

**Regulation der Expression, subzelluläre Lokalisation
und molekulare Identität von CD40-Ligand in
humanen Thrombozyten**

**Mögliche Bedeutung für die Proliferation und Migration
glatter Gefäßmuskelzellen**

Inaugural – Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

**Alexander Hermann
aus Jüchen**

**Düsseldorf
2001**

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K. Schrör

Korreferent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2002

ABKÜRZUNGEN	1
STRUKTURFORMELN	3
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 DAS CD40/CD40L REZEPTOR/LIGAND-SYSTEM	4
1.2 STRUKTUR VON CD40 UND CD40L	5
1.2.1 Struktur von humanem CD40.....	5
1.2.2 Struktur von humanem CD40L.....	6
1.3 DIE SIGNALTRANSDUKTION DES CD40-REZEPTORS.....	8
1.4 BIOLOGISCHE FUNKTION VON CD40L: BEDEUTUNG FÜR INFLAMMATORISCHE PROZESSE IN ATHEROSKLEROTISCH VERÄNDERTEN GEWEBEN.....	10
1.4.1 Aufregulation von Adhäsionsmolekülen und Regulation inflammatorischer Mediatoren.....	10
1.4.2 Erhöhung der Extrazellulärmatrix-degradierenden Aktivität	11
1.4.3 Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität vaskulärer Zellen durch verstärkte Expression von Gewebethromboplastin („Tissue Factor“).....	12
1.5 ATHEROGENESE UND DIE ROLLE VON THROMBOZYTEN/ THROMBOZYTÄREM CD40L BEI DER PROGRESSION DER ATHEROSKLEROSE.....	12
1.6 FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 SUBSTANZEN UND CHEMIKALIEN	15
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	15
2.3 ANTIKÖRPER	16
2.4 ISOLIERUNG VON GEWASCHENEN THROMBOZYTEN AUS VOLLBLUT UND THROMBOZYTEN- KONZENTRATEN.....	17
2.5 ZELLKULTUR.....	17
2.5.1 Kultur von glatten Gefäßmuskelnzellen (SMC).....	17
2.5.2 Kultur von Pro-Megakaryozyten.....	18
2.5.3 Kultur von T-Zell-Lymphomen.....	18
2.6 APOPTOSE-ASSAY	19
2.7 DNA-SYNTHESE-MESSUNG (BRDU-ASSAY).....	19
2.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	20
2.8.1 Durchflusszytometrie von Thrombozyten.....	20
2.8.2 Quantitative Durchflusszytometrie von Thrombozyten	20
2.8.3 Durchflusszytometrie von glatten Gefäßmuskelnzellen (SMC).....	21
2.8.4 Durchflusszytometrie von T-Zell-Lymphomzellen (Jurkat).....	21
2.9 EXPRESSION VON CD40L AUF THROMBOZYTEN NACH CLOPIDOGRELBEHANDLUNG	
(PROBANDENSTUDIE)	22
2.10 IMMUNFLUORESCENZ.....	22
2.10.1 Untersuchung von CD40L, CD62P und CD63 in Thrombozyten.....	22
2.10.2 Färbung von filamentösem Aktin (F-Aktin) in Thrombozyten.....	23

