentiert. Der grün leuchtende Phalloidin-Antikörper markiert Aktin als Teil des Zytoskeletts von sich ausbreitenden Thrombozyten. Der in

fluoreszierendem Rot erscheinende Tubulin-Antikörper färbt Tubulin ein, ein weiterer Teil des Thrombozytenzytoskeletts.

Somit konnte erneut bestätigt werden, dass die Thrombozyten in einem ähnlichen Maße sich auf einer mit JAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) beschichteten Oberfläche anheften und ausbreiten, im Vergleich zu einer mit Kollagen bestückten Oberfläche.

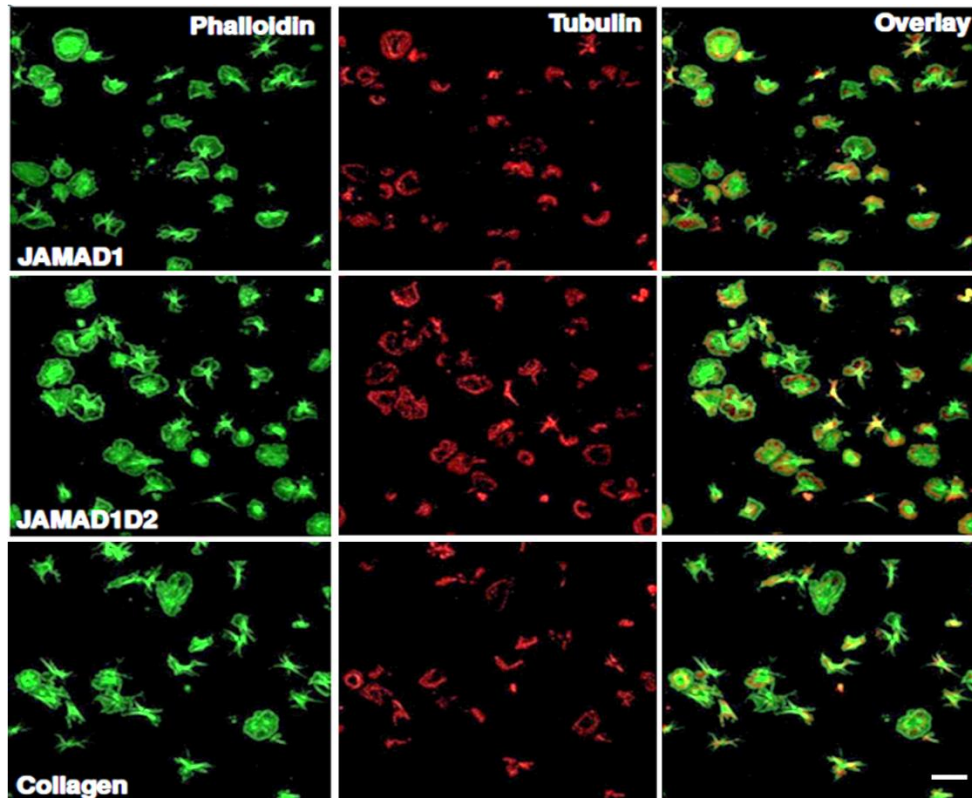


Abbildung 17: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen und konfokalmikroskopische Bilder zur Beurteilung der Thrombozytenadhäsion auf einer mit JAM-A D1, JAM-A D1D2 oder Kollagen-beschichteten Oberfläche (n=3). Phalloidin-488 markiert Aktin als Teil des Zytoskeletts von sich ausbreitenden Thrombozyten und erscheint in fluoreszierendem Grün; der anti-Tubulin-Antikörper detektiert Tubulin, ein weiterer Part des Thrombozytenzytoskeletts, in fluoreszierendem Rot. Kollagen als Positivkontrolle. Die Bilder repräsentieren 3 unabhängige konfokale immunfluoreszenzmikroskopische Analysen. Der Maßstab entspricht 2 µm. Die Immunfluoreszenzmarkierung und die folgende Analyse der Konfokalmikroskopie erfolgten durch Frau Dr. Madhumita Chatterjee.

Photometrische und konfokalmikroskopische Analysen zeigen, dass das Adhäsionsmolekül JAM-A und vor allem bereits JAM-A D1, mit nur einer membrandistalen Domäne, als Basis für die Thrombozytenadhäsion dient, dem Anfangsweg der Thrombenbildung.

Zudem wurde auch mit speziellen humanen Endothelzellen, als HUVECs bezeichnet, gearbeitet, um die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen zu validieren. Die Beurteilung der Thrombozytenadhäsion an eine mit einem Zytokin-Cocktail, bestehend aus $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, aktivierte entzündete endotheliale Monoschicht gelang hierbei wiederum visuell und quantitativ. Damit wurde ein physiologisches Szenario nachgeahmt, bei dem Endothelzellen, nach Erhalt eines proinflammatorischen Triggers, JAM-A/JAM1/F11R vermehrt auf ihrer apikalen Oberfläche exponieren (Abbildung 10). Die Thrombozyten Interaktion mit Endothelium durch die homophile Interaktion mit JAM-A/JAM1/F11R wurde mit Hilfe der Flusskammer mit arterieller Flussrate und unter arteriellem Scherstress dargestellt (Abbildung 18, Abbildung 19). Zu Beginn wurden HUVECs kultiviert und diese mit Zytokinen, wie $\text{TNF}\alpha$ [50 ng / ml] und $\text{IFN}\gamma$ [20 ng / ml], aktiviert. Danach wurde PRP hergestellt und die darin enthaltenen Thrombozyten, die zuvor entweder unbehandelt oder mit JAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) inkubiert waren, mit arterieller Flussrate über die inflammatorisch veränderten Endothelzellen geleitet. Im letzten Schritt wurden nach einem Waschgang Fotos angefertigt und die Anzahl fest adhärenter Thrombozyten ausgezählt (Abbildung 18). Die Anzahl der, vor der Perfusion mit JAM-A (JAM-A D1 [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$], JAM-A D1D2 [30 $\mu\text{g}/\text{ml}$]) vorbehandelten, adhärenter Thrombozyten war signifikant stark erhöht im Vergleich zur Anzahl der unbehandelten adhärenter Thrombozyten an mit $\text{TNF}\alpha$ - $\text{IFN}\gamma$ -aktivierten Endothelzellen (Abbildung 18, Abbildung 19).

Um dem molekularen Mechanismus der Thrombozytenadhäsion an Endothelium auf den Grund zu gehen, wurden im selben Versuch die HUVECs oder Thrombozyten vor der Perfusion mit dem antiJAM-A Antikörper [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] behandelt, der das Adhäsionsmolekül JAM-A auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen oder auf der thrombozytären Zelloberfläche blockieren kann. Als Antikörperkontrolle wurde das entsprechende IgG goat [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] herangezogen. Die Thrombozytenadhäsion war unter jeweiliger Verwendung des antiJAM-A Antikörpers signifikant beeinflusst und zeigte eine signifikante Reduktion der Anzahl an adhärenter Blutplättchen auf (Abbildung 18, Abbildung 19).

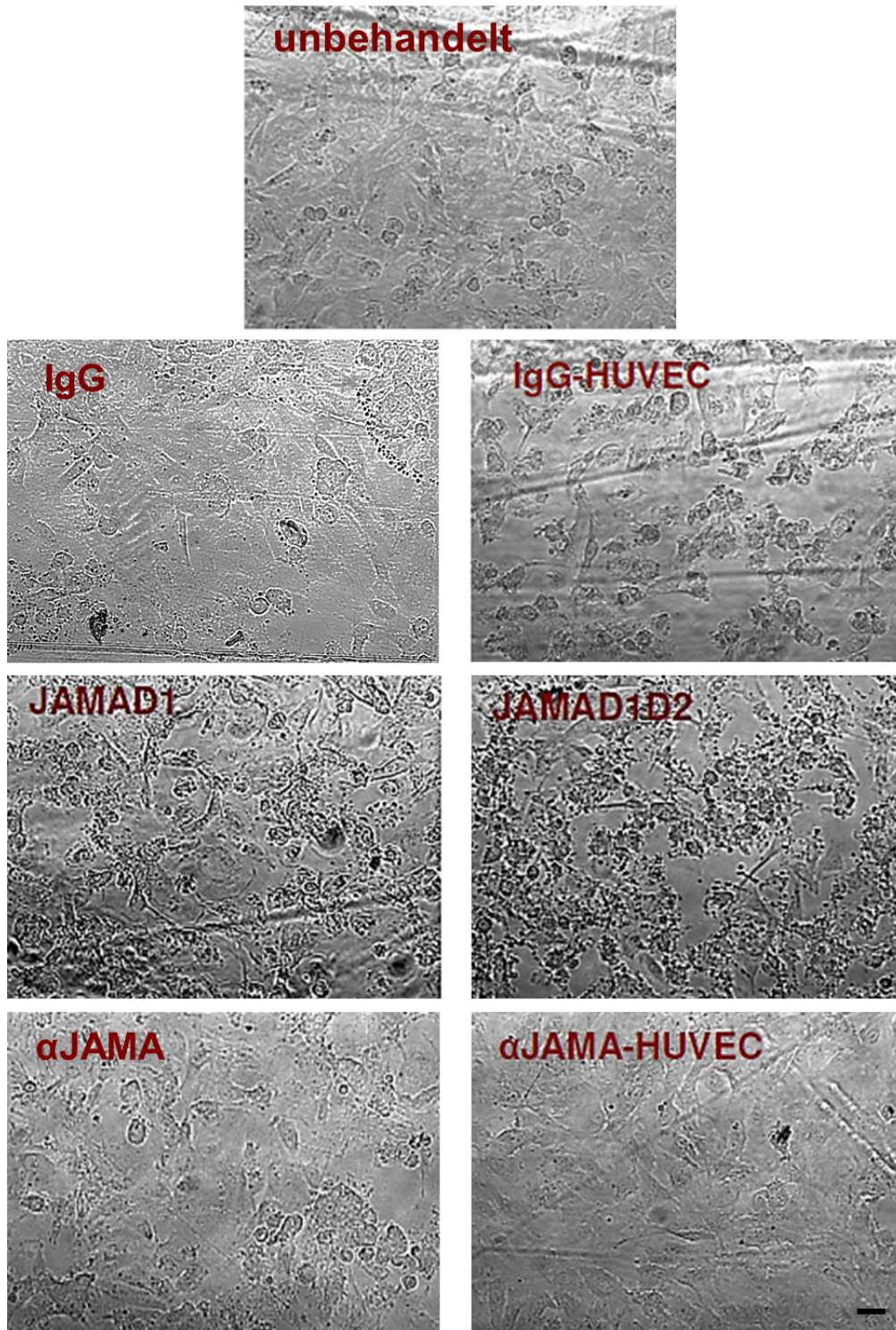


Abbildung 18: Repräsentative Phasenkontrastbilder des Flusskammer-Versuchs zur Thrombozyten Adhäsion auf mit $TNF\alpha$ und $INF\gamma$ aktiviertem Endothelium (n=5). Gezeigt wird die Anzahl der perfundierten Thrombozyten, die an der entzündeten Endotheloberfläche haften (kleine schwarze Punkte, die an den Zellen zu kleben scheinen). Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten perfundiert. Die Daten stammen aus 5 unabhängigen Experimenten. Der Maßstab beträgt 5 μm .

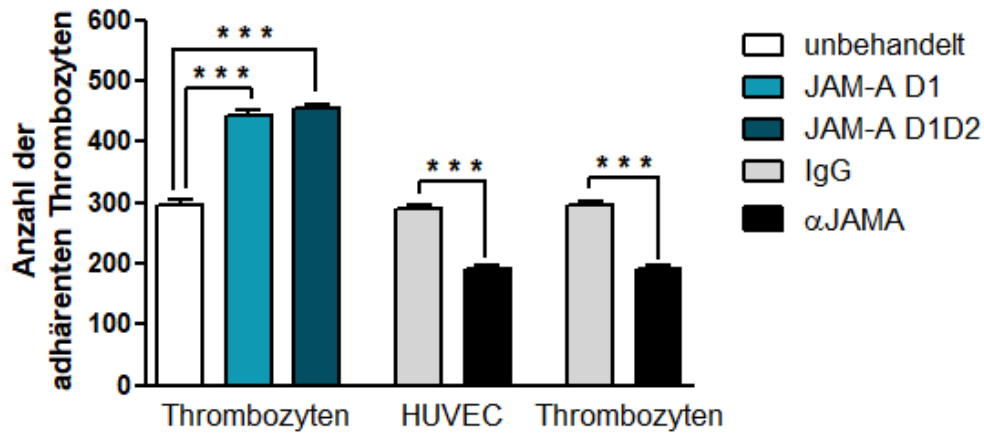


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Thrombozytenadhäsion auf einer inflammatorisch veränderten Endothelmonoschicht (n=5). Dargestellt ist die Anzahl der, an der mit Zytokinen aktivierten endothelialen Monoschicht, haftenden Thrombozyten in einem dynamischen Flusskammer Assay. ***($P < 0,001$) zeigt die hohe Signifikanz der Unterschiede an. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Thrombozyten. Die Daten stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

Den Ergebnissen zufolge adhären Thrombozyten unter sJAM-A Einfluss verstärkt über die homophile JAM-A Interaktion an eine mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{INF}\gamma$ aktivierte inflammatorische Endothelzellmonoschicht, die durch die Aktivierung vermehrt JAM-A exponiert. Dieser Effekt konnte unter Einsatz des antiJAM-A Antikörpers, welcher JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche oder auf aktivierten Endothelzellen blockiert, annulliert werden.

Die Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen oder einer mit JAM-A beschichteten Oberfläche konnte durch Verwendung beider immobilisierter JAM-A Moleküle, also JAM-A D1 und JAM-A D1D2, gleichermaßen gesteigert werden. Dieser positive Einfluss bestätigte die Wirksamkeit beider Moleküle. Es konnte dadurch zusätzlich nachgewiesen werden, dass die membrandistale Domäne D1 des JAM-A Moleküls für die Thrombozytenadhäsion verantwortlich ist.

Zusammenfassend konnten die Versuche per Konfokalmikroskopie mit Immunfluoreszenzfärbungen und Photometrie beweisen, dass einer Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem sJAM-A oder JAM-A angereichertem entzündetem Endothelium unter dynamischen arteriellen Strömungsverhältnissen durch eine Vorbehandlung der Thrombozyten mit einem blockierenden antiJAM-A/F11R-

Antikörper, der die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und membranassoziertem JAM-A bestätigt, entgegengewirkt wurde. Diese homophile Interaktion zwischen JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche und Endothelzelloberfläche trägt damit in großem Maße zur Adhäsion der Thrombozyten bei.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Thrombozytenadhäsion an inflammatorischen Endothelzellen durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit JAM-A D1 sowie mit JAM-A D1D2 zusätzlich gesteigert werden konnte im Vergleich zur Thrombozytenadhäsion an inflammatorischen Endothelzellen ohne Einsatz der Proteine.

Diese Erkenntnis und der Nachweis, dass Thrombozyten an eine mit immobilisiertem sJAM-A beschichteten Oberfläche durch homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche adhären können, lässt darauf schließen, dass sJAM-A als Brücken- oder Verbindungsmolekül zwischen der Endothelschicht und Thrombozyten fungieren kann.

3.2.2 sJAM-A verstärkt die agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung und Degranulation

Der Nachweis, dass Thrombozyten mit sJAM-A interagieren und sie an mit sJAM-A reich bestückte Oberflächen binden können, lässt vermuten, dass sJAM-A auch die Funktionalität der Thrombozyten beeinflussen kann. Um dies zu erörtern wurden zunächst die Thrombozytenaktivierung und Thrombozytendegranulation anhand der aktivierungsabhängigen Veränderungen der thrombozytären Membranglykoproteine untersucht.

Dazu wurden zwei Versuchsreihen mit etablierten Methoden zur Untersuchung des Aktivitätszustandes und der Degranulation von Thrombozyten mittels Durchflusszytometer aufgebaut: die Aktivierung wurde durch PAC-1 Einsatz, einer GPIIb/IIIa bindenden Substanz, gemessen und die Degranulation anhand der P-Selektin Oberflächenexpression erforscht [189, 190]. Das Glykoprotein P-Selektin existiert auf Endothelzellen und Thrombozyten und wird bei Aktivierung der Thrombozyten aus der α -Granulamembran an die Zellmembranoberfläche disloziert. Die Bindung von anti-CD62P Antikörpern an P-Selektin fungiert somit als Marker für die spezifisch bei der Thrombozytenaktivierung vorkommende Degranulation mit Dislozierung von P-Selektin an die Zellmembranoberfläche [191, 192].

Die durchflusszytometrische Messung der kompetitiven PAC-1 Bindung an den aktivierten, nicht aber an den inaktiven, thrombozytären GPIIb/IIIa, der auch Fibrinogen bindet, gilt als einer der Marker des thrombozytären Aktivierungsprozesses [193, 194].

Zum Versuchsstart wurde zuerst PRP (Platelet Rich Plasma) hergestellt. Anschließend wurden die Thrombozyten mit sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) inkubiert und nach synergistischer Agonistenstimulation mit TRAP auf die Oberflächenexpression von CD62P (P-Selektin) und GPIIb/IIIa, dem PAC-1 bindenden Rezeptor, durchflusszytometrisch untersucht. Verwendet wurde dafür der Fluoreszensantikörper PAC-1 FITC und der Fluoreszensantikörper Anti-Human CD62P-FITC. Die Vorbehandlung der Thrombozyten mit TRAP alleine, einem bekannten Thrombozytenagonisten mit Wirkung über den thrombozytären Thrombinrezeptor PAR-1, galt als Positivkontrolle [195–197]. Die Bindung des Anti-Human CD62P (P-Selektin) -FITC und des PAC-1 FITC durch unbehandelte, inaktive Thrombozyten diente als Ausgangswert des thrombozytären Zustandes, bezogen auf Aktivierung und Degranulation.

Die Analyse der Durchflusszytometrie ist in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Gemessen wurden TRAP allein und TRAP mit JAM-A D1/JAM-A D1D2 in Kombination gegen unbehandelte, nicht agonistenstimulierte, Thrombozyten.

Bereits unbehandelte Thrombozyten zeigen CD62P/P-Selektin auf ihrer Oberfläche auf und binden PAC-1 in einem geringen Maße. Unter der Hinzugabe von TRAP steigt die thrombozytäre Aktivierung. Die Vorexposition der Thrombozyten mit sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) bringt eine weitere synergistische Verbesserung der Agonisten-induzierten Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten über den α IIB β 3-Integrin Signalweg mit sich. Dies konnte einerseits durch eine signifikant vereinfachte Degranulation gekennzeichnet werden, die als CD62P/P-Selektin-Oberflächenexpression entschlüsselt wurde (Abbildung 20) und andererseits durch die GPIIb/IIIa oder auch α IIB β 3-Integrin-Aktivierung, was durch eine signifikant erhöhte PAC-1-Bindung veranschaulicht wurde (Abbildung 21). Durch Zugabe eines antiJAM-A Antikörpers, der das auf der Thrombozytenoberfläche assoziierte JAM-A blockiert, konnte die Steigerung essentiell reduziert werden indem die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und dem membranassoziierten JAM-A verhindert wurde. Im Vergleich des antiJAM-A Antikörpers zur IgG Kontrolle wurde bei der Verringerung

der Aktivierung und Degranulation eine Signifikanz von * ($p < 0,05$) oder eine Signifikanz von ** ($p < 0,01$) erreicht. Wichtig ist zu erkennen, dass die gesteigerte Thrombozytenaktivierung und Degranulation unter Einsatz des natürlichen Thrombozytenagonisten TRAP in einer Konzentration unter dem Schwellenwert [25 μM] aufgezeichnet werden konnte.

Somit ist der Beleg, dass die Thrombozyten Aktivierung und Degranulation durch die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche induziert und angetrieben wird, gelungen.

Beide Proteine, JAM-A D1 und JAM-A D1D2 wirkten gleichermaßen positiv und verstärkend auf die Thrombozyten Aktivierung und Degranulation, wodurch erneut der membrandistalen Domäne D1 des JAM-A Moleküls die Verantwortung für die gesteigerte Aktivierung und Degranulation zugeschrieben werden kann.