2.10.3	<i>Nachweis von NFκB in SMC</i>	23
2.11	IMMUNOPRÄZIPITATION.....	23
2.11.1	<i>Probenvorbereitung: Zytoskelett von Thrombozyten</i>	23
2.11.2	<i>Probenvorbereitung: Thrombozytenlysat und Stimulationsüberstände</i>	24
2.11.3	<i>Immunopräzipitation</i>	24
2.12	MIGRATIONS-ASSAY	25
2.13	PRÄPARATION VON LYMPHOZYTENMEMBRANEN	25
2.14	PRÄPARATION VON THROMBOZYTENSUBFRAKTIONEN/ -MEMBRANEN.....	25
2.15	PROTEINBESTIMMUNG	26
2.16	REGULATION DER CD40L-EXPRESSION IN PRO-MEGAKARYOZYTEN (MEG-01)	26
2.17	WESTERN BLOT	27
2.17.1	<i>Gewinnung des Zelllysates</i>	27
2.17.2	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	27
2.17.3	<i>Transfer der Proteine auf PVDF-Membran</i>	27
2.17.4	<i>Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen (Antikörperhybridisierung)</i>	28
2.17.5	<i>Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung</i>	28
2.18	ZELLZÄHLUNG.....	29
2.19	STATISTIK.....	29
3	ERGEBNISSE	30
	CD40-LIGAND (CD40L) IN THROMBOZYTEN	30
3.1	EXPRESSION VON CD40L AUF DER OBERFLÄCHE VON THROMBOZYTEN	30
3.2	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON CD40L IN THROMBOZYTEN	33
3.3	REGULATION DER CD40L-EXPRESSION IN THROMBOZYTEN.....	37
3.3.1	<i>Beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionswege</i>	37
3.3.2	<i>Wirkung von Clopidogrel auf die Expression von CD40L</i>	38
3.4	MOLEKULARE IDENTITÄT VON THROMBOZYTÄREM CD40L	40
3.5	EXPRESSION VON CD40L AUF PRO-MEGAKARYOZYTEN	42
	WIRKUNGEN VON CD40L AUF GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN	43
3.6	CD40 UND CD40L WERDEN AUF SMC KOEXPRIMIERT.....	43
3.7	WIRKUNGEN VON sCD40L AUF DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION IN SMC	
	(PROTEINKINASEN).....	44
3.7.1	<i>sCD40L bewirkt die Phosphorylierung der ERK-1/2</i>	44
3.7.2	<i>sCD40L bewirkt keine Phosphorylierung von Akt</i>	46
3.7.3	<i>sCD40L induziert die Phosphorylierung der p38-MAPK</i>	47
3.8	WIRKUNGEN VON sCD40L AUF DAS NFκB-SYSTEM	48
3.8.1	<i>Degradation des Inhibitorproteins IκBα</i>	48
3.8.2	<i>Translokation von NFκB in den Zellkern von SMC</i>	50
3.9	WIRKUNG VON CD40L AUF DIE PROLIFERATION VON SMC	51
3.9.1	<i>Stimulation der DNA-Synthese in SMC durch sCD40L</i>	51

3.9.2	<i>Keine Zunahme der Zellzahl von SMC durch Stimulation mit sCD40L</i>	52
3.9.3	<i>Wirkung von Membran-gebundenem CD40L auf die DNA-Synthese in SMC</i>	53
3.10	WIRKUNG VON SCD40L AUF DIE APOPTOSE VON SMC	57
3.11	EFFEKT VON SCD40L AUF DIE MIGRATION VON SMC	58
4	DISKUSSION	59
4.1	EXPRESSION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON CD40L IN THROMBOZYTEN	59
4.2	MOLEKULARE IDENTITÄT VON THROMBOZYTÄREM CD40L	62
4.3	CD40L-EXPRESSION WÄHREND DER MEGAKARYOZYTENREIFUNG.....	64
4.4	EFFEKTE VON SCD40L AUF DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION IN SMC.....	65
4.5	WIRKUNGEN VON CD40L AUF DIE DNA-SYNTHESE UND PROLIFERATION VON SMC	67
4.6	WIRKUNG VON CD40L AUF DIE MIGRATION VON SMC.....	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	72
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	77
	KURZARTIKEL (ABSTRACTS) FÜR TAGUNGEN UND KONGRESSE.....	77
	VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN	78
8	DANKSAGUNG	79
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	80
10	LEBENS LAUF	81

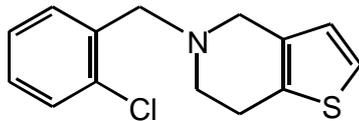
Abkürzungen

ACD	Zitronensäure-Zitrat-Dextrose (acid citrate dextrose)
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure/n
ASS	Acetylsalicylsäure
BAPTA/AM	[1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetra-(acetoxymethyl)-ester]
BrdU	5'-Brom-desoxy-Uridin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CD62P	P-Selektin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK-1/2	extracellular signal-regulated kinases-1/2
EZM	extrazelluläre Matrix
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GF-109203X	Bisindolylmaleimid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I κ B α	inhibitorisches Protein- κ B α
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)

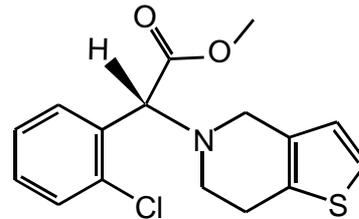
MCP	macrophage chemoattractant protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
NFκB	nukleärer Faktor-κB
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PDGF	platelet-derived growth factor-BB
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-(3)-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	plättchenreiches Plasma
sCD40L	löslicher CD40L (soluble CD40L)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TBST	TBS mit Tween
TBSTM	TBST mit Milchpulver
TF	Gewebethromboplastin (tissue factor)
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid-6 (SFLLRN)
U	Einheit (unit)
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule)

Strukturformeln

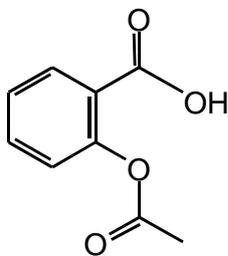
Ticlopidin



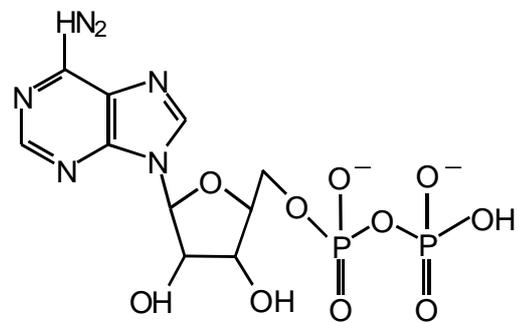
Clopidogrel



Acetylsalicylsäure



Adenosindiphosphat



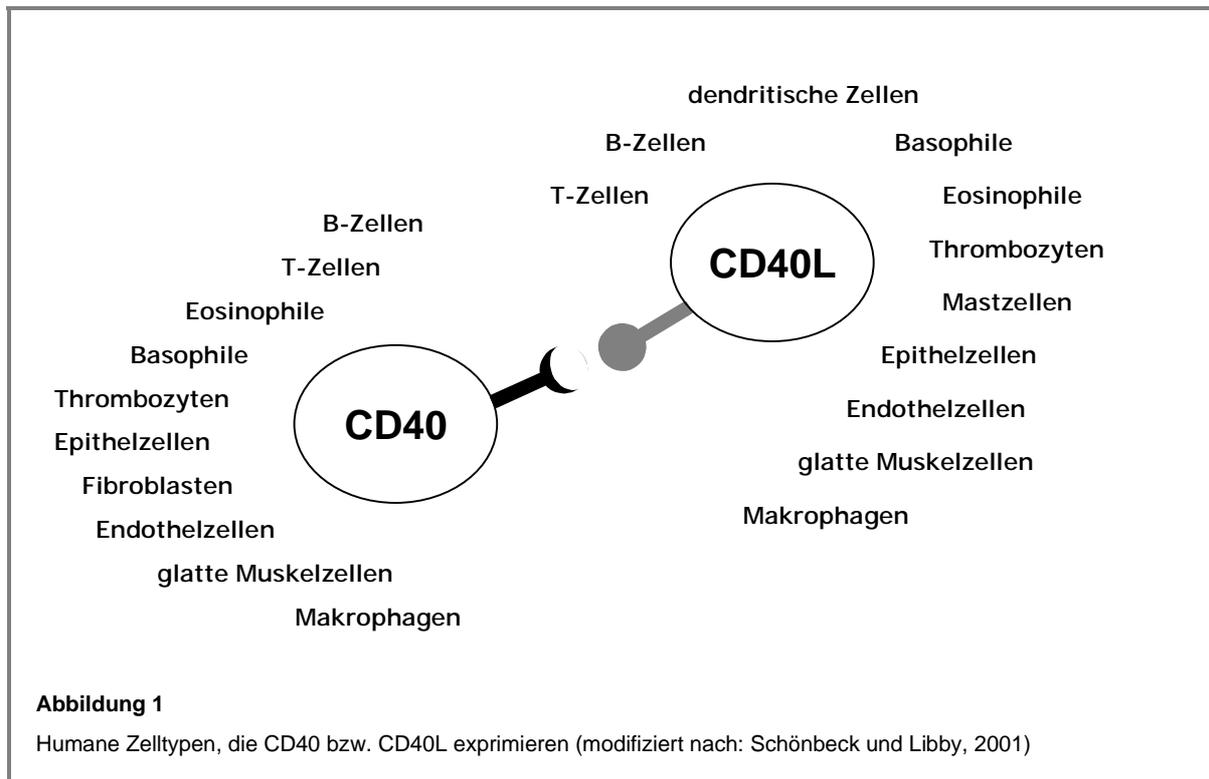
1 EINLEITUNG

1.1 Das CD40/CD40L Rezeptor/Ligand-System

Die ersten Berichte über dieses Rezeptor/Ligand-System stammen aus den frühen 80-iger Jahren. Der CD40-Rezeptor wurde bei immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörperklon gefunden, der ein 50 kDa schweres Protein auf der Oberfläche von B-Lymphozyten erkannte (Paulie et al., 1984, 1985). Die Expression dieses Moleküls variierte mit dem Aktivierungsstatus der B-Lymphozyten bzw. unter Stimulation durch einen noch unbekanntem Liganden, der die Differenzierung der Zellen induzierte. Spätere Studien erbrachten, dass die Aktivierung von B-Lymphozyten den direkten Kontakt mit T-Helferzellen erfordert. Die Identifikation des CD40-Liganden (CD40L, CD154; Lederman et al., 1992) und seine Klonierung (Graf et al., 1992) erfolgte 1992. Man glaubte zunächst, dass die Existenz von CD40L ausschließlich auf aktivierte T4⁺-Helferzellen beschränkt sei. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die Interaktion von CD40L mit seinem Rezeptor CD40 ursächlich die T-Zell-vermittelte B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung induziert. Erhärtet wurden diese Daten durch Versuche mit funktionsneutralisierenden Antikörpern, die die T-Zell-vermittelte Immunreaktion unterdrückten. In