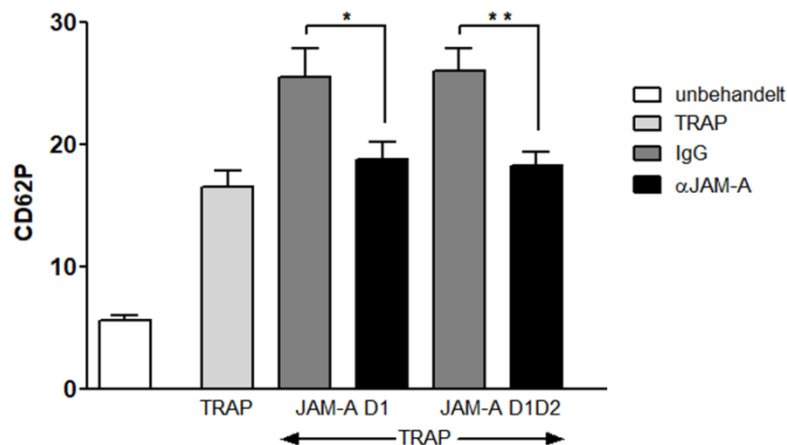


Abbildung 20: Balkendiagramm der durchflusszytometrisch erhobenen Daten der CD62P Oberflächenexpression zur Darstellung der Degranulation (n=5). Beschrieben ist die synergistische Wirkung von sJAM-A-D1 [10 $\mu\text{g/ml}$] und sJAM-A-D1D2 [30 $\mu\text{g/ml}$] auf die TRAP-induzierte Thrombozytendegranulation, dargestellt anhand der CD62P-Oberflächenexpression. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Thrombozyten. *($P < 0,05$) und **($P < 0,01$) zeigen das Signifikanzniveau dieser Reduktion an. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten.

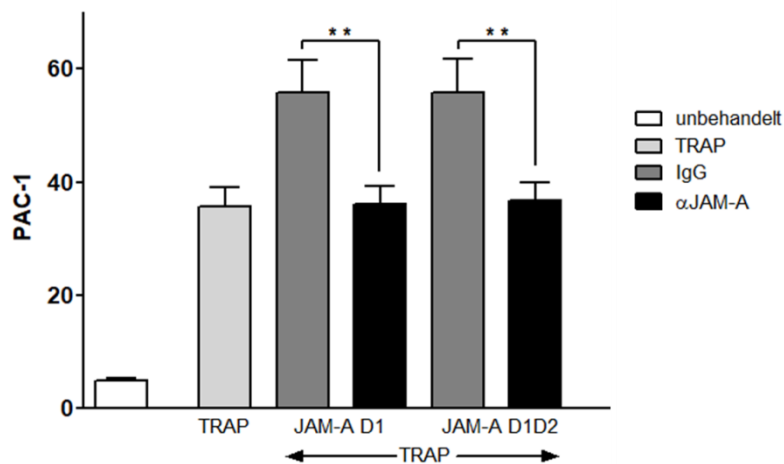


Abbildung 21: Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Datenerfassung der PAC-1 Bindung zur Veranschaulichung der Thrombozytenaktivierung (n=5). Dargestellt ist die synergistische Wirkung von sJAM-A-D1 [10 μ g/ml] und sJAM-A-D1D2 [30 μ g/ml] auf die TRAP-induzierte thrombozytäre α IIb β 3-Integrin-Aktivierung, dargestellt anhand der PAC-1 Bindung. Zur Kontrolle dienen unbehandelte Thrombozyten. ** (P<0,01) zeigt das Signifikanzniveau dieser Reduktion an. Die Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.2.3 sJAM-A verstärkt die agonistenabhängige Thrombozytenaggregation

Bis jetzt haben die beschriebenen Ergebnisse gezeigt, dass sJAM-A die Thrombozytenaktivierung und Degranulation positiv beeinflusst. Die nächsten Schritte im Prozess der Blutgerinnung bestehen in der Bildung von Thrombozytenaggregaten und letztendlich in der Formation eines stabilen Thrombus, der den Gefäßdefekt suffizient deckt.

Aus diesem Grund wurden in nächsten Experimenten die funktionelle Auswirkung von sJAM-A auf die aktivierungsabhängige Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie und die in vitro Thrombusformation mittels Flusskammer überprüft. Die Impedanzaggregometrie ist ein Standardverfahren zur Evaluation der Thrombozytenfunktion in der Klinik. Mit dieser Methode werden die Einflüsse und das Ansprechen auf die antithrombozytäre Medikation überprüft, um eine individuell angepasste, aggregationshemmende Therapie auszurichten.

Die Untersuchungen der Thrombozytenaggregation fanden mit Vollblut von gesunden humanen Spendern statt. Nach der ersten Inkubation des Vollbluts mit dem Antikörper antiJAM-A oder seiner entsprechenden IgG Kontrolle erfolgte die zweite Inkubation mit dem sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2). Kurz nach dem Start der

Impedanzaggregometrie (Multiplate®) wurde nach der Thrombozytenagonist TRAP in einer geringen Konzentration von 10 μ M hinzugefügt. So wurden die sich im Vollblut befindlichen Thrombozyten aktiviert und die Degranulation induziert.

In Abbildung 22 und Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Impedanzaggregometrie zu sehen. Die aggregometrischen Ergebnisse der Vollblutprobe, die ausschließlich mit TRAP behandelt wurde, wurden als Ausgangswerte herangezogen, um es mit den mit sJAM-A vorbehandelten experimentellen Sets zu vergleichen. TRAP gilt laborchemisch als natürlicher Induktor der Thrombozytenaggregation. Durch Inkubation des Vollblutes mit sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) konnte ein weiterer Anstieg aufgezeigt werden, der durch Vorbehandlung des Vollblutes mit dem antiJAM-A Antikörper eine signifikant Reduktion erfährt. Zur anti-JAM-A Antikörper Kontrolle wurde das entsprechende IgG goat verwendet.

Damit wurde erwiesen, dass nicht nur das native JAM-A D1D2, sondern auch bereits das synthetisierte JAM-A D1 die agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation signifikant steigert und verbessert. JAM-A D1 und JAM-A D1D2 üben dabei einen synergistischen Effekt auf die Bildung von Thrombozytenaggregaten aus - ein Prozess, bei dem die α Ib β 3-Integrinaktivierung und Thrombozytendegranulation eine zentrale Rolle spielen.

So lässt sich zusammenfassend sagen, dass sJAM-A durch die homophile Bindung an JAM-A/JAM1/F11R die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation steigert und die membrandistale Domäne D1 des JAM-A Moleküls zu dieser Steigerung beiträgt.

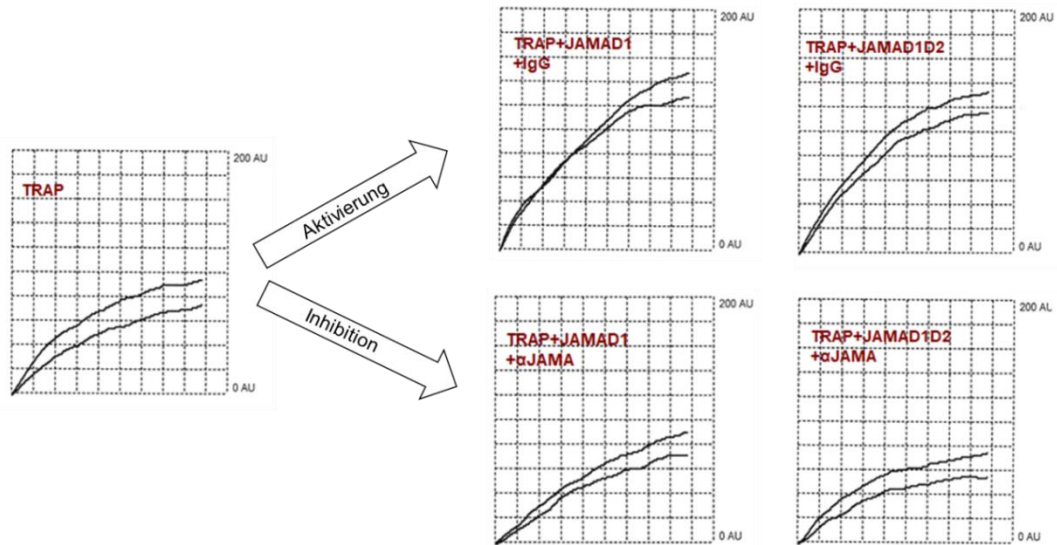


Abbildung 22: Repräsentative Kurven der Impedanz-Aggregometriedaten der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation (n=5). Die Kurven zeigen den synergistischen Effekt von sJAM-A-D1 [10 µg/ml] und sJAM-A-D1D2 [30 µg/ml] auf die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation, dem durch Gegenwart des anti-JAM-A Antikörper (αJAM-A [10 µg/ml]) in Bezug auf die Kontrolle mit IgG [10 µg/ml] entgegengewirkt wird. Der Anstieg der Kurven zeigt die Steigerung der Aggregation. Die Daten stammen von 5 unabhängigen Experimenten.

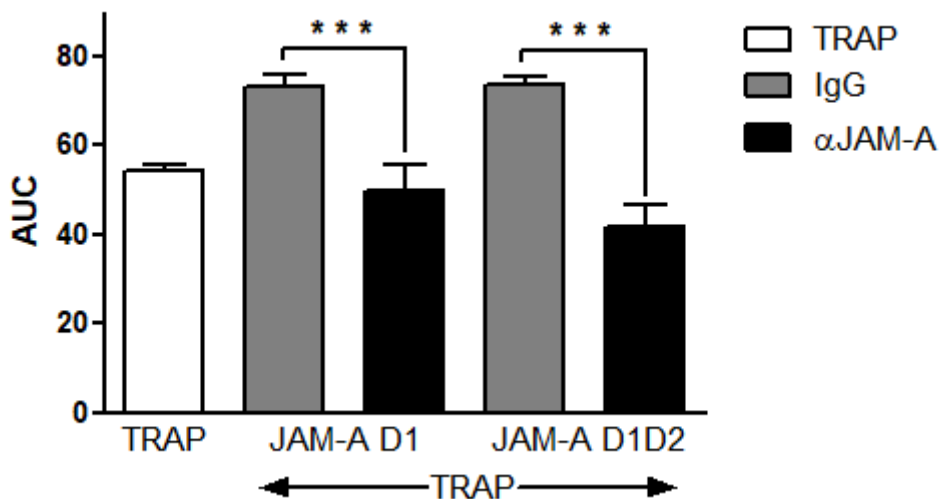


Abbildung 23: Analyse der erfassten Daten der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation per Impedanzaggregometrie (n=5). *** (P < 0,001) zeigt die Signifikanz der Reduktion der Steigerung der Aggregation auf. Die Daten stammen von 5 unabhängigen Experimenten.

3.2.4 sJAM-A unterstützt die Thrombusformation

In einem weiteren Flusskammer Versuch wurde die Teilnahme von sJAM-A an der Thrombusformation, einem der letzten Schritte der zellulären Blutgerinnung, unter dynamischen arteriellen Flusskonditionen erforscht. Dabei entsteht ein dreidimensionales Gebilde aus vernetzten Thrombozyten, die durch Brückenmoleküle wie Fibrinfäden eine stabile Bindung eingehen und den Thrombus bilden. Der Thrombus führt zur vollständigen Abdeckung des Endotheldefekts und stillt damit die Blutung.

Der Flusskammer Versuch wurde mit Vollblut von gesunden Spendern durchgeführt. Das Vollblut wurde zuerst mit antiJAM-A Antikörper oder der entsprechenden goat IgG Kontrolle inkubiert, bevor die dreißigminütige Inkubation mit JAM-A D1 oder JAM-A D1D2 gestartet wurde. Nach Vorbehandlung des Blutes fand die Perfusion über eine mit Kollagen beschichteten Oberfläche in der Flusskammer statt. Unter dem Mikroskop wurde die Thrombusformation beobachtet und am Ende der vierminütigen Perfusion als Bilddatei gespeichert. Kollagen ist ein natürlicher Thrombozytenagonist und wurde als Induktor der Thrombozytenadhäsion und folgenden Kaskade bis hin zur Bildung eines Thrombus eingesetzt. Zur Evaluation des Einflusses von sJAM-A auf die Thrombusformation wurde ein Ausgangswert mit unbehandelten Thrombozyten erstellt.

In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Thrombusformation über einer kollagenbeschichteten Oberfläche durch ex vivo Untersuchungen unter arteriellen Flussbedingungen mittels Flusskammer dargestellt. Um die Thrombusbildung zu beurteilen wurden die zweidimensionalen Flächen der entstandenen Thromben betrachtet und addiert. Dadurch entstand am Ende eine errechnete Gesamtfläche der Thromben, die man unter den verschiedenen Bedingungen vergleichen konnte.

Im ex vivo Flusskammer Versuch bei arteriellen Schergeschwindigkeiten konnte bewiesen werden, dass sJAM-A, also JAM-A D1 und JAM-A D1D2, die Thrombusformation über der kollagenbeschichteten Oberfläche im Vergleich zur betrachteten Thrombusformation von unbehandelten Thrombozyten signifikant verbessert.

Dieser unterstützende Effekt von JAM-A D1D2 aber auch bereits von JAM-A D1 auf die thrombozytenabhängige Hämostase konnte somit der membrandistalen D1 Domäne des JAM-A Moleküls zugeschrieben werden und wurde unter Einsatz eines JAM-A blockierenden Antikörpers (humaner antiJAM-A Antikörper) vor der Perfusion über Kollagen kompensiert.

Diesen Ergebnissen zufolge führt die sJAM-A - JAM-A Rezeptor Interaktion auf der Thrombozytenoberfläche zu einer deutlichen Steigerung der Thrombusformation und bestätigt damit das auf sJAM-A basierende, erhöhte thrombotische Potential, visualisiert durch die Formation eines Thrombus.

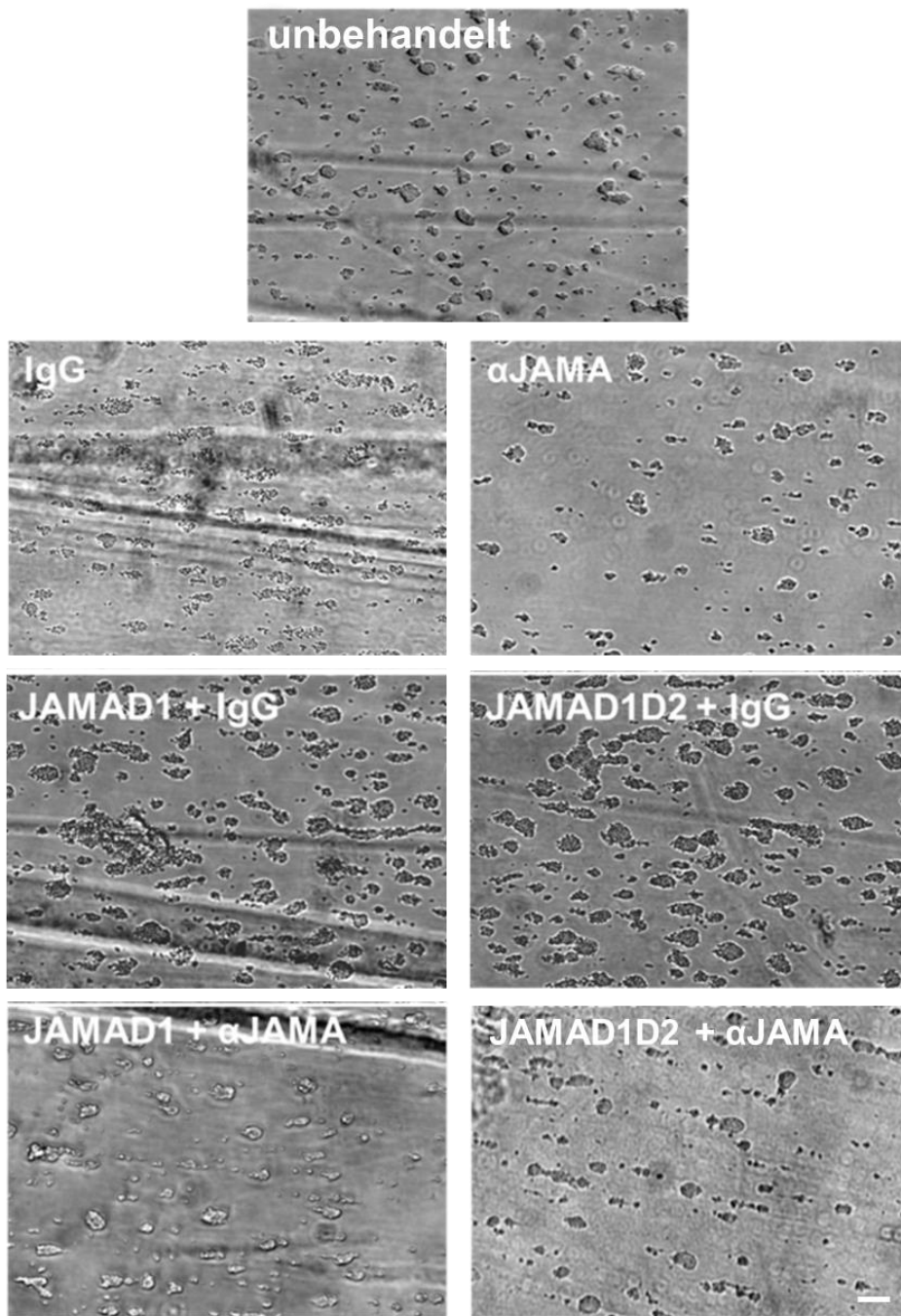


Abbildung 24: Repräsentative Phasenkontrastbilder der Thrombusformation nach Vollblutperfusion durch die Flusskammer (n=3). Betrachtet wurde die Oberflächenbedeckung durch Thromben bei arteriellen Schwergeschwindigkeiten. Zur Kontrolle wurde unbehandeltes Vollblut perfundiert. Veranschaulicht werden konnte eine deutlich verbesserte Thrombusbildung durch Vorbehandlung des Vollblutes mit sJAM-A-D1 [10 µg/ml] oder sJAM-A-D1D2 [30 µg/ml], die in Gegenwart vom anti-JAM-A Antikörper (α JAM-A [10 µg/ml]) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle mit IgG [10µg/ml] inhibiert wurde. Die Daten stammen von 3 unabhängigen Experimenten. Der Maßstab entspricht 25µm.

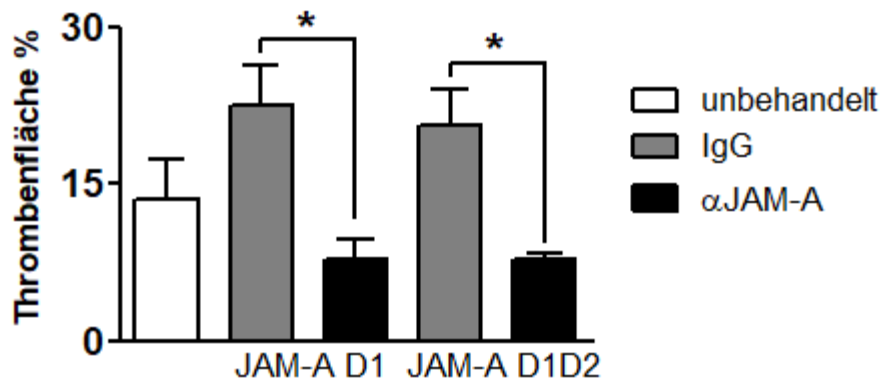


Abbildung 25: Balkendiagramm zum Flusskammer Versuch zur Erörterung der Thrombusformation gemessen an der Thrombenfläche (n=3). Zur Kontrolle wurde unbehandeltes Vollblut perfundiert. * ($P < 0,05$) verdeutlicht die Signifikanz der Reduktion der Thrombenbildung anhand der antiJAM-A Wirkung. Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Flusskammer Versuchen.

3.2.5 sJAM-A forciert die prokoagulatorische Aktivität von Thrombozyten und beeinflusst dadurch ihre Funktionalität

Das Ziel dieser Untersuchungen war, den Effekt von sJAM-A auf die Funktionalität der Thrombozyten und ihre prokoagulatorische Wirkung zu erfassen. Dazu wurden zwei Versuchsreihen mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Einerseits wurde die Externalisation von PS auf dem äußeren Blatt der thrombozytären Plasmamembran und andererseits der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials aufgezeichnet, beides Voraussetzungen für prokoagulatorisch wirkende Thrombozyten und Indikatoren der Apoptose. Fluoreszierendes AnnexinV - FITC bindet dabei an das externalisierte Phosphatidylserin und die TMRE-Fluoreszenz zeigt den mitochondrialen Transmembranpotentialverlust ($\Delta\Psi_m$) an. Phosphatidylserin wirkt zusätzlich prothrombotisch, da es auch als Prokoagulans-Plattform für den Aufbau des Prothrombinase-Komplexes dient.