Übereinstimmung mit dieser primären Funktion der CD40/CD40L-Interaktion wurden Mutationen bzw. das völlige Fehlen des Liganden als Ursache der X-chromosomal-bedingten Immundefizienz, des „Hyper-IgM-Syndrom“ identifiziert (Callard et al., 1993). Bei dieser Erkrankung leiden die Patienten an einer drastisch erniedrigten bis völlig fehlenden T-Zell-vermittelten humoralen Immunreaktion. Infolge der fehlenden B-Zell-Aktivierung kommt es nicht wie üblicherweise im Verlauf der humoralen Immunreaktion zum Wechsel der Immunglobulinklasse vom IgM zum IgG-Typ. Daraus resultiert eine mangelhafte humorale Infektabwehr mit erniedrigten Spiegeln an IgG- und IgA- und erhöhten Spiegeln an IgM-Antikörpern.

Abgesehen von der Bedeutung der CD40/CD40L-Interaktion für eine adäquate Immunantwort, zeigten Arbeiten jüngerer Datums die Expression von CD40L auch auf anderen Zelltypen sowie die Beteiligung an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen. So wird CD40L auch auf Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen exprimiert (Mach et al., 1997). Oft wird zusätzlich zum Liganden auch der Rezeptor auf derselben Zelle koexprimiert (Yellin et al., 1995; Mach et al., 1997).

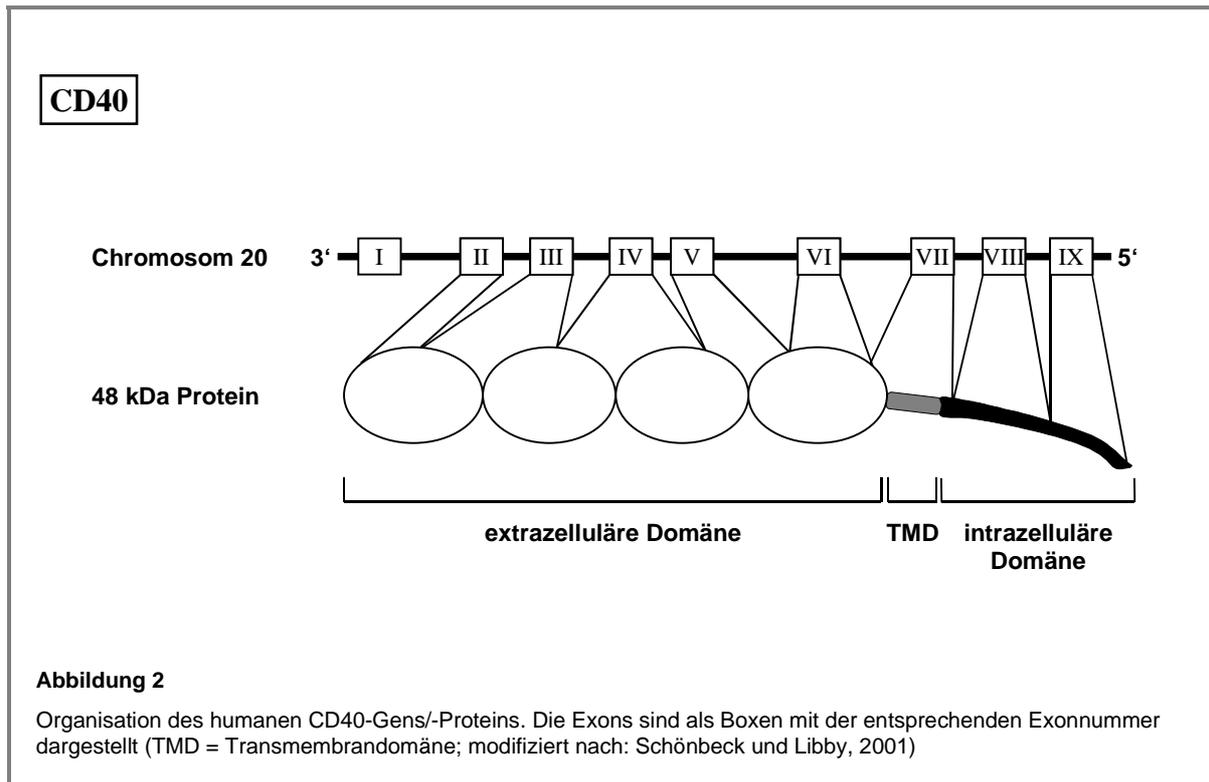
Die Entdeckung der breiten Verteilung des CD40/CD40L-Systems (Abb. 1) machte eine Beteiligung an anderen inflammatorischen Prozessen, wie z.B. der Atherosklerose, wahrscheinlich (nähere Ausführungen dazu folgen in Kapitel 1.4 und 1.5).