Zum Versuchsstart wurden PRP von einem gesunden Spender hergestellt. Als erstes wurden die Thrombozyten mit einem antiJAM-A Antikörper oder seiner entsprechenden Kontrolle, dem IgG goat, vorbehandelt. Im Anschluss daran fand die Inkubation mit sJAM-A (JAM-A D1, JAM-A D1D2) statt.

Bei beiden Versuchsaufbauten wurde die prokoagulatorische Funktion der Thrombozyten jeweils einmal agonisteninduziert und das andere Mal agonistenunabhängig untersucht. Als Thrombozytenagonist kam TRAP nach der Antikörper- oder entsprechenden IgG- Inkubation zum Einsatz. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde die durchflusszytometrische Analyse auch an unbehandelten oder an mit ausschließlich TRAP behandelten Thrombozyten durchgeführt.

Es konnte bestätigt werden, dass sJAM-A die prokoagulierende und prothrombotische Aktivität von Thrombozyten anregt und weiter vorantreibt. Dadurch konnte auch gezeigt werden, dass sJAM-A die Apoptose von aktivierten Thrombozyten induziert und fördert, was durch die gesteigerte Externalisation von PS und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials zusätzlich gekennzeichnet wird.

sJAM-A steigert demnach synergistisch die Integrinaktivierung oder Degranulation von Thrombozyten (siehe 3.2.2) und fördert zudem die prokoagulierende Wirkung von Thrombozyten, indem es die Externalisierung von PS veranlasst und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials anregt. Dieser Effekt ist in Abbildung 26 und Abbildung 27 deutlich zu sehen. Beide Beobachtungen sind Voraussetzungen für die prokoagulatorische Funktion von Thrombozyten und Kennzeichen der Apoptose. Auch TRAP als Thrombozytenagonist kann diese Funktion induzieren. Durch eine kombinierte Stimulation mit sJAM-A und TRAP übt sJAM-A einen synergistischen, positiven Effekt auf die Externalisation von Phosphatidylserin oder den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials aus. Somit konnte gezeigt werden, dass durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit sJAM-A die Thrombozyten dazu veranlasst wurden, eine bessere prokoagulatorische Antwort zu geben und diese prokoagulatorische Funktion dadurch zusätzlich gesteigert werden konnte.

Die gesteigerte prokoagulierende Funktion der Thrombozyten, gemessen anhand des Anstiegs der Phosphatidylserinexternalisation und der Reduktion der physiologischen mitochondrialen Membranpotentialdifferenz, konnte in Gegenwart des antiJAM-A Antikörpers, der das transmembranöse JAM-A blockiert und somit die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und der Thrombozytenoberfläche, die mit JAM-A assoziiert ist, verhindert, gehemmt werden. Diese Inhibition ist bei den experimentellen Sets mit und ohne TRAP Stimulation nachgewiesen.

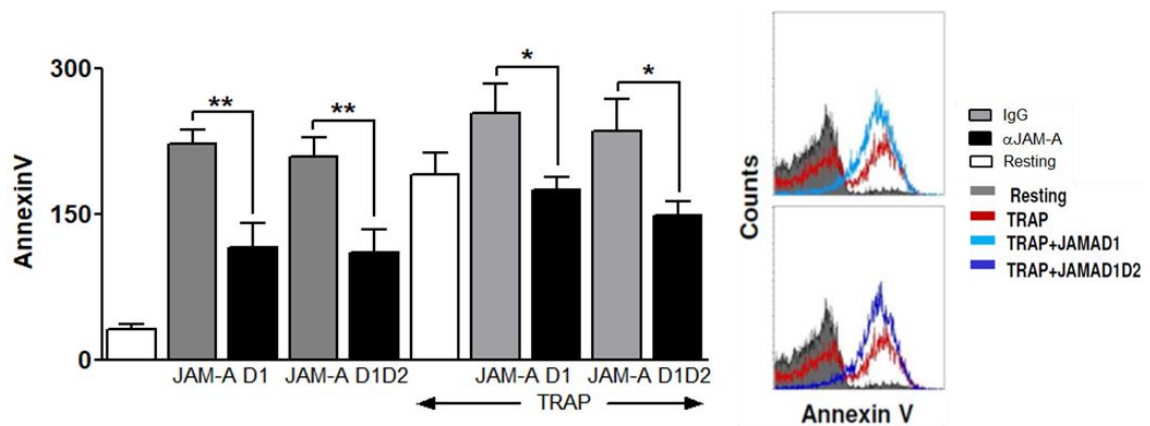


Abbildung 26: links Balkendiagramm und rechts Histogramm Overlay aus durchflusszytometrisch erfassten Daten zur prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion anhand PS Externalisation (n=6). Dargestellt wird die MFI der AnnexinV Fluoreszenz von ruhenden Thrombozyten und nach der Behandlung von Thrombozyten mit dem Thrombozytenagonisten TRAP und/oder sJAM-A in Gegenwart eines anti-JAM-A Antikörpers [10 μ g/ml] oder seiner entsprechenden IgG Kontrolle [10 μ g/ml]. Die AnnexinV-Fluoreszenz stellt durch Bindung von AnnexinV an PS die Externalisation von PS dar. sJAM-A bewirkt eine Steigerung der AnnexinV Fluoreszenz. Das Signifikanzniveau der Reduktion der PS Externalisation aufgrund Verwendung des Antikörpers wird durch *(P<0,05) und **(P<0,01) verdeutlicht. Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte der MFI \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten.

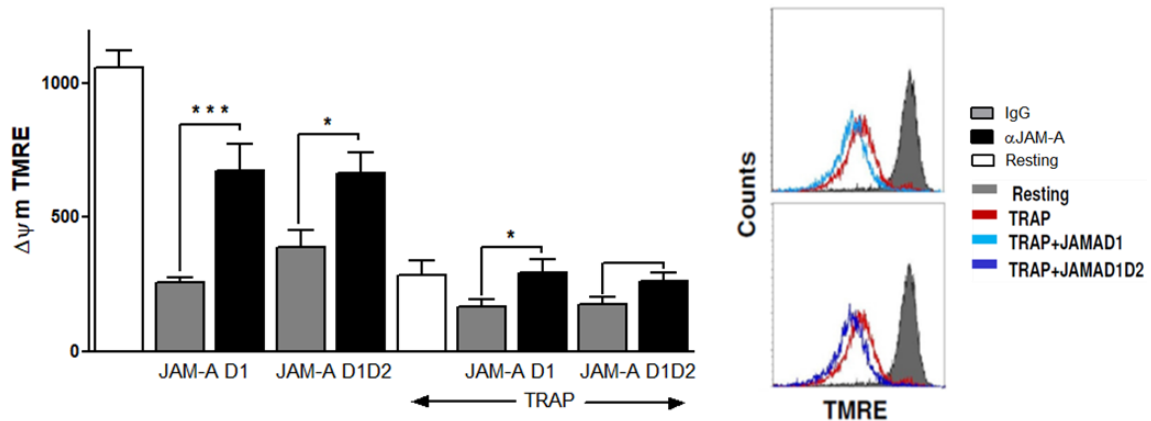


Abbildung 27: links Balkendiagramm und rechts Histogramm Overlay aus durchflusszytometrisch erfassten Daten zur prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion anhand des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials (n=6). Dargestellt ist die MFI der TMRE-Fluoreszenz von ruhenden Thrombozyten und nach der Behandlung von Thrombozyten mit dem Thrombozytenagonisten TRAP und/oder sJAM-A in Gegenwart eines anti-JAM-A Antikörpers [10 μ g/ml] oder seiner entsprechenden IgG Kontrolle [10 μ g/ml]. Die TMRE-Fluoreszenz bezeichnet den mitochondrialen Transmembranpotentialverlust ($\Delta\Psi_m$). sJAM-A bewirkt eine Reduktion der TMRE Fluoreszenz. Die Signifikanz der Reduktion der prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion wird durch *(P<0,05) und ***(P<0,001) verdeutlicht. Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte der MFI \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten.

Auch in diesen Untersuchungen konnte somit eine durch sJAM-A verstärkte und induzierte prokoagulierende Thrombozytenfunktion, der mit dem Antikörper antiJAM-A entgegen gewirkt werden konnte, aufgezeichnet werden. Damit kann die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A als grundlegender Mechanismus für die Induktion und Verstärkung der prokoagulierenden Funktion der Thrombozyten verantwortlich gemacht werden. Weiterhin kann der membrandistalen D1 Domäne des JAM-A Moleküls dieser Einfluss zugeschrieben werden, da alle unter 3.2.5 beschriebenen Effekte bereits bei Einsatz des JAM-A D1 zu verzeichnen waren.

Summa summarum steigert sJAM-A durch homophile Interaktion mit JAM-A/JAM1/F11-R signifikant die Externalisation von PS und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials, kann damit die Apoptose induzieren und gleichzeitig die Thrombinbildung begünstigen, wodurch wiederum die Blutgerinnung und das thrombotische Potential der Thrombozyten gefördert wird.

3.3 sJAM-A ermöglicht proinflammatorische Assoziationen zwischen Thrombozyten und Monozyten

Vorherige Ergebnisse zeigten unter Abschnitt 3.1, dass Endothelzellen nach Stimulation mit inflammatorischen Substanzen vermehrt JAM-A auf ihrer apikalen Zellmembran exprimieren. Der JAM-A Rezeptor auf Thrombozyten kann zudem über sJAM-A als Brückenmolekül an das JAM-A auf der Endothelzelloberfläche binden und somit die Adhäsion von Thrombozyten an inflammatorischem Endothel fördern. Zudem konnte unter Abschnitt 3.2 bewiesen werden, dass sJAM-A einen prothrombotischen Effekt auf die Thrombozyten ausübt. Daraufhin stellte sich die Frage, bei welchen Interaktionen bei inflammatorischen Prozessen Thrombozyten beteiligt sind und wie sJAM-A das thromboinflammatorische Potential von Thrombozyten beeinflussen kann.

Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten, im Blut zirkulierende Zellen des phygozytotischen Systems, spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie kann zur Sekretion proinflammatorischer Substanzen führen und die Adhäsion von Monozyten an entzündlich verändertem Endothel begünstigen, wie unter 1.1.2 beschrieben. Des Weiteren werden Monozyten zur zellulären Immunabwehr gezählt und können pathologisch veränderte, körperfremde Zellen oder auch Thrombozyten durch Phagozytose beseitigen. Anschließend differenzieren sich Monozyten nach zellulärer Interaktion durch Adhäsion und Aggregatbildung mit Thrombozyten in Makrophagen oder Schaumzellen aus; Zellen, die bei entzündlichen Geschehen teilhaben.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion und Aggregatbildung zwischen Monozyten und Thrombozyten und auch später die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen sJAM-A- abhängig untersucht.

3.3.1 sJAM-A unterstützt die Monozyten-Thrombozyten Aggregatbildung

Um speziell die Auswirkungen des sJAM-A auf entzündliche Vorgänge und damit den Einfluss von sJAM-A auf das inflammatorische Potential von Thrombozyten zu untersuchen, wurde zunächst ein Versuch zur Monozyten-Thrombozyten Interaktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie generiert. Die zelluläre Interaktion basierend auf der Aggregation von Monozyten und Thrombozyten ist der erste Schritt im Prozess der

Phagozytose mit darauffolgender Differenzierung der Monozyten in Makrophagen – ein wichtiger Part entzündlicher Geschehen.

Um die Aggregatformation zu analysieren, wurden im ersten Schritt Monozyten isoliert und PRP von humanen, gesunden Spendern hergestellt. Die Aggregate, bestehend aus Monozyten und Thrombozyten, können mittels anti-CD42b und anti-CD14 Antikörpern markiert werden. Der anti-CD42b Antikörper fungiert als Erkennungsmerkmal für Thrombozyten, der anti-CD14 Antikörper als Monozytenindikator und die Kombination aus beiden Antikörpern, dargestellt als CD42b⁺CD14⁺ Population, bestätigt die Thrombozyten-Monozyten-Coaggregatbildung in der durchflusszytometrischen Erfassung. Als Ausgangswert diente die Auswertung einer unbehandelten Monozyten-Thrombozyten Probe. Nach dreißigminütiger Inkubation der Proben, bestehend aus Monozyten und Thrombozyten mit antiJAM-A Antikörper oder seiner entsprechenden IgG Kontrolle, wurden die Zellen mit JAM-A D1 oder JAM-A D1D2 versehen und für 1h unter Lichtabschluss belassen. Während der letzten 30 min der Inkubationszeit der Proteine wurden die Zellen mit anti-CD42b FITC und anti-CD14 APC gelabelt.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ergaben, dass, die durch sJAM-A verstärkte Exposition von Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche, welches als Phagozytosesignal für Monozyten dient und daher auch die Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten zur Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten erleichtert (Abbildung 28).

Mit sJAM-A vorbehandelte Thrombozyten exponieren wie in 3.2.5 beschrieben vermehrt PS auf ihrer Membranoberfläche und bilden daraufhin vermehrt Monozyten-Thrombozyten-Aggregate, was durch durchflusszytometrische Messung von CD42b⁺CD14⁺ Population bewiesen wurde. Unter Verwendung des antiJAM-A Antikörpers konnte die Aggregatformation signifikant verhindert werden. Diese durch den Antikörper ausgeübte Inhibition spricht für eine homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche, die durch den Antikörper blockiert werden kann.

Resümierend wurde die Monozyten-Thrombozyten-Aggregatformation durch Zugabe von sJAM-A, JAM-A D1 und JAM-A D1D2, gesteigert und in Gegenwart des antiJAM-A-Antikörpers reduziert. Dadurch konnte erneut zusätzlich zu diesen

Ergebnissen gezeigt werden, dass die membrandistale D1 Domäne des JAM-A Moleküls für die Steigerung der Aggregatformation zwischen Thrombozyten und Monozyten verantwortlich ist.

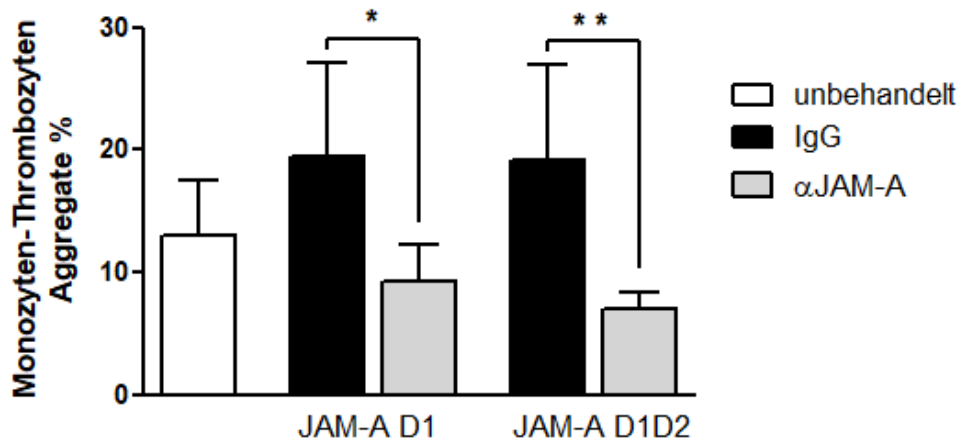


Abbildung 28: Balkendiagramm der FACS-Daten zur Monozyten-Thrombozyten Aggregatformation (n=4). Gezeigt wird der relative Prozentsatz von CD42+CD14+ Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. Das Signifikanzniveau der Reduktion der Aggregatformation unter Antikörper antiJAM-A (αJAM-A) Einsatz wird durch *(P<0,05) und **(P<0,01) verdeutlicht. Die Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.3.2 sJAM-A verstärkt die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten

Die Phagozytose von Thrombozyten beschreibt den spezifischen Prozess der Ingestion von Blutplättchen, die sich am Ende im Zellinneren der Monozyten befinden, abgebaut und damit eliminiert werden. Der Prozess beginnt mit der Coaggregatbildung, die Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten über beispielsweise Interaktionen zwischen Integrinen beider Zellen oder die Phosphatidylserinexternalisation als Erkennungssignal der zu phagozytierenden Zelle (siehe 3.2.5 und 3.3.1).

Um die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten zu analysieren und sicher feststellen zu können, müssen daher bei den durchflusszytometrischen Messungen Populationen registriert werden, die die Existenz von Thrombozyten, in der Durchflusszytometrie dargestellt als CD42b+ Zellen, im Zellinneren von Monozyten beweisen. Dazu wurde ein spezielles durchflusszytometrisches Verfahren zur

Identifizierung intrazellulärer CD42b+ Zellen etabliert und hierfür im Rahmen meiner Dissertation angewandt.

Nach Isolation der Monozyten und Thrombozyten von gesunden, humanen Spendern werden die Thrombozyten zuerst mit antiJAM-A Antikörper oder der entsprechenden IgG Kontrolle und im Anschluss mit sJAM-A inkubiert. Die Thrombozytenmarkierung erfolgt mittels dem fluoreszenzkonjugierten Thrombozytenmarker CD42b- FITC. Die Datenerfassung am Durchflusszytometer erfolgt einmal vor und einmal nach Trypan Blue Färbung der verschiedenen experimentellen Proben. Trypan Blue fängt das Fluoreszenzsignal, das von der Zelloberfläche stammt, ab und entfernt dadurch das gesamte Fluoreszenzsignal, das von fluoreszenzgelabelten adhärenen Thrombozyten an der Zelloberfläche der Monozyten stammt. Die phagozytierten Thrombozyten, die sich im Zellinneren der Monozyten befinden, sind jedoch weiterhin durch ihr Fluoreszenzsignal durchflusszytometrisch registrierbar.

Zur Generierung eines Vergleichwertes wurde die durchflusszytometrische Messung von durch Monozyten phagozytierten Thrombozyten mit unbehandelten, das heißt nicht mit sJAM-A vorinkubierten, Thrombozyten vorgenommen.

Abbildung 29 repräsentiert die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Die Daten beweisen, dass Monozyten verstärkt mit sJAM-A vorbehandelte Thrombozyten phagozytieren, deren PS Externalisation durch diese Vorbehandlung induziert und gesteigert wurde. Diese Steigerung der Phagozytose kann durch Gebrauch des antiJAM-A Antikörpers, der den membranständigen JAM-A Rezeptor blockiert, signifikant gesenkt werden. Auch hier wurden gleiche Ergebnisse unter Einsatz des JAM-A D1 oder JAM-A D1D2 erzielt, wodurch die membrandistalen D1 Domäne des JAM-A Moleküls zur gesteigerten Phagozytose der Thrombozyten beiträgt.

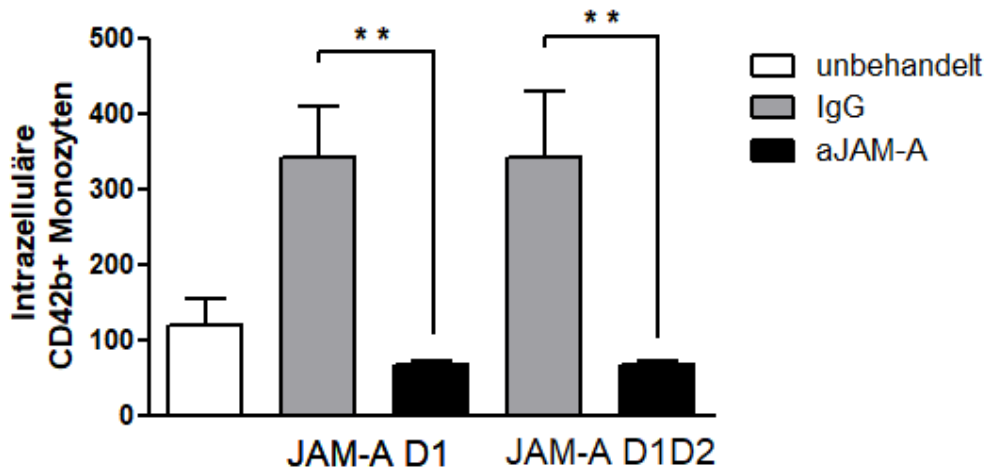


Abbildung 29: Balkendiagramm der FACS Analyse zur Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten (n=5). Auf der y-Achse abgebildet ist der Prozentsatz der CD42b+ Monozyten, die vermehrt phagozytierte Thrombozyten nach Inkubation mit sJAM-A aufweisen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. **($P < 0,01$) zeigt die Signifikanz der Reduktion der Phagozytose in Gegenwart des antiJAM-A Antikörpers (aJAM-A). Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte der MFI \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen wird durch sJAM-A gefördert

Nach diesen neuen Erkenntnissen, dass sJAM-A die Externalisation von PS, dem „eat-me“-Signal auf der Thrombozytenoberfläche steigert, folglich die Aggregatbildung von Thrombozyten und Monozyten vereinfacht und somit die Phagozytose von Blutplättchen durch Monozyten vorantreibt, war die Überlegung in wieweit sJAM-A auch die Monozytendifferenzierung beeinflusst und damit zum inflammatorischen Prozess beiträgt. Um dieser Überlegung auf den Grund zu gehen, wurde eine Thrombozyten-Monozyten-Cokultur angelegt, um die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen zu beobachten. Ein Teil der Thrombozyten wurde dafür zuerst mit dem Antikörper antiJAM-A oder seiner entsprechenden IgG Kontrolle und danach mit den sJAM-A Proteinen JAM-A D1 und JAM-A D1D2 vorbehandelt. Der andere Teil der Thrombozyten wurde ausschließlich mit sJAM-A behandelt. Um einen Ausgangswert zum Vergleich anzufertigen, wurde eine Probe der Monozyten-Thrombozyten Cokultur komplett unbehandelt angelegt. Nach zehntägiger gemeinsamer Inkubation der Monozyten mit den Thrombozyten wurden unter dem Mikroskop Fotos der Zellen

angefertigt. Diese Fotos sind repräsentativ in Abbildung 31 zu sehen. Die kleinen Zellen entsprechen den Thrombozyten, die großen Zellen den Makrophagen, die sich aus Monozyten durch Ingestion der umliegenden Thrombozyten entwickelt haben. Deutlich dargestellt in Abbildung 30 ist auch die Fläche, die noch vor der zehntägigen Inkubation vollständig mit Thrombozyten belegt war und nach den zehn Tagen von den Monozyten „leergefressen“ wurde und somit frei von Zellen ist.