1.2 Struktur von CD40 und CD40L

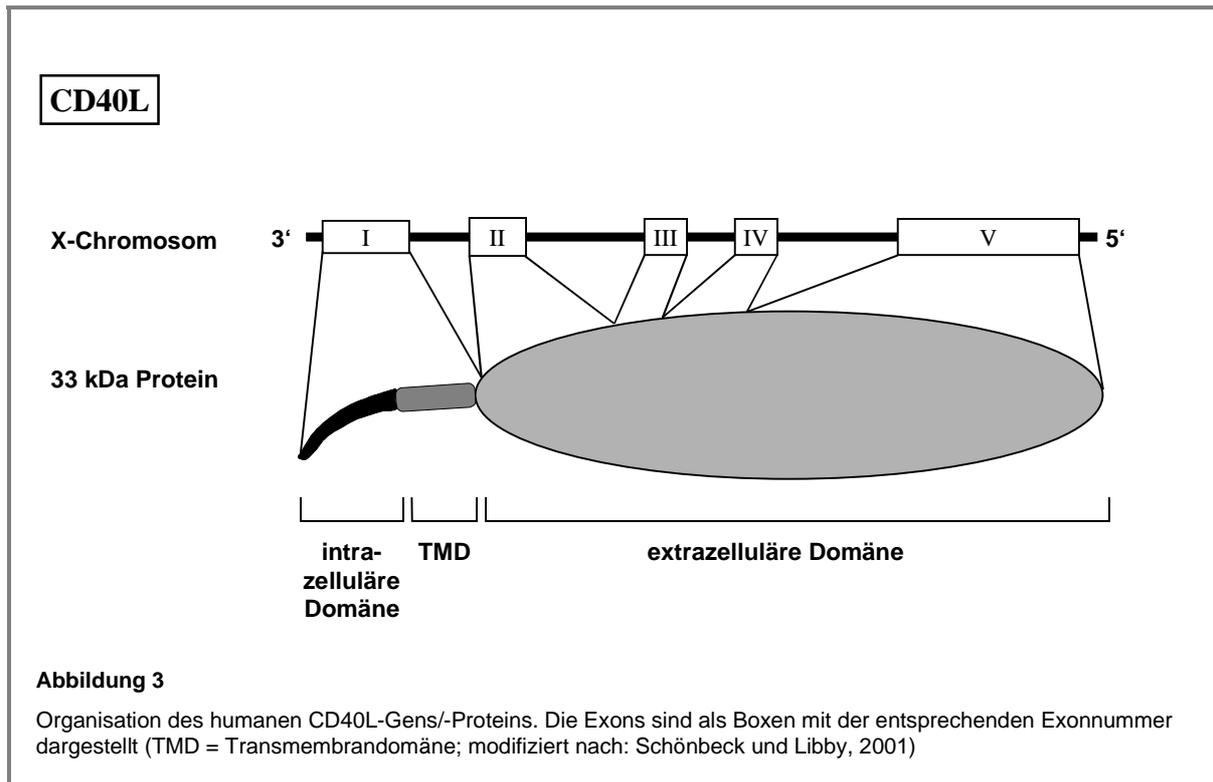
1.2.1 Struktur von humanem CD40

Der CD40-Rezeptor gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie, der neben den beiden TNF-Rezeptoren u.a. auch CD27, CD30 und Fas (CD95) angehören. Das Gen ist auf Chromosom 20 lokalisiert und kodiert für ein 277 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Einem 22 AS langen Signalpeptid folgt die 171 AS lange extrazelluläre Domäne, eine 22 AS lange Transmembrandomäne und eine 62 AS lange intrazelluläre Domäne. CD40 ist ein Typ-I Transmembranprotein, d.h. der C-Terminus liegt innerhalb, der N-Terminus außerhalb der Zelle und das gesamte Protein durchspannt die Zellmembran nur einmal (Abb. 2). Wie für Mitglieder der TNF-Familie, ist die extrazelluläre Domäne durch wiederholte AS-Sequenzen charakterisiert, die vier cysteinreiche Subdomänen bilden und typischerweise drei Disulfidbrücken enthalten. Die intrazelluläre Domäne hingegen weist keine enge Verwandtschaft zu anderen Mitgliedern der Familie auf. Sie verfügt aber über zwei Signaldeterminanten unter Beteiligung von Threonin 227 und 234.



1.2.2 Struktur von humanem CD40L

CD40L gehört ebenfalls zur TNF-Gen-Familie, der u.a. TNF α , CD27-Ligand, CD30-Ligand und Fas-Ligand (FasL) angehören. Die 13 kB umfassende DNA-Sequenz ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und besteht aus fünf Exons und vier Introns. Sie kodiert für ein 261 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. 