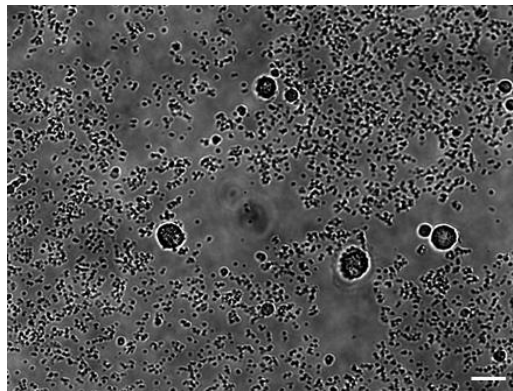


Abbildung 30: Repräsentatives Hellfeld-Phasenkontrastbild der Monozytendifferenzierung in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten-Cokultur nach 10 Tagen Inkubation. Thrombozyten wurden nicht vorbehandelt. Die kleinen Gebilde entsprechen den Thrombozyten, die größeren Zellen den Makrophagen nach Ingestion der umliegenden Blutplättchen. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Zur quantitativen Analyse der Monozytendifferenzierung wurden die Fotos ausgewertet und die differenzierten Monozyten, die sich jetzt Makrophagen nennen, ausgezählt. Die Datenauswertung ist in Abbildung 32 sichtbar.

Durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit sJAM-A steigt die Zahl der ausdifferenzierten Makrophagen an. In Gegenwart des antiJAM-A Antikörpers ist im Vergleich zur entsprechenden IgG Kontrolle eine signifikante Reduktion der Makrophagenanzahl gezeigt, die durch Inhibition der homophilen Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A, basierend auf der Blockade mit dem antiJAM-A Antikörper, zum Tragen kommt.

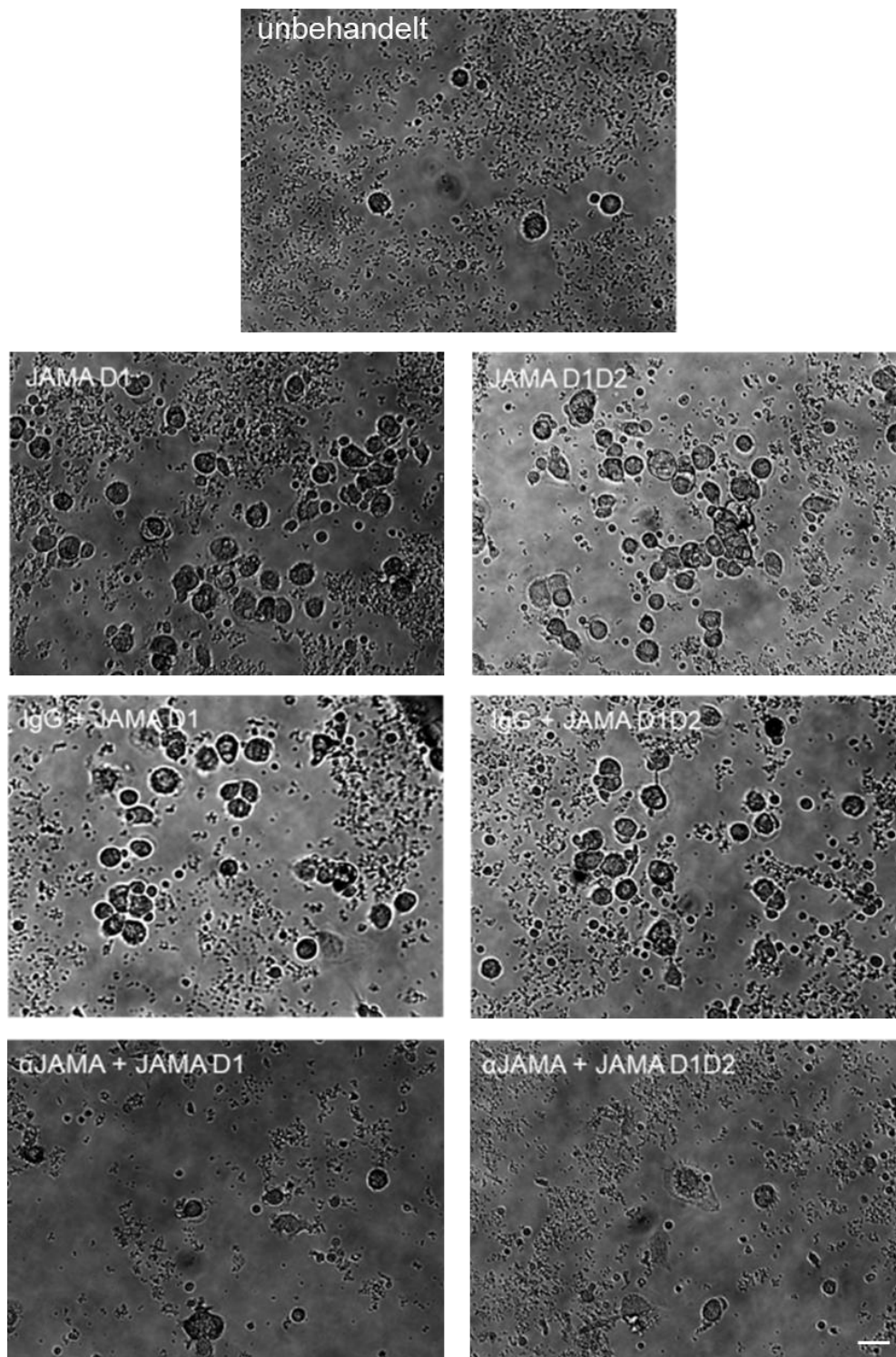


Abbildung 31: Repräsentative Hellfeld-Phasenkontrastbilder der Monozytendifferenzierung in Makrophagen in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten-Cokultur nach 10 Tagen Inkubation (n=10). Die dargestellten Makrophagen, in Form der großen Zellen, haben sich durch Phagozytose der Thrombozyten, zu sehen in Form der kleinen Zellen, aus Monozyten entwickelt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

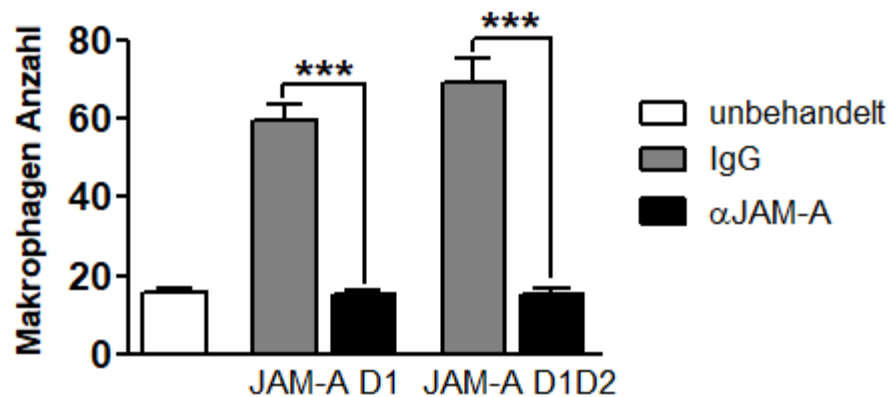


Abbildung 32: Balkendiagramm aus Daten der ausgezählten Makrophagenanzahl nach Analyse der Monozytendifferenzierung in Makrophagen in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten-Cokultur nach 10 Tagen Inkubation (n=10). Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. ***($p < 0,001$) beweist die Signifikanz der Reduktion der Anzahl an sich entwickelten Makrophagen unter Einsatz des antiJAM-A Antikörpers (α JAM-A). Die Daten stammen aus 10 unabhängigen Experimenten.

Bei Verlängerung der Inkubationszeit der Monozyten-Thrombozyten Cokultur auf 12-15 Tage kam es zu einer anschließenden Differenzierung der Monozyten in Schaumzellen. Schaumzellen wurden mit Hilfe der Oilred-Färbung visualisiert und sind in Abbildung 33 als rötliche Zellen zu erkennen. Die Rotfärbung entsteht durch Färbung der aufgenommenen Lipide durch die Makrophagen.

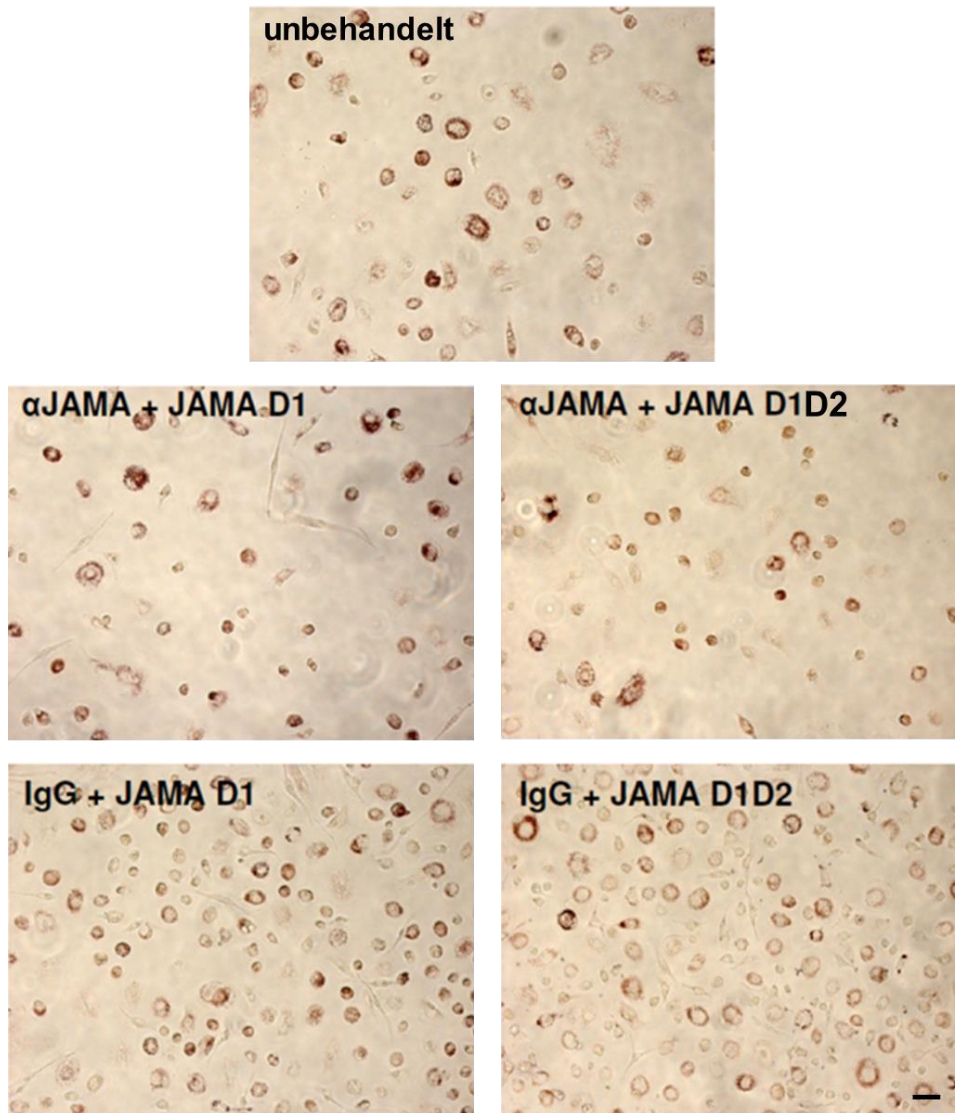


Abbildung 33: Repräsentative Bilder zur Monozytendifferenzierung in Schaumzellen nach Anlage einer Monozyten-Thrombozyten Cokultur in Oilred-Färbung (n=5). Schaumzellen sind Oilred positive Zellen und daher als rötliche Zellen festgehalten, da die Ablagerung oder Anhäufung von Lipidtröpfchen in ihnen sich durch Oilred rötlich anfärben lassen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. Maßstab = 5µm

Bei der visuellen Analyse der Monozytendifferenzierung in Schaumzellen fällt eine erhöhte Anzahl an Schaumzellen bei Proben mit einer Präinkubation der Thrombozyten mit sJAM-A auf. Als Ausgangswert wurden die Ergebnisse der unbehandelten Probe, das heißt der reinen Monozyten-Thrombozyten Cokultur, herangezogen. Des Weiteren ist zu sehen, dass nach Verwendung des antiJAM-A Antikörpers die Zahl der ausdifferenzierten Schaumzellen drastisch sinkt.

Nach quantitativer Auswertung durch Auszählen der sich entwickelten Schaumzellen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Ein signifikanter Anstieg in der Anzahl der Schaumzellen nach sJAM-A Behandlung der Thrombozyten wurde nachgewiesen. Weiterhin konnte durch Verwendung des antiJAM-A Antikörpers ein Abfall der Schaumzellzahl bestätigt werden. Der antiJAM-A Antikörper blockiert den transmembranen JAM-A Rezeptor und verhindert dadurch die homophile Interaktion mit dem löslichen sJAM-A und deren vorbeschriebene Wirkung der PS Externalisation auf der Thrombozytenoberfläche als Phagozytosesignal.

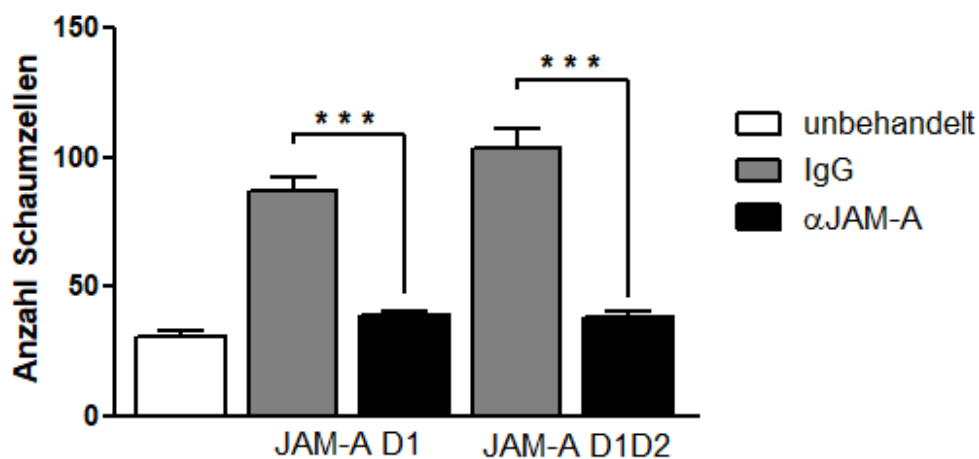


Abbildung 34: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Monozytendifferenzierung durch Auszählung der Schaumzellen (n=5). Gezählt wurden die sich in Schaumzellen differenzierten und positiv für die Ölrot Färbung rötlich dargestellten Zellen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Thrombozyten verwendet. ***($P < 0,001$) zeigt die Signifikanz der antiJAM-A Antikörper Wirkung. Die Daten stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von sJAM-A in einer Thrombozyten-Monozyten-Cokultur Installation die phagozytotische Clearance von aktivierten Thrombozyten durch Monozyten und die darauffolgende Differenzierung und Entwicklung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen fördert. Die Vorbehandlung der Thrombozyten mit sJAM-A führt in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten Cokultur zur gesteigerten Externalisation von Phosphatidylserin mit anschließender Phagozytose durch die Monozyten, die sich

dadurch in Makrophagen und Schaumzellen differenzieren. Die Thrombozyten-Monozyten Interaktion mit daraus entstehender Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen konnte gleichermaßen unter Einsatz des JAM-A D1 sowie unter JAM-A D1D2 verzeichnet werden, wodurch zum wiederholten Male der membrandistalen Domäne D1 des JAM-A Moleküls diese Steigerung der Monozytendifferenzierung zuzuschreiben war. Der blockierende antiJAM-A Antikörper konnte die Thrombozyten-Monozyten Interaktion hindern, zu sehen an der signifikant reduzierten Zellzahl der sich entwickelten Makrophagen und Schaumzellen.

4. Diskussion

Die Ergebnisse meiner Arbeit werden im folgenden Abschnitt der Dissertation diskutiert und in den wissenschaftlichen Konsens gebracht.

Das Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A/JAM1/F11R) ist ein transmembranöses Zelladhäsionsglykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das auf epithelialen, endothelialen, peripheren blutbildenden Zellen wie Thrombozyten und Leukozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird [128, 134, 140]. Das JAM-A/JAM1/F11R Molekül ist Gegenstand vieler Forschungsgruppen weltweit, wodurch sein Aufbau, die Funktion und Prozessmodulation bereits zu Teilen exploriert wurde [127, 130, 198].

JAM-A/JAM1/F11R spielt nachweislich bei vielen Prozessen in unserem Körper wie der Hämostase und Zellphysiologie eine bedeutende Rolle.

So bildet JAM-A/JAM1/F11R als apikal gelegene Transmembrankomponente und Zelladhäsionsmolekül durch homophile Wechselwirkungen mit der Nachbarzelle interzelluläre Kontakte, beispielweise Tightjunctions, aus, stabilisiert Zellverbindungen, verringert die transendothelialen Leukozytenmigration durch Reduktion der vaskulären und parazellulären Permeabilität von Endothelzell- oder Epithelzellschichten, beeinflusst die endotheliale oder epitheliale Zellorganisation, reguliert damit die Barrierefunktion und beteiligt sich an der Genese der apikal-basalen Polarität [128, 136, 137, 139, 141, 142].

Darüber hinaus forciert membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R die Anhaftung von Thrombozyten und mononukleären Zellen an inflammatorisch verändertem und folglich vermehrtem JAM-A/JAM1/F11R exprimiertem Endothel und ist dadurch an der Initiierung der Plaquebildung bei der Atherogenese beteiligt [130].

In vitro und *in vivo* Untersuchungen an Mäusen ergaben, dass die Entstehung von Arteriosklerose durch eine beeinträchtigte JAM-A/JAM1/F11R Expression auf Endothelzellen, welche zu einer reduzierten mononukleären Zellrekrutierung in der Arterienwand führt, begrenzt wird [129, 134, 137, 145, 149, 152]. Ostermann et al. konnten durch Verwendung eines blockierenden löslichen JAM-A nachweisen, dass die Akkumulation von mononukleären Zellen und die endotheliale Leukozytenadhäsion dadurch gehemmt wird [152]. Das membranassoziierte JAM-A/JAM1/F11R kann somit

als Akteur bei der vaskulären Inflammation und in frühen atherosklerotischen Phasen angesehen werden.