215 AS entfallen auf den C-Terminus, 24 AS auf die Transmembrandomäne und 22 AS auf den N-Terminus (Abb. 3). CD40L ist ein Typ-II Transmembranprotein, d.h. es durchspannt die Membran nur einmal, wobei der N-Terminus innerhalb und der C-Terminus außerhalb der Zelle lokalisiert ist. Neben der Membran-assoziierten 33 kDa Form wurden kürzere, z.T. lösliche Formen mit Molekulargewichten von 28, 18 und 15 kDa in humanen T-Lymphozyten gefunden (Graf et al., 1995). Diese werden durch Trunkierung der 33 kDa Form vom N-terminalen Ende her gebildet. Noch ist nicht ganz klar, welche biologische Aufgabe den löslichen Formen von CD40L zukommt. Für FasL wurde gezeigt, dass die Transformation der Membran-gebundenen in die lösliche Form zum Verlust der biologischen Wirksamkeit führt (Schneider et al., 1998), während von TNF α bekannt ist, dass sowohl die Membran-gebundene als auch die lösliche Form gleichermaßen wirksam sind (Grell et al., 1995).



Untersuchungen eines löslichen, extrazellulären Fragmentes zeigten eine trimere Organisation, die die Zugehörigkeit zur TNF-Familie anhand weiterer Homologien nahelegt (Karpusas et al., 1995). Die Interaktion von CD40L mit dem CD40-Rezeptor wird über ionische Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren seitens des Liganden stabilisiert (Singh et al., 1998). Eine trimere Struktur von CD40L, die bei Interaktion mit seinem Rezeptor ebenfalls zu dessen Trimerisierung führt, wird für seine biologische Funktion favorisiert.