Bei KHK Patienten konnte ferner in instabilen arteriosklerotischen Plaques eine Überexpression an JAM-A/JAM1/F11R mit gesteigerter Makrophageninfiltrationen nachgewiesen werden [144, 151]. Dieses Phänomen war auch in arteriellen Plaques von atherosklerotisch gefährdeten Apolipoprotein E defizienten Mäusen festzustellen, wodurch JAM-A/JAM1/F11R eine Beteiligung am atherosklerotischen Prozess und Progress zuzuschreiben war [144, 151, 152, 163]. Das auf Endothelzellen exprimierte JAM-A/JAM1/F11R steuert zudem Entzündungszellen wie Monozyten an, damit diese sich am prädisponierten Ort des atherosklerotischen Geschehens beteiligen [137].

Thrombozyten spielen eine regulatorische Rolle bei der Progression der Artherosklerose bei KHK-Patienten und exprimieren bekanntermaßen JAM-A/JAM1/F11R auf ihrer Oberfläche. Leukozytenadhäsion und Thrombozytenadhäsion mit folgender Thrombozytenaktivierung, Bildung von Blutplättchenaggregaten und mögliche inflammatorische Thrombose folgen auf eine durch JAM-A/JAM1/F11R vermittelte feste Bindung zwischen aktivierten, entzündeten Endothelzellen und Thrombozyten oder Leukozyten [140]. Folglich trägt membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R zur Thrombozyteadhäsion, -aktivierung, -sekretion und -aggregation bei, was zusätzlich unter entzündlichen Bedingungen zu Thrombose und Atherosklerose führen kann [129, 144, 145]. Des Weiteren existieren eine Vielzahl von Studien, die besagen, dass es bei inflammatorischen Prozessen zu einer partiell gesteigerten *de novo* Expression und Umverteilung von JAM-A/JAM1/F11R auf die apikale Oberfläche von entzündetem, atherosklerotischem Endothel kommt [152]. Basierend auf den JAM-A/JAM1/F11R Interaktionen wird die Rekrutierung von Leukozyten, die Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten, die Zelladhäsion und transendotheliale Migration erleichtert und unterstützt und damit der Prozess der Gefäßentzündung forciert [128, 132, 152, 160–162]. Die Verwandlung des Endothels in ein prothrombotisch fungierendes Gewebe führt demzufolge zu einer Prädisposition und Initiation von entzündlicher Thrombose [140].

In weiteren Studien ist von einer homophilen Interaktion zwischen JAM-A/JAM1/F11R Molekülen und einem Dimerisierungspotential von JAM-A/JAM1/F11R zu sprechen [128, 136, 140]. Auf Endothelzellen, Leukozyten und

Thrombozyten werden mehrere homophile und heterophile Interaktionen durch JAM-A/JAM1/F11R unterstützt. Endothelzellverbindungen, mononukleare Zellrekrutierung und Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen werden damit forciert [140].

Somit zeigt JAM-A/JAM1/F11R im Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen nach bisheriger Kenntnis vor allem Auswirkungen auf die Thrombozytenaktivierung und Entzündungsreaktion.

JAM-A/JAM1/F11R kann in Form eines Rezeptors als Transmembranprotein oder in löslicher Form vorliegen [153, 154]. Diese lösliche Form nennt sich soluble JAM-A, sJAM-A, und wird durch Abspaltung der membranassoziierten Form durch Metalloproteasen wie ADAM 17 und ADAM 10 generiert (siehe Abbildung 5).

sJAM-A ist bei multiplen Pathologien wie Inflammation [155], Atherosklerose [151, 163], KHK [151], systemische Sklerose [167] und Hypertonie [156, 157] verstärkt im Blutplasma nachgewiesen worden. Die Beteiligung von sJAM-A bei Entzündungsprozessen wie der Atherosklerose und bei der koronaren Herzkrankheit wird unter Abschnitt 4.1 dargestellt. Auch bei der systemischen Sklerose (SSc), einem inflammatorisch geprägten Prozess, ist von einer JAM-A/JAM1/F11R Beteiligung auszugehen, wie Hou et al. berichtete. Bei SSc-Patienten war im Vergleich zu gesunden Patienten ein erhöhter sJAM-A Serumspiegel nachgewiesen worden, der unter anderem durch Abgabe von sJAM-A durch mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVECs) zu erklären war [167].

Die kardiale Manifestation der Atherosklerose bezeichnet sich als KHK. Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren der KHK zählt unter anderem die arterielle Hypertonie, die, wie Waki et al., auf Untersuchungen an Ratten gestützt, berichtet, durch JAM-A/JAM1/F11R beeinflusst wird. Der Anstieg des systolischen Blutdrucks ist auf die Hochregulation des membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R im Gehirn von Ratten zurückzuführen [168]. JAM-A/JAM1/F11R forciert darüber hinaus die Hypertension bei Ratten aufgrund eines erhöhten peripheren Widerstandes, basierend auf einer vaskulären Inflammation, da die Leukozytenadhäsion vereinfacht wird [152, 169]. Ferner ist auch bei hypertensiven Patienten im Vergleich zu Gesunden sJAM-A im Plasma verstärkt nachgewiesen und korreliert dazu noch mit dem systolischen Blutdruckwerten. Folglich spielt nicht nur die membranassoziierte Form, sondern auch

die lösliche Form von JAM-A/JAM1/F11R eine Rolle in der Pathophysiologie der Hypertonie [156].

Durch Vorarbeiten weiterer Arbeitsgruppen konnte sJAM-A auch funktionelle Aspekte mit Blick auf vaskuläre Inflammation, Atherosklerose und entzündliche Thrombose zugeschrieben werden. sJAM-A besitzt ein Dimerisierungspotential und das Potential eine homophile Interaktion mit JAM-A/JAM1/F11R auszubilden. Adhäsive Eigenschaften zwischen Endothelzellen und Leukozyten, die die Transmigration fördern und damit zum inflammatorischen Fortschritt beitragen und die junktionale Organisation zwischen JAM-A/JAM1/F11R Molekülen kommen damit zu Stande [136].

Der potentielle Effekt und molekulare Mechanismus von sJAM-A auf im Blut zirkulierende Thrombozyten blieb jedoch weiter unentdeckt und wurde daher in Bezug auf die thrombozytäre Funktion im Rahmen der Hämostase, Thrombose und vaskulären Inflammation in der Studie zu meiner Dissertation untersucht.

Zusätzlich stellte sich die Frage, welcher molekulare Mechanismus für den Einflusses von sJAM-A verantwortlich ist.

4.1 sJAM-A als Biomarker und sein pathologischer Stellenwert

Cavusoglu et al. beschreiben eine gesteigerte Expression der membrangebundenen Form von JAM-A/JAM1/F11R auf der Oberfläche von Endothelzellen und gleichzeitig einen erhöhten Plasmaspiegel der löslichen, freigesetzten Form von JAM-A/JAM1/F11R bei entzündlichen Prozessen. So korreliert der sJAM-A Plasmalevelwert positiv mit bekannten Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-6 und Interleukin-10 bei Patienten mit Hämodialyse oder KHK [151, 155].

Auch in experimentellen Arbeiten mit, durch proinflammatorische Zytokine aktivierten, isolierten Endothelzellen aus humanen Gefäßen, konnte neben einer Augmentation von JAM-A/JAM1/F11R-Transkripten auch eine gesteigerte JAM-A/JAM1/F11R Expression und sJAM-A Freisetzung nachgewiesen werden [151]. Diese Ergebnisse untermauern die Annahme, dass die membrangebundene und lösliche Form von JAM-A/JAM1/F11R die Mediation von vaskulärer Inflammation forciert und zum atherosklerotischen Progress beiträgt.

Bei Patienten mit Atherosklerose neigung konnte erneut entzündlich verändertes Endothel mit verstärkter JAM-A/JAM1/F11R Expression auf seiner Oberfläche als Quelle für das lösliche Protein sJAM-A betrachtet werden [151].

Auch in dieser Studie konnte mit Hilfe der Konfokalmikroskopie bestätigt werden, dass entzündlich veränderte und aktivierte Endothelzellen aufgrund einer Zytokinbehandlung mit TNF α und INF γ vermehrt JAM-A/JAM1/F11R exprimieren (siehe Abbildung 10).

Des Weiteren konnte erneut durch Behandlung von Mäusen mit Zytokinen ein erhöhter sJAM-A Plasmaspiegel und eine Aktivitätssteigerung der Metalloproteasen ADAM 10 und ADAM 17 belegt werden [154]. Eine Aktivitätsreduktion verursacht demnach einen verminderten sJAM-A Plasmawert [163]. Bei der Analyse der antiatherogenen Wirkung von Fischöl bei Mäusen wurde beobachtet, dass die Atherosklerose bei LDLR -/- Mäusen mit Fischöl-Fütterung weniger ausgeprägt war und es zudem zu einer Reduktion des zirkulierenden sJAM-A kam [163].

Somit könnte man das endothelial freigesetzte sJAM-A bereits als Biomarker für ein endotheliales inflammatorisches Geschehen ansehen [154].

Der Nachweis, dass membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R nach Aktivierung der Thrombozyten verstärkt auf ihrer Oberfläche exprimiert wird, gelang in meinen Untersuchungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 11).

Zudem ist bei Patienten mit AKS die JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Thrombozytenoberfläche und die sJAM-A Serumlevelwerte im Vergleich zu Patienten mit stabiler AP durchflusszytometrisch gemessen erhöht (siehe Abbildung 13, Abbildung 14). Vor Erfassung dieser Ergebnisse war nur bekannt, dass das membranständige Junctional Adhesion Molecule A auf der Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen existiert [127, 128, 136–140].

Bekannt ist, dass die lösliche Form, das sJAM-A, vom membranständigen Adhäsionsrezeptor JAM-A/JAM1/F11R abstammt und von Metalloproteasen von der Zellmembran abgelöst und somit freigesetzt wird. Dieser Erkenntnis zufolge müsste die Konzentration von zirkulierendem sJAM-A im Blut abhängig von der Expression des JAM-A/JAM1/F11R auf der zellulären Oberfläche sein. Da JAM-A/JAM1/F11R auf Epithelzellen, Endothelzellen und zirkulierenden Blutzellen, wie Thrombozyten, existiert, können diese Zellen als potentielle Quelle für das zirkulierende sJAM-A

angesehen werden. In einer Korrelationsanalyse konnte bewiesen werden, dass Serumspiegel von sJAM-A bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit signifikant mit der erhöhten JAM-A Expression auf der Thrombozytenoberfläche korrelieren (siehe Abbildung 15). Dieser Beweis und der Nachweis, dass die JAM-A Expression nach der Thrombozytenstimulation und bei KHK Patienten signifikant gesteigert ist, untermauert die Hypothese, dass membrangebundenes JAM-A auf der Thrombozytenoberfläche als potentielle Quelle für das zirkulatorische, gelöste sJAM-A bei KHK Patienten gilt. Ferner lässt sich damit auch die Aussage begründen, dass Thrombozyten nach Aktivierung membranassoziertes JAM-A vermehrt exprimieren und es bei Aktivierung zudem abgeben könnten.

Der Plasmaspiegel von löslichem sJAM-A, der durch die Ablösung von JAM-A/JAM1/F11R aus multiplen zellulären Quellen wie Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden oder blutbildenden Zellen zu Stande kommt, ist bei KHK-Patienten nicht nur erhöht sondern entspricht auch dem progressiven Schweregrad der Erkrankung [151]. Das erhöhte Vorkommen von sJAM-A im Serum von Patienten mit koronarer Herzkrankheit und die Korrelation zwischen dem sJAM-A Plasmalevel und dem Vorhandensein und dem angiographisch begutachteten Schweregrad dieser Erkrankung untermauert die Annahme, dass sJAM-A einen prothrombotischen und proinflammatorischen Effekt ausübt. sJAM-A könnte demnach als möglicher neuartiger kardiovaskulärer Risikomarker, Biomarker für das Krankheitsbild der Atherosklerose mit KHK als kardiale Manifestation und als Prädiktor für die frühe KHK Diagnose verwendet werden [151, 155, 157].

4.2 sJAM-A wirkt prothrombotisch

Die Zunahme der JAM-A/JAM1/F11R Expression auf aktivierten Thrombozyten gesunder Spender, auf Thrombozyten stammend von KHK-Patienten und auf inflammatorisch veränderten Endothelzellen und die Erhöhung des im Serum nachgewiesenen löslichen und von der Thrombozytenoberfläche abgespaltenen Proteins sJAM-A bei KHK-Patienten [151] lässt darauf schließen, dass beide Formen des JAM-A/JAM1/F11R erheblich zum bereits bekannten hyperaktiven Status der zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten mit AKS und stabiler AP beitragen,

Einflüsse auf Thrombozytenfunktion und Endothelzustand ausüben und somit pathophysiologische Prozesse der Atherosklerose im speziellen am Herzen, dort KHK genannt, bedienen. Bei Bestehen von Atherosklerose, einem Zustand vaskulärer endothelialer Inflammation, sind die sJAM-A Serumwerte signifikant erhöht [151]. Zudem ist bekannt, dass die Progression der Erkrankung entscheidend von der Aktivität der Thrombozyten geprägt ist [199, 200]. Mäuse mit einem genetischen Mangel an membrangebundenem JAM-A/JAM1/F11R wiesen eine thrombozytäre Hyperreaktivität und ein erhöhtes thrombotisches Risiko auf [129, 134, 145, 148–150]. Endotheldefekte aufgrund von vaskulärer Inflammation bringt die Aktivierung von Thrombozyten mit sich und führt somit folgend zu Thrombosen und thromboischämischen Okklusionen [170, 171, 199, 200], die letztendlich zum Krankheitsbild der KHK führen. Des Weiteren besteht die Annahme, dass sJAM-A eine homophile Interaktion mit dem membranassoziierten thrombozytären JAM-A/JAM1/F11R eingehen kann [134, 145].

Auf diesen Erkenntnissen basierend kristallisierte sich die Fragestellung heraus ob und vor allem wie sJAM-A die Eigenschaft von Blutplättchen beeinflusst. Um diesen Einflüssen von sJAM-A genauer auf den Grund zu gehen und vor allem den molekularen Mechanismus dahinter zu verstehen, wurden in der Studie zu meiner Dissertation zahlreiche Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion durchgeführt.

Es folgte die Untersuchung des Einflusses von sJAM-A auf die Hauptfunktion von Thrombozyten, der Blutstillung. Dazu betrachteten wir anfangs einen der ersten Schritte der zellulären Hämostase, die Adhäsion der Thrombozyten an Endothelium.

In Vorarbeiten wurde JAM-A/JAM1/F11R bereits als unterstützend für die zellulären Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen bezeichnet [128, 129, 134, 145, 201]. Babinska et al. hat gezeigt, dass unaktivierte Thrombozyten nur an stimulierte Endothelzellen binden und die Bindungsrate durch Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen gesteigert werden konnte. Durch Untersuchungen mit einem synthetisierten löslichen und blockierenden rekombinanten JAM-A wurde bewiesen, dass die Thrombozytenadhäsion an inflammatorisch stimulierte Endothelzellen mit resultierender gesteigerter JAM-A/JAM1/F11R Expression inhibiert und reduziert werden konnte [140]. Zusätzlich gelang der Beweis, dass die Adhäsion von Thrombozyten mit JAM-A/JAM1/F11R Assoziation auf ihrer Oberfläche an einer immobilisierten Matrix aus rekombinantem löslichem JAM-A im Vergleich zur

Thrombozytenadhäsion an Rinderserumalbumin verstärkt dargestellt war. Durch Stimulation der Thrombozyten mit natürlichen Agonisten kam es zu einem weiteren Anstieg der Anzahl der adhärenen Blutplättchen [140]. Festzuhalten ist, dass durch die JAM-A/JAM1/F11R Expression auf der Oberfläche von Endothelzellen für Thrombozyten die Möglichkeit entsteht, sich über ihren JAM-A/JAM1/F11R Rezeptor an Endothelzellen zu binden.

Erste Experimente dieser Dissertation zur Thrombozytenfunktion zeigten, dass Thrombozyten über ihr membrangebundenes JAM-A/JAM1/F11R auf einer mit sJAM-A beschichteten Oberfläche oder an inflammatorisch aktivierte Endothelzellen, die durch die Aktivierung vermehrt JAM-A/JAM1/F11R exponieren, adhären und sich ausbreiten. Die Adhäsionsrate an Endothelzellen konnte durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit sJAM-A zusätzlich gesteigert werden im Vergleich zur Thrombozytenadhäsion an inflammatorische Endothelzellen ohne Einsatz der Proteine. Dies lässt darauf schließen, dass sJAM-A als Brückenmolekül oder Verbindungsmolekül zwischen JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche und auf der Endothelzelloberfläche fungiert und somit die Adhäsion begünstigt.

Deutlich gemacht wurden diese Ergebnisse mit Hilfe der Konfokalmikroskopie, Flusskammer und Photometrie (siehe 3.2.1). Die Anzahl adhärenter Thrombozyten konnte durch Einsatz des antiJAM-A Antikörpers, der JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche und auf aktivierten Endothelzellen blockiert, reduziert werden. Somit konnte die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R durch Blockade dieser Bindungsstelle durch den Antikörper für die Adhäsionssteigerung verantwortlich gemacht werden. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass aktivierte inflammatorische Endothelzellen nicht nur als sJAM-A Quelle fungieren sondern durch die gesteigerte Expression von membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R auch in großem Maße zur Thrombozytenadhäsion über die homophile Interaktion zwischen JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche und Endothelzelloberfläche oder durch Verbindung dieser über das Brückenmolekül sJAM-A beitragen.

Die Ergebnisse weiterer durchflusszytometrischer Versuche erbrachten den Nachweis, dass sJAM-A ebenfalls die agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung und Degranulation verstärkt. Die Aktivierung der Thrombozyten folgt

physiologischerweise auf die Adhäsion der Blutplättchen an Endothelzellen. Durch Zugabe eines anti-JAM-A Antikörpers, der das auf der Thrombozytenoberfläche assoziierte JAM-A/JAM1/F11R blockieren kann, konnte dieser stimulatorische Effekt essentiell gehemmt werden, indem die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und dem membranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R inhibiert wurde.

Diese neuen Kenntnisse belegen, dass sJAM-A eine homophile Interaktion mit dem thrombozytenmembranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche eingehen kann und damit synergistisch die agonisteninduzierte Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten über den α Ib β 3-Integrin Signalweg induziert und antreibt, indem es den Outside-In Signalling Weg verstärkt. Die synergistisch gesteigerte Thrombozytenaktivierung und Degranulation war unter Verwendung des natürlichen Thrombozytenagonisten TRAP zu verzeichnen. Die Ergebnisse begründen daher, dass für die gesteigerte Thrombozytenaktivierung und -degranulation die Kombination aus dem Mechanismus der homophilen Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R mit der Anwendung von TRAP als Trigger in einer Konzentration unter dem Schwellenwert verantwortlich ist.

Als nächsten Schritt der zellulären Hämostase und anschließend an die Aktivierung und Degranulation folgen zunächst die Aggregation der Blutplättchen und danach die Bildung eines Thrombus - unsere nächsten beiden Untersuchungsziele mittels Impedanzaggregometrie und Flusskammer. Der Thrombus besteht aus einem dreidimensionalen Gebilde aus vernetzten Thrombozyten, die durch Brückenmoleküle wie Fibrin eine stabile Bindung eingehen. Er führt zur vollständigen Abdeckung des Endotheldefekts und damit zur Blutstillung.

Die Thrombozytenaggregation wurde mit Hilfe der Impedanzaggregometrie und des natürlichen Thrombozytenagonisten TRAP untersucht. Die beiden sJAM-A Moleküle (JAM-A D1 und JAM-A D1D2) führten zusätzlich zu TRAP zu einer weiteren Steigerung der Aggregation, die durch Gebrauch des antiJAM-A Antikörpers, annulliert werden konnte (siehe 3.2.3). Der antiJAM-A Antikörper dient auch hier der Blockade des membranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R. Damit wurde erwiesen, dass sJAM-A die agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation signifikant steigert. sJAM-A übt dabei einen synergistischen Effekt auf die Bildung von Thrombozytenaggregaten aus -

ein Prozess, bei dem die α Ib β 3-Integrinaktivierung und Thrombozytendegranulation eine zentrale Rolle spielen. Dieser auf sJAM-A basierende stimulatorische Effekt auf die Thrombozytenaggregation wurde durch den antiJAM-A Antikörper essentiell und signifikant gehemmt (siehe Abbildung 23). So lässt sich sagen, dass sJAM-A durch die homophile Bindung an JAM-A/JAM1/F11R die agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation steigert.

Auch einer der letzten Schritte im Prozess der Hämostase, die Formation eines zuerst instabilen und dann stabilen Thrombus, wird durch sJAM-A positiv beeinflusst. Nach Behandlung des humanen Vollblutes mit sJAM-A war eine verstärkte Thrombusformation zu sehen. Dieser Vorgang wurde unter Einsatz des antiJAM-A-Antikörpers wiederholt, um die zu erwartende Reduzierung der Thrombusformation deutlich zu machen. So nahm die Thrombenbildung, untersucht mittels Flusskammer, bei Inkubation der Thrombozyten mit sJAM-A signifikant zu und unter Inkubation mit dem antiJAM-A Antikörper signifikant ab (siehe 3.2.4 Abbildung 25).

Weitere durchflusszytometrische Ergebnisse zeigten auch, dass sJAM-A die Externalisation von PS auf der Thrombozytenoberfläche und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials forciert – beides Vorgänge, die einerseits zur prokoagulatorischen Funktion der Thrombozyten beitragen, indem beispielsweise PS die Thrombinbildung begünstigt und somit zur Stabilisierung des Thrombus führt und andererseits Indikatoren für die Thrombozytenapoptose darstellen. Durch Verwendung des antiJAM-A Antikörpers, der das transmembranöse JAM-A/JAM1/F11R blockiert und somit die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R inhibiert, konnte die sJAM-A abhängige Steigerung der PS Externalisation und der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials verhindert werden (siehe 3.2.5 Abbildung 26, Abbildung 27), wodurch die homophile Interaktion für den Effekt verantwortlich gemacht werden konnte. Die unterstützende Wirkung von sJAM-A ist hier bei bereits alleiniger Behandlung der Zellen mit den löslichen JAM-A Proteinen ohne Agonisteninduktion zu verzeichnen. Durch die kombinierte Stimulation der Blutplättchen mit sJAM-A und TRAP, einer natürlichen Thrombozytenstimulanz, übt sJAM-A einen synergistischen, positiven Effekt aus.

Summa summarum führt die sJAM-A Interaktion, eine homophile Bindung zwischen der löslichen und der membrangebundenen Form von JAM-A/JAM1/F11R

auf der Thrombozytenoberfläche, zu einer deutlichen Steigerung der aktivierungsabhängigen Thrombozytenaggregation und der anschließenden Thrombusformation mit Thrombusstabilisierung. Damit wird das auf sJAM-A basierende erhöhte thrombotische und prokoagulatorische Potential bei der primären und sekundären Hämostase, mit Ziel der Formation eines stabilen Thrombus, bestätigt.

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Bedeutung von membrangebundenen JAM-A/JAM1/F11R im Zusammenhang mit thrombozytenkludierenden Prozessen und zeigten, dass die genetische Deletion von JAM-A/JAM1/F11R bei Mäusen zu prothrombotischen und atherogenen Folgen führt. Studien mit einer Thrombozyten-Megakaryozyten-Abstammungslinie von Mäusen, bei denen eine genetische Ablation von JAM-A/JAM1/F11R erfolgte, wiesen eine erhöhte thrombotische und aggregatorische Reaktion auf, obwohl die Degranulation, Thromboxan A₂ Produktion und Fibrinogenrezeptor-Aktivierung in JAM-A/JAM1/F11R defizienten Blutplättchen nicht betroffen waren [146]. Die genetische Deletion von JAM-A/JAM1/F11R führt zu einem hyperaktiven Zustand der Thrombozyten, gezeigt anhand eines signifikant gesteigerten Integrin Outside-In Signalweges in Form von Thrombozytenspreading und Gerinnselbildung in JAM-A/JAM1/F11R defiziente Thrombozyten [146]. Insgesamt scheint somit das membrangebundene JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche ein regulatorischer endogener Inhibitor der Thrombozytenfunktion zu sein.

Der Funktionsgewinn bei Thrombozyten aufgrund der genetischen Ablation von JAM-A/JAM1/F11R führte des Weiteren zu einer Zunahme der Plaquebildung, insbesondere in frühen Stadien der Atheroprogression bei den trJAM-A (-/-) ApoE (-/-) Mäusen im Vergleich zu ApoE (-/-) Mäusen. In den Plaques kam es zudem zu einer verstärkten Infiltration von Makrophagen und T-Zellen und der Anteil von glatten Muskelzelle stieg. Eine Zunahme von Thrombozyten-Monozyten oder Thrombozyten-Neutrophilen Assoziationen und auch die verstärkte Rekrutierung von Thrombozyten und Monozyten durch inflammatorisches Endothelium in vivo konnte verzeichnet werden [149]. All diese in der Literatur vorbestehenden und neuen experimentellen Beweise deuten auf die Möglichkeit hin, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von zirkulierendem sJAM-A über die homophile Interaktion mit JAM-A/JAM1/F11R eine tiefgreifende prothrombotische Wirkung ausüben, indem sie die

Thrombozytenadhäsion, -aktivierung, -degranulation, -aggregation und letztendlich die Bildung eines stabilen Thrombus unterstützen.

4.3 sJAM-A wirkt proinflammatorisch

Da sJAM-A die Aktivität von Thrombozyten und ihr thrombotisches Potenzial synergistisch verbessert, bewiesen durch die vorherigen Ergebnisse, wurden im nächsten Schritt meiner Dissertation die Auswirkungen von löslichem JAM-A auf ein weiteres thrombozytäres Attribut, die Beteiligung von Blutplättchen an inflammatorischen Vorgängen in unserem Körper, untersucht [202]. Dabei wurde, wie bereits Chatterjee et al. vorbeschrieben, ein besonderes Augenmerk auf die Steuerung und Regulierung der Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen geworfen [28].

Wie sich die Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten gestalten kann, wird unter Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3 genauer erläutert. Warum die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten so wichtig ist wird im Folgenden nochmals kurz erklärt. Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen, gehören dem phagozytotischen Systems unseres Körpers an und sind bei inflammatorischen Prozessen von großer Relevanz indem sie durch Sekretion immunmodulatorische und proinflammatorische Substanzen wie Zytokine und Chemokine die Entzündungsvorgänge unterstützen. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort, da sie zur Phagozytose, einer speziellen Form der Beseitigung von pathologisch veränderten, körperfremden oder apoptotischer Zellen fähig sind. Monozyten wandern dazu aus dem Blutkreislauf ins Gewebe ein und differenzieren sich dort nach zellulärer Interaktion durch Adhäsion und Aggregatbildung mit folgender Internalisierung und Abbau der beispielsweise apoptotischen Zellen in Makrophagen und Schaumzellen aus.

In der Literatur vorbeschrieben ist bereits die unterstützende Wirkung von JAM-A/JAM1/F11R auf die zellulären Interaktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten [128, 129, 134, 145, 201]. Darüber hinaus konnte bereits der Zusammenhang zwischen einem erhöhten sJAM-A Plasmalevel und inflammatorischen, ischämischen Prozessen wie der Atherosklerose ermittelt werden [151, 155].

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit als Erstes die Interaktion in Form von Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten und Aggregatbildung zwischen

Monozyten und Thrombozyten und später auch die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen genauer betrachtet.

Die Thrombozyten - Monozyten Interaktion führt neben der gegenseitigen Aktivierung mit Sekretion proinflammatorischer Mediatoren zur Einleitung des Phagozytoseprozesses von Thrombozyten. Die Phagozytose startet mit der Coaggregatbildung, die Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten über beispielsweise Rezeptorinteraktionen mit externalisiertem PS auf der Thrombozytenoberfläche und endet letztendlich in der monozytären Ingestion der Thrombozyten, die im Zellinneren der Monozyten abgebaut und damit auch eliminiert werden, bevor sie einen inflammatorischen Vorgang auslösen könnten.

Auch hier konnte mit einem durchflusszytometrischen Versuch gezeigt werden, dass sJAM-A die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten steigert und damit die interzelluläre Interaktion zwischen Blutplättchen und Monozyten forciert. Unter Verwendung des antiJAM-A Antikörpers, der durch Blockade die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche verhindert, konnte die Aggregatformation signifikant inhibiert werden (2.3.13 Abbildung 28). Somit lässt sich erneut die Relevanz der homophilen Interaktion zwischen löslichem JAM-A und membrangebundenem JAM-A/JAM1/F11R für die Thrombozyten Monozyten Interaktion in einem inflammatorischen Setting ableiten.

Im nächsten Schritt der Phagozytose folgen auf die Aggregatbildung die Internalisierung und der Abbau der Zellen im Inneren des Monozyten. Die durchflusszytometrisch erhobenen Daten beweisen, dass Monozyten verstärkt mit sJAM-A vorbehandelten Thrombozyten phagozytieren, was unter anderem auf die sJAM-A getriggerte PS Externalisation zurückgeführt werden könnte. Diese Steigerung der Phagozytose kann durch den antiJAM-A Antikörper signifikant gesenkt werden (3.3.2 Abbildung 29). Die Funktion des antiJAM-A Antikörpers besteht darin, den membranständigen JAM-A/JAM1/F11R Rezeptor zu blockieren, wodurch die homophile Interaktion mit dem sJAM-A nicht zu Stande kommen kann. Die durch diesen Mechanismus angetriebene Monozyten-Thrombozyten Coaggregatbildung wird dadurch reduziert und verhindert damit die weiteren Schritte im Phagozytosevorgang.

Monozyten sind Zellen des phagozytotischen Systems und sind dadurch in der Lage sich in Makrophagen und Schaumzellen zu differenzieren. Durch Vorarbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass sJAM-A die Externalisation von PS auf der Thrombozytenoberfläche steigert, die Aggregatbildung von Thrombozyten und Monozyten vereinfacht und somit die Phagozytose von Blutplättchen durch Monozyten unterstützt. Um den Einfluss von sJAM-A auf die Monozytendifferenzierung und somit den Beitrag von sJAM-A zum inflammatorischen Prozess zu untersuchen, wurde eine Thrombozyten-Monozyten-Cokultur angelegt. Die Vorbehandlung der Thrombozyten mit sJAM-A führt in einer angelegten Monozyten-Thrombozyten Cokultur zur phagozytotischen Beseitigung von Thrombozyten durch Monozyten, die sich dadurch verstärkt in Makrophagen und Schaumzellen differenzieren, vorbeschrieben durch Chatterjee et al. [28]. Der antiJAM-A Antikörper konnte durch Blockade des JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche diese Thrombozyten-Monozyten Interaktion hindern, was an der signifikant reduzierten Zellzahl der sich entwickelten Makrophagen deutlich wurde (3.3.3 Abbildung 31, Abbildung 32). Nach zehntägiger Inkubation der Thrombozyten-Monozyten-Cokultur war die Differenzierung und Entwicklung von Makrophagen, nach fünfzehntägiger Inkubation die Differenzierung und Entwicklung von Schaumzellen mikroskopisch zu sehen. Nach 15 Tagen Inkubation der Thrombozyten mit Monozyten ist auch hier ein signifikanter Anstieg in der Anzahl der Schaumzellen nach sJAM-A Behandlung der Thrombozyten nachgewiesen. Weiterhin konnte durch Verwendung des antiJAM-A Antikörpers dieser Anstieg nicht beschrieben werden (3.3.3 Abbildung 33, Abbildung 34). In beiden Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten blockiert der antiJAM-A Antikörper den transmembranen JAM-A/JAM1/F11R Rezeptor und verhindert dadurch die homophile Interaktion mit dem löslichen sJAM-A und deren vorbeschriebene Wirkung auf Thrombozyten.

Diesen Ergebnissen meiner Studie zufolge kann zusammenfassend gesagt werden, dass sJAM-A proinflammatorische Assoziationen zwischen Thrombozyten und Monozyten ermöglicht, indem es unter anderem zu Beginn die PS Externalisation signifikant steigert (siehe 3.2.5) und folgend die Monozyten-Thrombozyten-Aggregatbildung mit anschließender Phagozytose der Thrombozyten durch die

Monozyten fördert. So können sich Monozyten durch thrombozytären sJAM-A Einfluss verstärkt in Makrophagen und Schaumzellen ausdifferenzieren.

sJAM-A fungiert somit als proinflammatorischer Mediator mit der möglichen Folge von atherothrombotischen Komplikationen.

4.4 Die membrandistale D1 Domäne von sJAM-A ist für den prothrombotischen und proinflammatorischen Effekt verantwortlich

Das Adhäsionsmolekül JAM-A/JAM1/F11R existiert auf der Zellmembran von Thrombozyten und Endothelzellen und besitzt eine intrazelluläre, transmembrane und extrazelluläre Komponente. Es gehört zudem der Immunoglobulin Superfamilie an, da die extrazelluläre Komponente zwei IgG-ähnliche Domänen aufweist, die als D1 und D2 bezeichnet werden (siehe Abbildung 9). Die homophile Bindung zwischen zwei membranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R Molekülen beruht auf der membranösen distalen D1-Domäne des Adhäsionsrezeptors [173, 203].

Wie bereits in 1.2.2 vorbeschrieben, können die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 das membranassoziierte JAM-A/JAM1/F11R abspalten und somit eine lösliche Form, das soluble JAM-A Molekül, freisetzen. Um den zellulär interaktiven Part zu identifizieren und die molekularen Merkmale des JAM-A Proteins zu charakterisieren, die für die Vermittlung der homophilen Interaktion von sJAM-A mit der membranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R Form verantwortlich sind, wurde zusätzlich zur kristallisierten, nativen Form von JAM-A mit einer proximalen und einer distalen Membrandomäne, daher JAM-A D1D2 genannt, eine verkürzte Form des Moleküls mit nur einer der distalen Membrandomäne D1 ähnelnden Domäne, daher JAM-A D1 genannt, erzeugt und für alle Versuche verwendet (Abbildung 5).

Bei Untersuchungen der Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen oder auf einer mit JAM-A beschichteten Oberfläche (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19), der synergistisch induzierten Degranulation und Aktivierung von Thrombozyten (Abbildung 20, Abbildung 21), der Thrombozytenaggregation (Abbildung 22, Abbildung 23) und Thrombusbildung ex vivo (Abbildung 24,

Abbildung 25) zeigten die Moleküle JAM-A D1 und JAM-A D1 D2 in ihrer Auswirkung keine relevanten Unterschiede. Beide Moleküle, also JAM-A D1 und JAM-A D1D2, verursachten jeweils gleichermaßen eine Steigerung der erforschten Mechanismen. Dieser positive Einfluss bestätigte die Wirksamkeit beider Formen.

Zudem forciert JAM-A D1 und JAM-A D1D2 interzelluläre Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten. Beide Molekülformen unterstützen in gleichem Maße die Externalisation von PS und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials von Thrombozyten (Abbildung 26, Abbildung 27) und darauf basierend die Aggregatformation von Monozyten und Thrombozyten (Abbildung 28), die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten (Abbildung 29) und im letzten Schritt die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Abbildung 31, Abbildung 32) und Schaumzellen (Abbildung 33, Abbildung 34). Nach Einsatz eines blockierenden antiJAM-A Antikörpers, der die homophile Wechselwirkung inhibiert, konnten alle diese Steigerungen nicht mehr verzeichnet werden.

Summa summarum ist diesen Ergebnissen zufolge die membrandistale D1 Domäne des sJAM-A Moleküls verantwortlich und ausreichend, um die homophile Interaktion mit dem thrombozytenmembranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche zu vermitteln und somit sowohl den prothrombotischen als auch den proinflammatorischen Einfluss von sJAM-A auszuüben.

4.5 Therapeutische Möglichkeiten und Konsequenzen

All diese Erkenntnisse zeigen, dass JAM-A/JAM1/F11R und seine lösliche Form sJAM-A in mehreren pathologischen Prozessen wie Entzündung, mononukleärer Zellrekrutierung, Gefäßpathogenese wie Atherosklerose, Atherothrombose und Bluthochdruck operieren und damit ein neuartiges Ziel bei der Suche nach klinisch nützlichen und verwendbaren Inhibitoren dieser Pathologien darstellen. Eines haben diese Krankheiten alle gemeinsam: das Mitwirken von Thrombozyten.

Thrombozyten spielen bekanntermaßen auch eine essentielle Rolle in der Pathophysiologie der KHK und ihrer lebensbedrohlichen Akutform, bekannt als akutes Koronarsyndrom. Die antithrombozytäre Therapie in Form einer Thrombozytenaggregationshemmung stellt daher eine Hauptsäule in der

medikamentösen Behandlung und Sekundärprävention der KHK und des AKS dar. Bisher wurden dazu ein irreversibler Cyclooxygenase-Hemmer (COX-Hemmer z.B. ASS) zur Beeinflussung des Thromboxan-Signalweges, ADP-Rezeptorantagonist des P2Y₁₂ Subtyps des thrombozytären Adenosinrezeptors (z.B. Clopidogrel) zur Blockierung der adenosindiphosphatabhängige Mechanismen der Thrombozytenaktivierung, ein Adenosinwiederaufnahmememmer (z.B. Dipyridamol) oder Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (z.B. Abciximab) zur direkten Blockade der Thrombozytenaggregation verwendet.

Durch die Ergebnisse dieser Studie könnte die antithrombozytäre Therapie um einen neuen Ansatzpunkt erweitert werden. Die Inhibition der homophilen Interaktion zwischen sJAM-A und JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozyten- oder Endothelzelloberfläche würde der prothrombotischen Funktion entgegenwirken. Ein blockierender oder antagonisierender Mechanismus von sJAM-A oder JAM-A/JAM1/F11R könnte zusätzlich die proinflammatorischen Eigenschaften der Thrombozyten in Kombination mit Monozyten beeinflussen und somit die Atherogenese und den atherosklerotischen Fortschritt hemmen.

In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die entzündliche Aktivität aufgrund der Adhäsion und anschließenden Paravasation von mononukleären Zellen wie Leukozyten, die durch Leukozyten-LFA-1 (Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1) und endothelialer JAM-A/JAM1/F11R-Wechselwirkung angetrieben werden, durch Blockierung von LFA-1 oder JAM-A/JAM1/F11R mit einer rekombinanten löslichen JAM-A Form reduziert wurde [130, 152]. Ferner inhibiert dieses blockierende rsJAM-A vielerlei Schritte der Atherosklerose: die SDF-1 α (stromal cell-derived factor)-getriggerte transendothelialer Chemotaxis, die Migration von aktivierten T-Lymphozyten und deren SDF-1 α -getriggelter Arrest auf entzündetem Endothel und die sehr späte Antigen (VLA)-4 -unabhängige Adhäsion und Akkumulation von mononukleären Zellen auf atherosklerotischem Gewebe [152]. Diese spezielle blockierende lösliche Form von JAM-A hemmt demzufolge verschiedene Prozessabschnitte der vaskulären Inflammation, Thrombo- und Atherogenese und könnte als potenzieller therapeutischer Wirkstoff dieser Pathologien angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Blockierungsstrategien des sJAM-A oder des JAM-A/JAM1/F11R Rezeptors und damit deren vermittelten Mechanismen, wie die

Thrombozytenadhäsion an entzündlich verändertes Endothelium, die Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten oder die Monozytendifferenzierung und die daraus resultierenden prothrombotischen und proinflammatorischen Folgen, einen neuartigen, zukünftigen, medikamentösen Ansatz zur Prävention und Therapie der kardiovaskulären Erkrankungen, wie entzündlichen Thrombose, Atherosklerose und ihre kardiale chronische und akute Form, die KHK und der Herzinfarkt, darstellen können [140, 144, 151, 204, 205]. Durch Erforschung und anschließender Etablierung neuer Therapieansätze für kardiovaskuläre Erkrankungen kann eine Reduktion der dadurch entstandenen hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate in unserer Bevölkerung herbeigeführt werden.

4.6 Schlussfolgerung und Forschungsausblick

Hier diskutierten wir den wachsenden Fundus an Beweisen, die sJAM-A eine Rolle in der Beeinflussung der thrombotischen und inflammatorischen funktionellen Eigenschaften von Thrombozyten zusprechen, um die Voraussetzungen für laufende und zukünftige Untersuchungen zu schaffen.

Zusammenfassend lässt sich bestätigen, dass erhöhte Blutwerte von zirkulierendem sJAM-A, wie sie bei Patienten mit Atherosklerose auftreten und derzeit bei KHK-Patienten nachgewiesen werden, die Interaktion zwischen Blutplättchen und Monozyten erleichtern und die proinflammatorischen Prozesse dadurch vorantreiben. Die experimentellen Untersuchungen zeigen zudem die Möglichkeit auf, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von zirkulierendem sJAM-A eine tiefgreifende prothrombotische Wirkung ausüben, indem sie neben den proinflammatorischen Einflüssen auch Thrombozyten aktivieren.