1.3 Die Signaltransduktion des CD40-Rezeptors

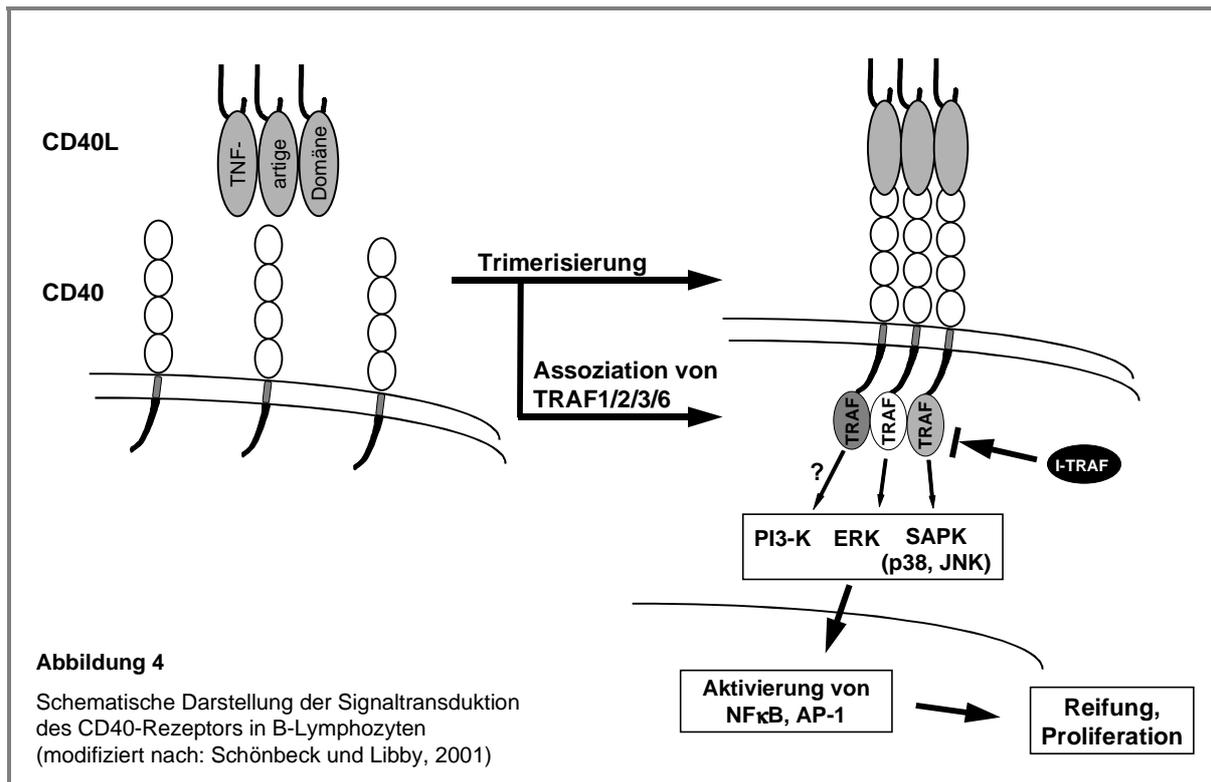
Trotz der großen Datenmenge, die in den letzten Jahren zum CD40/CD40L-System veröffentlicht wurde, ist das Bild der CD40-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion und der an der Signalübertragung beteiligten Faktoren noch unvollständig, ja z.T. sogar kontrovers. Der Großteil der Arbeiten wurde an B-Lymphozyten durchgeführt, wobei auch hier teilweise widersprüchliche Daten zwischen Primärkulturen und Zelllinien vorliegen.

Basierend auf den bestehenden Homologien zur TNF/TNF-Rezeptor-Familie wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von trimerisiertem CD40L ebenfalls zur Trimerisierung des CD40-Rezeptors führt (Peitsch und Jongeneel, 1993). Die zytoplasmatische Domäne verfügt über mindestens zwei Signaldeterminanten, von denen eine das Threonin 234 ist. Der Austausch dieses Threonins gegen Alanin bedingt den Verlust der Signaltransduktion. Threonin 234 scheint also als Phosphorylierungsstelle für die Interaktion mit weiteren Faktoren bedeutsam zu sein, da der Rezeptor selbst über keine Proteinkinaseaktivität verfügt. Man stellt sich daher vor, dass die CD40-medierte Signaltransduktion die nachgeschaltete Aktivierung von Kinasen/Phosphatasen einerseits und die Assoziation mit weiteren Faktoren (s. unten) andererseits auslöst.

In aktivierten B-Lymphozyten wurde eine Aktivierung der Phospholipase C γ 2 und der 85 kDa-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) gefunden (Ren et al., 1994). Weitere Arbeiten ergaben eine transiente Aktivierung sog. „Stress-aktivierter Proteinkinasen“ (SAPK; Berberich et al., 1996) und weiterer „Mitogen-aktivierter Proteinkinasen“ (MAPK) wie der „extracellular signal-regulated kinases-1/2 (ERK-1/2; Li et al., 1996). In Monozyten wurde ebenfalls die Aktivierung der ERK-1/2 gezeigt, jedoch keine Phosphorylierung anderer Mitglieder der MAPK-Familie, wie der p38-MAPK oder der c-Jun-N-terminalen-Kinasen (JNK; Suttles et al., 1999).