Die Resultate der Studie zu meiner Dissertation beweisen schließlich, dass sJAM-A prothrombotisch und proinflammatorisch wirkt. Diesen durch JAM-A D1 und JAM-A D1D2 beeinflussten prothrombotischen Effekt und die proinflammatorischen Assoziationen zwischen Thrombozyten und Monozyten konnten durch Zugabe eines blockierenden anti-JAM-A Antikörpers entgegengewirkt werden.

Somit fördert das den zirkulierenden JAMs im Plasma ähnliche sJAM-A durch die homophile Interaktion mit dem membranständigen JAM-A/JAM1/F11R auf der

Thrombozytenoberfläche die prothrombotische und proinflammatorische Eigenschaft von Thrombozyten.

Im Anschluss an diese experimentellen Ergebnisse und aufgrund dieser Beobachtungen könnte JAM-A/JAM1/F11R und sJAM-A ein viel versprechender und neuer therapeutischer Ansatzpunkt zur Prävention und Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. Pharmazie und Pharmakologie könnten prospektiv nach neuen Medikamenten zur Antagonisierung der verschiedenen Effekte basierend auf sJAM-A und JAM-A-Proteinen für die Prophylaxe und Therapie von arterieller Hypertonie, Atherosklerose, entzündlicher Thrombose, Herzinfarkt, Schlaganfall und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, suchen [206].

5. Zusammenfassung

Die vorgelegte Dissertation handelt vom funktionellen Effekt und der Signifikanz der homophilen Interaktion zwischen dem löslichen Junctional Adhesion Molecule A (sJAM-A) und dem F11 Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche. Dazu wurde die Auswirkung von sJAM-A auf die Physiologie der Thrombozyten hinsichtlich Hämostase und Entzündungsprozesse untersucht.

Das Junctional Adhesion Molecule A ist ein membrangebundenes Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin Superfamilie, das auf Epithel- und Endothelzellen sowie auf zirkulierenden Blutzellen wie Thrombozyten exprimiert wird [127, 128, 136–140] und die Thrombozytenaktivierung reguliert [129, 144–150]. Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne mit Hilfe von Metalloproteasen kann JAM-A/JAM1/F11R als lösliche Form, sJAM-A genannt, freigesetzt werden [151, 155–157]. Das erhöhte Vorkommen von sJAM-A im Serum von Patienten mit Inflammation, Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit, Pathophysiologien mit großer Beteiligung von Thrombozyten, suggeriert eine prothrombotische und proinflammatorische Rolle des zirkulierenden Proteins [144, 151, 155, 164–166].

Bei ersten Versuchen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass JAM-A/JAM1/F11R nach agonisteninduzierter Aktivierung der Thrombozyten und bei Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit SAP verstärkt auf der Thrombozytenoberfläche zu finden war. Die sJAM-A Serumlevel waren des Weiteren bei Patienten mit AKS im Vergleich zu Patienten mit SAP gesteigert. Zudem konnte eine signifikante Korrelation zwischen JAM-A/JAM1/F11R und sJAM-A im Serum von KHK Patienten nachgewiesen werden, was zeigt, dass das sJAM-A Serumlevel von der Expression der membranassoziierten Form abhängt und ferner darauf hindeutet, dass aktivierte Blutplättchen als potenzielle zelluläre Quelle für das zirkulierende lösliche sJAM-A dient. Mit dem Photometer und der konfokalen Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Thrombozyten an eine mit sJAM-A beschichteten Oberfläche adhären, was durch Einsatz eines blockierenden Antikörpers namens antiJAM-A, der die homophile Interaktion zwischen sJAM-A und dem auf der Thrombozytenmembran gebundenen JAM-A/JAM1/F11R verhindert, annulliert werden konnte. sJAM-A steigert ferner als Verbindungsmolekül zwischen dem endothelialen

und dem thrombozytären JAM-A/JAM1/F11R die Adhäsion von Thrombozyten an stimulierte Endothelzellen, visualisiert durch einen Flusskammerversuch unter arteriellen Flussbedingungen. Dabei konnte die Anzahl adhärenter Thrombozyten mit dem antiJAM-A Antikörper, welcher JAM-A/JAM1/F11R auf der Thrombozytenoberfläche oder auf aktivierten Endothelzellen blockiert, verringert werden. Des Weiteren steigert sJAM-A die agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung, was anhand der P-Selektin Expression und durch PAC-1 Bindung an das GPIIb/IIIa durchflusszytometrisch bestätigt wurde sowie die mit der Impedanzaggregometrie evaluierte agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation, die Vorstufe zur Thrombusformation. Diese stimulatorischen Effekte konnten unter Einsatz des antiJAM-A jeweils gehemmt werden. Die Induktion der Apoptose und das prokoagulatorische Potential von aktivierten Thrombozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie anhand der Phosphatidylserin Externalisation und des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials ermittelt und konnte durch sJAM-A gesteigert und durch antiJAM-A verhindert werden. Zudem fördert sJAM-A die *ex vivo* Thrombusformation in einem Flusskammerversuch unter dynamischen arteriellen Bedingungen, die durch Verwendung des antiJAM-A wiederum verringert werden konnte. Die durchflusszytometrisch gemessene Formation von Thrombozyten-Monozyten Coaggregaten und die darauffolgende Phagozytose der Thrombozyten durch Monozyten konnte durch sJAM-A jeweils gesteigert und durch Hinzugabe des Antikörpers antiJAM-A reduziert werden, was unter anderem auf die durch sJAM-A induzierte Thrombozytenapoptose zurückzuführen ist. Auf diese Ergebnisse folgend wurde der Einfluss der mit sJAM-A vorinkubierten Thrombozyten auf die Monozytendifferenzierung durch Anlage einer Thrombozyten-Monozyten-Cokultur examiniert. Dabei konnte eine durch homophile sJAM-A/JAM-A Interaktion vermittelte, vermehrte Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen, durch gesteigerte Internalisierung der mit sJAM-A aktivierten und apoptotischen Thrombozyten begutachtet werden, die unter antiJAM-A Einsatz in ihrer Anzahl reduziert zu sehen war.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass sJAM-A über seine homophile Interaktion mit dem membranständigen JAM-A/JAM1/F11 Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche prothrombotisch wirkt, sowie inflammatorische Prozesse

begünstigend beeinflusst. Daher kann sJAM-A bei KHK-Patienten die prothrombotische und proinflammatorische Funktion der Thrombozyten fördern und zur Bildung einer Atherothrombose beitragen. Diese Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit könnten einen vielversprechenden, neuen medikamentösen Ansatzpunkt zur Prävention und Therapie der häufigsten Todesursache in Deutschland, von kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherothrombose, Atherosklerose und seine kardiale chronische und akute Form, der KHK und des Herzinfarkts, darstellen. Die Entwicklung neuer Therapeutika, basierend auf der Inhibierung von sJAM-A und der homophilen Interaktion zwischen sJAM-A und dem membranassoziierten JAM-A/JAM1/F11R, könnten damit die in Deutschland und weiteren Industrienationen bestehende hohe Morbidität und Mortalität dieser Erkrankungen reduzieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Gawaz MP. Blood platelets: Physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease : 47 tables. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2001.
2. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: Platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *European Journal of Haematology*. 1998;60:3–23. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x.
3. Pötzsch B, Madlener K. Hämostaseologie. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2010.
4. Koseoglu S, Flaumenhaft R. Advances in platelet granule biology. *Curr Opin Hematol*. 2013;20:464–71. doi:10.1097/MOH.0b013e3283632e6b.
5. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378–84. doi:10.1172/JCI27196.
6. George JN. Platelets. *The Lancet*. 2000;355:1531–9. doi:10.1016/S0140-6736(00)02175-9.
7. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227–34. doi:10.1038/nm1102-1227.
8. Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:263–9.
9. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 2000;89:160–7.
10. Holvoet P, Collen D. Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:320–8.
11. Deutzmann R, Rassow J. *Duale Reihe Biochemie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2016.
12. Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:51–61. doi:10.1182/asheducation-2011.1.51.
13. Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357:2482–94. doi:10.1056/NEJMra071014.

14. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: Role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*. 2003;28:257–64. doi:10.1016/S1473-0502(03)00044-2.
15. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, et al. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: It recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*. 1998;91:491–9.
16. Hourani SM, Cusack NJ. Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol Rev*. 1991;43:243–98.
17. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, et al. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol*. 1993;151:3267–73.
18. Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M, Kehrel B. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost*. 1993;70:514–21.
19. Kunicki TJ, Nugent DJ. The genetics of normal platelet reactivity. *Blood*. 2010;116:2627–34. doi:10.1182/blood-2010-04-262048.
20. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med*. 2011;89:109–21. doi:10.1007/s00109-010-0691-5.
21. Tao L, Zhang Y, Xi X, Kieffer N. Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin α IIb β 3 activation. *Protein Cell*. 2010;1:627–37. doi:10.1007/s13238-010-0089-8.
22. Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. Integrin activation. *Thromb Haemost*. 2001;86:316–23.
23. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673–87.
24. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015;29:153–62. doi:10.1016/j.blre.2014.10.003.
25. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: The life and death of a lineage. *Blood*. 2018;131:605–10. doi:10.1182/blood-2017-11-742684.

26. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* 2012;26:51–63. doi:10.1016/j.blre.2011.10.002.
27. Agbani EO, Hers I, Poole AW. Temporal contribution of the platelet body and balloon to thrombin generation. *Haematologica.* 2017;102:e379–e381. doi:10.3324/haematol.2017.166819.
28. Chatterjee M, Ungern-Sternberg SNI von, Seizer P, Schlegel F, Büttcher M, Sindhu NA, et al. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1989. doi:10.1038/cddis.2015.233.
29. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: Generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood.* 2017;130:2171–9. doi:10.1182/blood-2017-05-787259.
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–57.
31. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
32. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 1997;61:375–80.
33. Wyllie AH. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol.* 1987;153:313–6. doi:10.1002/path.1711530404.
34. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunology Today.* 1993;14:126–30. doi:10.1016/0167-5699(93)90214-6.
35. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90:19–25.
36. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281:1309–12.
37. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003;42:423–38.
38. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361:1570–83. doi:10.1056/NEJMra0901217.
39. Mangan DF, Mergenhagen SE, Wahl SM. Apoptosis in human monocytes: Possible role in chronic inflammatory diseases. *J Periodontol.* 1993;64:461–6.

40. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today*. 1993;14:131–6. doi:10.1016/0167-5699(93)90215-7.
41. Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, et al. The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology*. 1999;67:291–3. doi:10.1159/000028082.
42. van Furth R. Human monocytes and cytokines. *Research in Immunology*. 1998;149:719–20. doi:10.1016/S0923-2494(99)80045-5.
43. Bradbury AW, Murie JA, Ruckley CV. Role of the leucocyte in the pathogenesis of vascular disease. *Br. J. Surg.* 1993;80:1503–12. doi:10.1002/bjs.1800801204.
44. May AE, Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, Walter H, Schömig A. Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Eur Heart J*. 1997;18:1913–20.
45. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:345–53. doi:10.1016/0735-1097(96)00164-7.
46. Bennett M. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*. 1999;41:361–8. doi:10.1016/S0008-6363(98)00212-0.
47. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131–8.
48. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247:349–58.
49. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115–26. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
50. Schmitz G, Herr AS, Rothe G. T-lymphocytes and monocytes in atherogenesis. *Herz*. 1998;23:168–77.
51. Seizer P, Gawaz M, May AE. Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2008;15:1976–80.

52. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1996;64:1762–9.
53. Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: Potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996;87:2020–8.
54. Elgueta R, Benson MJ, Vries VC de, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229:152–72. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
55. Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bülbül O, Thieme S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: Implications in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2006;113:834–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568162.
56. Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res.* 2008;102:302–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.157990.
57. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, Assis EF de, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol.* 2014;193:1864–72. doi:10.4049/jimmunol.1400091.
58. Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell.* 1995;83:333–43.
59. Vachino G, Chang XJ, Veldman GM, Kumar R, Sako D, Fouser LA, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem.* 1995;270:21966–74.
60. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003;9:61–7. doi:10.1038/nm810.

61. Theilmeier G, Lenaerts T, Remacle C, Collen D, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood*. 1999;94:2725–34.
62. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994;94:1243–51. doi:10.1172/JCI117442.
63. Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) on Human Platelets is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196:679–91. doi:10.1084/jem.20020267.
64. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J-f, McIntire LV, et al. Platelet Glycoprotein Iba Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (Cd11b/Cd18). *Journal of Experimental Medicine*. 2000;192:193–204. doi:10.1084/jem.192.2.193.
65. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*. 2007;115:1571–80. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683201.
66. Altieri DC. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *The Journal of Cell Biology*. 1988;107:1893–900. doi:10.1083/jcb.107.5.1893.
67. Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, Sachs UJH, Isordia-Salas I, Pixley RA, et al. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem*. 2003;278:45375–81. doi:10.1074/jbc.M304344200.
68. Schmitz G, Orsó E, Rothe G, Klucken J. Scavenging, signalling and adhesion coupling in macrophages: Implications for atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:287–300.
69. Weber KSC, Alon R, Klickstein LB. Sialylation of ICAM-2 on platelets impairs adhesion of leukocytes via LFA-1 and DC-SIGN. *Inflammation*. 2004;28:177–88.
70. Kuijper PHM, Torres HIG, Lammers J-WJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet Associated Fibrinogen and ICAM-2 Induce Firm Adhesion of Neutrophils

- under Flow Conditions. *Thromb Haemost.* 2017;80:443–8. doi:10.1055/s-0037-1615227.
71. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 1997;95:2387–94.
72. Fan ST, Edgington TS. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes. *J Immunol.* 1993;150:2972–80.
73. Fan ST, Edgington TS. Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response. *J Clin Invest.* 1991;87:50–7. doi:10.1172/JCI115000.
74. Roger Rezzonico. Engagement of CD11b and CD11c β 2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1 β production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *Blood* 2000 95:3868-3877.
75. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: Partners in crime. *Circ Res.* 2005;96:612–6. doi:10.1161/01.RES.0000160077.17427.57.
76. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391:591–4. doi:10.1038/35393.
77. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *Journal of Experimental Medicine.* 1991;174:785–90.
78. Chatterjee M, Behrendt A, Schmid M, Beck S, Schneider M, Mack A, et al. Platelets as a novel source of Gremlin-1: Implications for thromboinflammation. *Thromb Haemost.* 2017;117:311–24. doi:10.1160/TH16-08-0665.
79. Newman PM, Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia: New evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood.* 2000;96:182–7.
80. Schober A, Manka D, Hundelshausen P von, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation.* 2002;106:1523–9.

81. Hundelshausen P von, Weber, K. S. C., Huo Y, Proudfoot, A. E. I., Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation*. 2001;103:1772–7. doi:10.1161/01.CIR.103.13.1772.
82. Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, et al. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*. 2003;108:2776–82. doi:10.1161/01.CIR.0000103700.05109.0D.
83. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2008;117:206–15. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.714691.
84. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood*. 2011;117:3907–11. doi:10.1182/blood-2010-12-327007.
85. Chatterjee M, Seizer P, Borst O, Schönberger T, Mack A, Geisler T, et al. SDF-1 α induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *FASEB J*. 2014;28:2864–78. doi:10.1096/fj.14-249730.
86. Stellos K, Seizer P, Bigalke B, Daub K, Geisler T, Gawaz M. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36:139–45. doi:10.1055/s-0030-1251497.
87. Ma W, Liu Y, Ellison N, Shen J. Induction of C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) switches stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling and phagocytic activity in macrophages linked to atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2013;288:15481–94. doi:10.1074/jbc.M112.445510.
88. Witte A, Chatterjee M, Lang F, Gawaz M. Platelets as a Novel Source of Pro-Inflammatory Chemokine CXCL14. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41:1684–96. doi:10.1159/000471821.

89. Vogel S, Rath D, Borst O, Mack A, Loughran P, Lotze MT, et al. Platelet-derived high-mobility group box 1 promotes recruitment and suppresses apoptosis of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478:143–8. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.078.
90. Rinder HM, Tracey JL, Rinder CS, Leitenberg D, Smith BR. Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost.* 1994;72:750–6.
91. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of Cytokine Expression in Leukocytes by Binding of Thrombin-Stimulated Platelets. *Circulation.* 1997;95:2387–94. doi:10.1161/01.CIR.95.10.2387.
92. McEver R. Adhesive Interactions of Leukocytes, Platelets, and the Vessel Wall during Hemostasis and Inflammation. *Thromb Haemost.* 2017;86:746–56. doi:10.1055/s-0037-1616128.
93. Gawaz M, FATEH-MOGHADAM S, PILZ G, GURLAND H-J, WERDAN K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:843–51. doi:10.1111/j.1365-2362.1995.tb01694.x.
94. Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased Neutrophil-Platelet Adhesion in Patients With Unstable Angina. *Circulation.* 1996;94:1239–46. doi:10.1161/01.CIR.94.6.1239.
95. Vogel S, Rath D, Lu J, Chatterjee M, Geisler T, Gawaz M. Elevated mitochondrial membrane potential of circulating monocyte-platelet aggregates in patients with coronary heart disease. *Int J Cardiol.* 2015;181:135–7. doi:10.1016/j.ijcard.2014.11.116.
96. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased Platelet Reactivity and Circulating Monocyte-Platelet Aggregates in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:352–8. doi:10.1016/S0735-1097(97)00510-X.
97. Wang J, Zhang S, Jin Y, Qin G, Yu L, Zhang J. Elevated levels of platelet-monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2007;115:361–5. doi:10.1016/j.ijcard.2006.03.019.

98. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123:2759–67. doi:10.1182/blood-2013-11-462432.
99. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, et al. PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59:305–12. doi:10.1016/0092-8674(89)90292-4.
100. van Zanten GH, Graaf S de, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, Groot PG de, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest*. 1994;93:615–32. doi:10.1172/JCI117014.
101. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, FitzGerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*. 1986;315:983–9. doi:10.1056/NEJM198610163151602.
102. Bröijersén A, Hamsten A, Eriksson M, Angelin B, Hjemdahl P. Platelet Activity In Vivo in Hyperlipoproteinemia – Importance of Combined Hyperlipidemia. *Thromb Haemost*. 2017;79:268–75. doi:10.1055/s-0037-1615005.
103. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107:1255–62. doi:10.1172/JCI11871.
104. May AE. Engagement of Glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIbbeta3) on Platelets Upregulates CD40L and Triggers CD40L-Dependent Matrix Degradation by Endothelial Cells. *Circulation*. 2002;106:2111–7. doi:10.1161/01.CIR.0000033597.45947.0F.
105. Mazzone A, Servi S de, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*. 1993;88:358–63. doi:10.1161/01.CIR.88.2.358.
106. Leatham EW, Bath PM, Tooze JA, Camm AJ. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Heart*. 1995;73:10–3. doi:10.1136/hrt.73.1.10.
107. del Conde I, Nabi F, Tonda R, Thiagarajan P, López JA, Kleiman NS. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin

- generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1065–70.
doi:10.1161/01.ATV.0000159094.17235.9b.
108. Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ, Vreeken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1990;322:1549–54.
doi:10.1056/NEJM199005313222201.
109. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894–7. doi:10.1038/29788.
110. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1037–43. doi:10.1172/JCI119231.
111. Biancone L, Martino AD, Orlandi V, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G. Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo. *Journal of Experimental Medicine.* 1997;186:147–52.
112. Brown SB, Clarke MC, Magowan L, Sanderson H, Savill J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *J Biol Chem.* 2000;275:5987–96.
113. Brown SB, Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol.* 1999;162:480–5.
114. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:965–75.
doi:10.1038/nri957.
115. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol.* 1996;149:911–21.
116. Tait JF, Smith C. Phosphatidylserine receptors: Role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells. *J Biol Chem.* 1999;274:3048–54.
117. Werner Böcker. *Pathologie.* 5th ed. München: Elsevier Health Sciences Germany; 2015.

118. Kwiatkowska K, Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays*. 1999;21:422–31. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199905)21:5<422::AID-BIES9>3.0.CO;2-#.
119. Heidenreich S. Monocyte CD14: A multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol*. 1999;65:737–43.
120. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000;405:85–90. doi:10.1038/35011084.
121. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*. 1998;5:551–62. doi:10.1038/sj.cdd.4400404.
122. Lindemann S, Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:566–73. doi:10.1097/MOL.0b013e3282ef7c1e.
123. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J*. 2006;20:2559–61. doi:10.1096/fj.06-6265fje.
124. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des*. 2005;11:3061–72.
125. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S'e, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem*. 2003;278:6187–93. doi:10.1074/jbc.M208894200.
126. Sachais BS. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic itinerary, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood*. 2002;99:3613–22. doi:10.1182/blood.V99.10.3613.
127. Sobocki T, Sobocka MB, Babinska A, Ehrlich YH, Banerjee P, Kornecki E. Genomic structure, organization and promoter analysis of the human F11R/F11 receptor/junctional adhesion molecule-1/JAM-A. *Gene*. 2006;366:128–44. doi:10.1016/j.gene.2005.08.025.
128. Weber C, Fraemohs L, Dejiana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:467–77. doi:10.1038/nri2096.

129. Kornecki E, Walkowiak B, Naik UP, Ehrlich YH. Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1990;265:10042–8.
130. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 2004;117:19–29. doi:10.1242/jcs.00930.
131. Naik UP, Naik MU, Eckfeld K, Martin-DeLeon P, Sychala J. Characterization and chromosomal localization of JAM-1, a platelet receptor for a stimulatory monoclonal antibody. 2001.
132. Martin-Padura I. Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *The Journal of Cell Biology.* 1998;142:117–27. doi:10.1083/jcb.142.1.117.
133. Ozaki H, Ishii K, Horiuchi H, Arai H, Kawamoto T, Okawa K, et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. 1999.
134. Sobocka MB, Sobocki T, Banerjee P, Weiss C, Rushbrook JI, Norin AJ, et al. Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. 2000.
135. Naik UP, Ehrlich YH, Kornecki E. Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the Fc γ RII receptor. *Biochem. J.* 1995;310:155–62. doi:10.1042/bj3100155.
136. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, et al. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2000;275:30970–6. doi:10.1074/jbc.M003946200.
137. Schmitt, Martin M N, Megens, Remco T A, Zerneck A, Bidzhekov K, van den Akker, Nynke M, Rademakers T, et al. Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation.* 2014;129:66–76. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004149.
138. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 13):2363–74.

139. Rehder D, Iden S, Nasdala I, Wegener J, Brickwedde, Maria-Katharina Meyer Zu, Vestweber D, Ebnet K. Junctional adhesion molecule-a participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. *Exp Cell Res*. 2006;312:3389–403. doi:10.1016/j.yexcr.2006.07.004.
140. Babinska A, Kedees MH, Athar H, Ahmed T, Batuman O, Ehrlich YH, et al. F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost*. 2002;88:843–50. doi:10.1267/th02110843.
141. Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA. Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem*. 2004;279:16254–62. doi:10.1074/jbc.M309483200.
142. Monteiro AC, Parkos CA. Intracellular mediators of JAM-A-dependent epithelial barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1257:115–24. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06521.x.
143. Kummer D, Ebnet K. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection. *Cells* 2018. doi:10.3390/cells7040025.
144. Babinska A, Azari BM, Salifu MO, Liu R, Jiang X-C, Sobocka MB, et al. The F11 receptor (F11R/JAM-A) in atherothrombosis: Over-expression of F11R in atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 2007. doi:10.1160/TH06-08-0454.
145. Babinska A, Kedees MH, Athar H, Sobocki T, Sobocka MB, Ahmed T, et al. Two regions of the human platelet F11-receptor (F11R) are critical for platelet aggregation, potentiation and adhesion. *Thromb Haemost*. 2002;87:712–21.
146. Naik MU, Stalker TJ, Brass LF, Naik UP. JAM-A protects from thrombosis by suppressing integrin α IIb β 3-dependent outside-in signaling in platelets. *Blood*. 2012;119:3352–60. doi:10.1182/blood-2011-12-397398.
147. Naik MU, Caplan JL, Naik UP. Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin α IIb β 3 signaling by recruiting Csk to the integrin-c-*Src* complex. *Blood*. 2014;123:1393–402. doi:10.1182/blood-2013-04-496232.
148. Zhao Z, Vajen T, Karshovska E, Dickhout A, Schmitt MM, Megens RTA, et al. Deletion of junctional adhesion molecule A from platelets increases early-stage neointima formation after wire injury in hyperlipidemic mice. *J Cell Mol Med*. 2017;21:1523–31. doi:10.1111/jcmm.13083.

149. Karshovska E, Zhao Z, Blanchet X, Schmitt MMN, Bidzhekov K, Soehnlein O, et al. Hyperreactivity of junctional adhesion molecule A-deficient platelets accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Circ Res.* 2015;116:587–99. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304035.
150. Stefanini L, Bergmeier W. Negative regulators of platelet activation and adhesion. *J Thromb Haemost.* 2018;16:220–30. doi:10.1111/jth.13910.
151. Cavusoglu E, Kornecki E, Sobocka MB, Babinska A, Ehrlich YH, Chopra V, et al. Association of plasma levels of F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) with human atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1768–76. doi:10.1016/j.jacc.2007.05.051.
152. Ostermann G, Fraemohs L, Baltus T, Schober A, Lietz M, Zernecke A, et al. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:729–35. doi:10.1161/01.ATV.0000157154.14474.3b.
153. Schmitt, Martin M N, Fraemohs L, Hackeng TM, Weber C, Koenen RR. Atherogenic mononuclear cell recruitment is facilitated by oxidized lipoprotein-induced endothelial junctional adhesion molecule-A redistribution. *Atherosclerosis.* 2014;234:254–64. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.014.
154. Koenen RR, Pruessmeyer J, Soehnlein O, Fraemohs L, Zernecke A, Schwarz N, et al. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood.* 2009;113:4799–809. doi:10.1182/blood-2008-04-152330.
155. Salifu MO, Kolff Q, Murty P, Haria DM, Zimpa M, Shakeel M, et al. Relationship between the Soluble F11 Receptor and Markers of Inflammation in Hemodialysis Patients. *J Invest Medic.* 2007;55:115. doi:10.2310/6650.2007.06041.
156. Ong KL, Leung, Raymond Y H, Babinska A, Salifu MO, Ehrlich YH, Kornecki E, et al. Elevated plasma level of soluble F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) in hypertension. *Am J Hypertens.* 2009;22:500–5. doi:10.1038/ajh.2009.23.
157. Xu H, Oliveira-Sales EB, McBride F, Liu B, Hewinson J, Toward M, et al. Upregulation of junctional adhesion molecule-A is a putative prognostic marker of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2012;96:552–60. doi:10.1093/cvr/cvs273.

-
158. Kornecki E, Ehrlich YH, De Mars, D D, Lenox RH. Exposure of fibrinogen receptors in human platelets by surface proteolysis with elastase. *J Clin Invest.* 1986;77:750–6. doi:10.1172/JCI112370.
159. Chen A. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 1995;182:519–30. doi:10.1084/jem.182.2.519.
160. Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med.* 2003;81:4–19. doi:10.1007/s00109-002-0391-x.
161. Ostermann G, Weber, Kim S C, Zerneck A, Schröder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.* 2002;3:151–8. doi:10.1038/ni755.
162. Zerneck A, Liehn EA, Fraemohs L, Hundelshausen P von, Koenen RR, Corada M, et al. Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e10-3. doi:10.1161/01.ATV.0000197852.24529.4f.
163. Speck N, Brandsch C, Schmidt N, Yazdekhosti N, Hirche F, Lucius R, et al. The Antiatherogenic Effect of Fish Oil in Male Mice Is Associated with a Diminished Release of Endothelial ADAM17 and ADAM10 Substrates. *J Nutr.* 2015;145:1218–26. doi:10.3945/jn.115.211375.
164. Turhan H, Erbay AR, Yasar AS, Aksoy Y, Bicer A, Yetkin G, Yetkin E. Plasma soluble adhesion molecules; intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in patients with isolated coronary artery ectasia. *Coron Artery Dis.* 2005;16:45–50.
165. Azari BM, Marmur JD, Salifu MO, Ehrlich YH, Kornecki E, Babinska A. Transcription and translation of human F11R gene are required for an initial step of atherogenesis induced by inflammatory cytokines. *J Transl Med.* 2011;9:98. doi:10.1186/1479-5876-9-98.
166. Denk S, Wiegner R, Hönes FM, Messerer DAC, Radermacher P, Weiss M, et al. Early Detection of Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM-1) in the Circulation after Experimental and Clinical Polytrauma. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:463950. doi:10.1155/2015/463950.

167. Hou Y, Rabquer BJ, Gerber ML, Del Galdo F, Jimenez SA, Haines GK, et al. Junctional adhesion molecule-A is abnormally expressed in diffuse cutaneous systemic sclerosis skin and mediates myeloid cell adhesion. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:249–54. doi:10.1136/ard.2008.102624.
168. Waki H, Liu B, Miyake M, Katahira K, Murphy D, Kasparov S, Paton, Julian F R. Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem. *Hypertension*. 2007;49:1321–7. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.085589.
169. Fukuda S, Yasu T, Kobayashi N, Ikeda N, Schmid-Schönbein GW. Contribution of fluid shear response in leukocytes to hemodynamic resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 2004;95:100–8. doi:10.1161/01.RES.0000133677.77465.38.
170. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res*. 2013;112:1506–19. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300512.
171. Projahn D, Koenen RR. Platelets: Key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012;92:1167–75. doi:10.1189/jlb.0312151.
172. Harpaz Y, Chothia C. Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol*. 1994;238:528–39. doi:10.1006/jmbi.1994.1312.
173. Prota AE, Campbell JA, Schelling P, Forrest JC, Watson MJ, Peters TR, et al. Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5366–71. doi:10.1073/pnas.0937718100.
174. Chatterjee M, Rath D, Schlotterbeck J, Rheinlaender J, Walker-Allgaier B, Alnaggar N, et al. Regulation of oxidized platelet lipidome: Implications for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2017;38:1993–2005. doi:10.1093/eurheartj/ehx146.
175. Rath D, Chatterjee M, Borst O, Müller K, Stellos K, Mack AF, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left

- ventricular functional recovery. *Eur Heart J*. 2014;35:386–94.
doi:10.1093/eurheartj/eh448.
176. Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood*. 1996;87:4925–36.
177. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: A micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol*. 1990;76:387–94.
178. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology*. 2013;65:1–14.
doi:10.1007/s10616-012-9459-9.
179. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: Implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:1809–18.
180. Sakariassen KS, Orning L, Turitto VT. The impact of blood shear rate on arterial thrombus formation. *Future Sci OA*. 2015;1:FSO30. doi:10.4155/fso.15.28.
181. Droppa M, Spahn P, Takhgiriev K, Müller KAL, Alboji A, Straub A, et al. Periprocedural platelet inhibition with cangrelor in P2Y12-inhibitor naïve patients with acute coronary syndromes - A matched-control pharmacodynamic comparison in real-world patients. *Int J Cardiol*. 2016;223:848–51.
doi:10.1016/j.ijcard.2016.08.270.
182. Chatterjee M, Borst O, Walker B, Fotinos A, Vogel S, Seizer P, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circ Res*. 2014;115:939–49.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305171.
183. Prota AE, Campbell JA, Schelling P, Forrest JC, Watson MJ, Peters TR, et al. Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: Implications for reovirus binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5366–71.
doi:10.1073/pnas.0937718100.
184. Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, O'Connor MN, Knight CG, Herr AB, et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: The smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two

- glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem.* 2007;282:1296–304.
doi:10.1074/jbc.M606479200.
185. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci.* 2006;11:1977–86.
186. Reiter R, Derhaschnig U, Spiel A, Keen P, Cardona F, Mayr F, Jilma B. Regulation of protease-activated receptor 1 (PAR1) on platelets and responsiveness to thrombin receptor activating peptide (TRAP) during systemic inflammation in humans. *Thromb Haemost.* 2003;90:898–903. doi:10.1160/TH03-04-0245.
187. Massaguer A, Engel P, Tovar V, March S, Rigol M, Solanes N, et al. Characterization of platelet and soluble-porcine P-selectin (CD62P). *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;96:169–81.
188. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;197:41–9.
189. Gawaz, Neumann, Schomig. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999;99:E1-E11.
190. Marder VJ. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013.
191. Nurden AT, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P. Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest.* 1994;24 Suppl 1:42–5.
192. McEver RP. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents Actions Suppl.* 1995;47:117–9.
193. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA, Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain in fibrinogen. *J Biol Chem.* 1989;264:259–65.
194. Nurden AT, Poujol C, Nurden P. Different activation states of GP IIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999;10 Suppl 1:S67-70.

195. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11189–93.
196. Lasne D, Donato J, Falet H, Rendu F. Different abilities of thrombin receptor activating peptide and thrombin to induce platelet calcium rise and full release reaction. *Thromb Haemost*. 1995;74:1323–8.
197. McNicol A, Robson CA. Thrombin receptor-activating peptide releases arachidonic acid from human platelets: A comparison with thrombin and trypsin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:861–7.
198. Ebnet K. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development. *Physiol Rev*. 2017;97:1529–54. doi:10.1152/physrev.00004.2017.
199. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, et al. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196:887–96. doi:10.1084/jem.20012044.
200. Koenen RR. The prowess of platelets in immunity and inflammation. *Thromb Haemost*. 2016;116:605–12. doi:10.1160/TH16-04-0300.
201. Mattheij NJA, Gilio K, van Kruchten R, Jobe SM, Wieschhaus AJ, Chishti AH, et al. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem*. 2013;288:13325–36. doi:10.1074/jbc.M112.428359.
202. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2131–7. doi:10.1161/01.ATV.0000095974.95122.EC.
203. Mercier GT, Campbell JA, Chappell JD, Stehle T, Dermody TS, Barry MA. A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6188–93. doi:10.1073/pnas.0400542101.
204. Krieglstein C. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14:S44–S54. doi:10.1016/S0895-7061(01)02069-6.
205. Parker III C. Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2001;156:417–24. doi:10.1016/S0021-9150(00)00672-9.
206. Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, Hartwig JH, Li M, Ehrlich YH, 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. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2004;24:85–105. doi:10.1081/RRS-120034252.
207. M. Chatterjee. 81. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung vom 8. bis 11. April 2015 in Mannheim. *Clin Res Cardiol*. 2015;104 Suppl 1:1. doi:10.1007/s00392-015-1100-4.
208. V. Rapp. 83. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung vom 19. bis 22. April 2017 in Mannheim. *Clin Res Cardiol*. 2017;106:1. doi:10.1007/s00392-017-1105-2.
209. M. Chatterjee. DGK Herztage 2017 vom 12. - 14. Oktober 2017 in Berlin. *Clin Res Cardiol*. 2017;106:1. doi:10.1007/s00392-017-1154-6.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Innere Medizin III Kardiologie und Kreislaufkrankungen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee, Teilprojektleiterin der klinischen Forschungsgruppe KFO 274: "Thrombozyten - Molekulare Mechanismen und Translationale Implikationen", gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Konfokalmikroskopie mit anschließender Analyse wurde durch Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee durchgeführt. Durch sie erhielt ich auch Unterstützung bei der Analyse und Aufbereitung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten. Zudem erfolgte die Datenerhebung zur klinischen Studie am Durchflusszytometer durch Frau Lydia Laptev und mit Hilfe des ELISA kit durch Frau Ingrid Epple.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee mit dem gewünschten Statistikprogramm GraphPad Prism durch mich. Für die Analyse der Baseline Charakteristika der klinischen Studie habe ich das Statistikprogramm SPSS verwendet. Die Korrelationsanalyse wurde von Herrn Dr. Dominik Rath durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 05.06.2018

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2015

Abstract zum Vortrag durch Frau Dr. rer.nat. M. Chatterjee [207]

Freie Vorträge: Basic Science: Hämostase und Inflammation

Titel: Soluble Junctional Adhesion Molecule-A Modulates Haemostatic, Thrombotic and Inflammatory Functions of Platelets through JAM-1 or F11 Receptor on Platelet Surface

Autoren: M. Chatterjee, J. Schwartz, V. Rapp, T. Stehle, M. Gawaz (Universität Tübingen)

83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2017

Abstract zum Poster [208]

Postervorträge der Otto-Hess-Promotionsstipendiaten

Titel: Die homophile Interaktion zwischen dem löslichen Junctional Adhesion Molecule A und dem F11-Rezeptor beeinflusst die Thrombozytenfunktion

Autoren: V. Rapp, J. Schwartz, T. Stehle, M. Chatterjee, M. Gawaz (Universität Tübingen)

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie Herztage 2017, Oktober 2017

Abstract zum Poster [209]

Poster: ACS / KHK - Fokus Thrombozyten

Titel: Thrombotic and Inflammatory Impact of Circulatory Soluble Junctional Adhesion Molecule-A Through Homophilic interaction with Platelet JAM-1/F11 Receptor: Insights from Coronary Artery Disease (CAD)

Autoren: M. Chatterjee, V. Rapp, D. Rath, M. Gawaz (Universität Tübingen)

9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, der es mir ermöglicht hat, in der Inneren Medizin III Kardiologie und Kreislaufkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen meine Dissertation anzufertigen und an der Eberhard Karls Universität zu promovieren. Vielen Dank auch für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, die Unterstützung zum Erhalt des Otto-Hess Promotionsstipendiums der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und die Bereitstellung der Forschungseinrichtung. So konnte ich unter optimalen Bedingungen meine Forschungsarbeit umsetzen.

Besonders danken möchte ich zudem Frau Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee für die hervorragende, engagierte und kompetente Betreuung. Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit sowie Ihre Ratschläge in praktischen und theoretischen Fragestellungen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich, für inhaltliche und methodische Fragen.

Danke auch an Herrn Prof. Thilo Stehle, der uns freundlicherweise das synthetisierte JAMA-D1 und JAMA-D1D2 zur Verfügung gestellt hat.

Zudem danke ich Herrn Dr. Dominik Rath für die Erstellung der Korrelationsanalyse sowie Frau Ingrid Epple und Frau Lydia Laptev für die Erhebung der experimentellen Daten zur klinischen Studie dieser Dissertation.

Mein Dank geht auch an das gesamte Laborteam, das mir immer freundlich und hilfsbereit zur Seite stand. Die wissenschaftlichen Diskussionen waren für mich stets sehr wertvoll.

Zuletzt herzlichen Dank an Philipp für seine Liebe und seinen Rückhalt.

Und von Herzen danke ich auch meinen Eltern und meinem Bruder für ihr Verständnis und die bedingungslose Unterstützung. Nur mit ihnen ist diese Arbeit gelungen.

10. Lebenslauf

| | |
|--------------------|---|
| Persönliche Daten: | Vera Rapp, geb. 4.7.1988 in Stuttgart |
| Ausbildung: | 1996 – 2008 Grundschule und Gymnasium Renningen Schulabschluss: Abitur |
| | 2008 – 2009 Ausbildung zur Rettungssanitäterin |
| | 2009 Freiwilliges Soziales Jahr im Kreiskrankenhaus Leonberg, Klinikverbund Südwest |
| | 2009 – 2011 Ausbildung zur Rettungsassistentin |
| Studium: | 2011 – 2013 Studium der Humanmedizin Ruprecht–Karls Universität Heidelberg Medizinische Fakultät Mannheim 1. Staatsexamen Humanmedizin: Note 2,5 |
| | 2013 - 2017 Studium der Humanmedizin Eberhard Karls Universität Tübingen 2. Staatsexamen Humanmedizin: 2,0 |
| | 21.11.2017 3. Staatsexamen Humanmedizin: Note 1,0 Abschlussnote Studium Humanmedizin: 1,8 |
| Forschung: | 2015 – 2018 Promotion Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III Kardiologie AG Prof. Gawaz Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz |
| | 2015 Teilnahme 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim Cautor Abstract „Soluble Junctional Adhesion Molecule- A Modulates Haemostatic, Thrombotic and Inflammatory Functions of Platelets through JAM-1 or F11 Receptor on Platelet Surface” |
| | 2015 - 2016 Stipendiatin Otto-Hess-Promotionsstipendium der DGK Thema: „Der Einfluss des löslichen Proteins Junctional Adhesion Molecule A (sJAM-A) auf die Funktion der Thrombozyten” |

- 2017 83. Jahrestagung der DGK, Mannheim
Poster „Die homophile Interaktion zwischen dem löslichen Junctional Adhesion Molecule A und dem F11-Rezeptor beeinflusst die Thrombozytenfunktion“
- 2017 DGK Herztage 2017, Berlin
Coautor Abstract „Thrombotic and Inflammatory Impact of Circulatory Soluble Junctional Adhesion Molecule-A Through Homophilic interaction with Platelet JAM-1/F11 Receptor: Insights from Coronary Artery Disease (CAD)“