Da eine direkte Assoziation der Kinasen bzw. Phosphatasen mit dem CD40-Rezeptor nicht gezeigt werden konnte, wurden intermediäre CD40-bindende Proteine als ursächliche Vermittler der nachgeschalteten Signaltransduktion vermutet und zwischenzeitlich identifiziert. Diese Proteine gehören zur Familie der sog. TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs). TRAF-3 war das erste gefundene Protein, das nachweislich an den zytoplasmatischen Teil von CD40 assoziiert. Es ist ein ubiquitäres 62 kDa Protein und eines von sechs bekannten Mitgliedern der TRAF-Familie. Als nächstes wurde TRAF-2 im Zusammenhang der CD40-medierten Signaltransduktion gefunden und schließlich TRAF-5 und TRAF-6. Die Funktion der TRAFs wiederum wird offenbar durch inhibitorische Proteine (I-TRAFs) reguliert (Rothe et al., 1996). Darauf folgende Arbeiten an B-Lymphozyten

zeigten die Aktivierung der oben genannten Kinasekaskaden (ERKs, p-38-MAPK, JNKs) sowie die Phosphorylierung und Degradierung des inhibitorischen Proteins I κ B α mit nachgeschalteter Aktivierung des NF κ B-Systems und anderer Gene über TRAFs (zusammengefasst von Schönbeck und Libby, 2001). Ein Modell, wie man sich derzeit die Signaltransduktion des CD40-Rezeptors in B-Lymphozyten vorstellt, zeigt Abb. 4.



In anderen Zellsystemen ist die intrazelluläre Signaltransduktion nach der Interaktion von CD40L mit dem CD40-Rezeptors nur wenig untersucht. In Monozyten wurde die Aktivierung der ERK-Kaskade gezeigt (s. oben), in Fibroblasten aus verschiedenen Geweben die Mobilisierung des NF κ B-Systems (Sempowski et al., 1997, 1998) und in SMC die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, die Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen, die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und ebenfalls die Aktivierung von NF κ B (Lazaar et al., 1998).

1.4 Biologische Funktion von CD40L: Bedeutung für inflammatorische Prozesse in atherosklerotisch veränderten Geweben

Abgesehen von der Bedeutung für eine funktionierende humorale Immunreaktion, zeigten neuere Arbeiten eine weitläufige Verteilung des CD40/CD40L-Systems auch außerhalb von Immunreaktionen. Die Entdeckung der Expression von CD40 bzw. CD40L auf Atherom-assoziierten Zellen, wie Endothelzellen (EC), SMC, Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten, erbrachte neue Einblicke in die entzündlichen Prozesse während der Pathogenese und der Progression der Atherosklerose. Nach Ross (1999) spielen entzündliche Prozesse auf der Ebene atheromatös veränderter Zellen, der Umbau der extrazellulären Matrix und die Destabilisierung der die Läsion umgebenden fibrösen Kappe eine maßgebliche Rolle. Daneben ist die Proliferation und Migration von SMC ein entscheidender Faktor bei der atherosklerotischen Intimaverdickung (s. unten).

1.4.1 Aufregulation von Adhäsionsmolekülen und Regulation inflammatorischer Mediatoren

Die Beobachtung der Aufregulation von Adhäsionsmolekülen auf verschiedenen Zelltypen gehörte zu den ersten Entdeckungen der CD40/CD40L-Interaktion. Man hielt sie aber zunächst für bedeutsamer im Zusammenhang mit der humoralen Immunität, als für die Vermittlung zellulärer Reaktionen. Mit weiteren Untersuchungen wurde die Bedeutung in inflammatorischen Prozessen deutlicher. Die Interaktion von CD40L mit CD40 (Ligation) bewirkt in humanen peripheren Monozyten die Freisetzung von Zytokinen, wie TNF α und den Interleukinen IL-1, -6 und -8 (Kiener et al., 1995). In mehreren Arbeiten unabhängiger Gruppen wurde die Aufregulation der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, sowie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine/Chemokine, wie IL-1 β , -6 und -8 und des chemotaktischen Proteins „macrophage chemoattractant protein-1“ (MCP-1), nach der Ligation von CD40 in humanen EC gezeigt (Hollenbaugh et al., 1995; Yellin et al., 1995; Karmann et al., 1995, 1996; Dechanet et al., 1997). Diese neuen Arbeiten erbrachten damit grundlegende Daten zum Verständnis der CD40L-Wirkung in EC, wobei einerseits CD40L-exprimierende Zellen und andererseits rekombinanter löslicher CD40L (sCD40L) verwendet wurden. 1998 beschrieben Henn und Kollegen (Henn et al., 1998) zum ersten Mal die Aktivierung von EC durch CD40L auf Thrombin-aktivierten Thrombozyten. Arbeiten mit humanen Fibroblasten verschiedener Gewebe zeigten vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Freisetzung von Zytokinen, aber auch die Proliferation nach Ligation von CD40 mit seinem Liganden (Yellin et al., 1995; Sempowski et al., 1997, 1998).

1.4.2 Erhöhung der Extrazellulärmatrix-degradierenden Aktivität

Die ersten Hinweise für eine CD40-medierte Beeinflussung der extrazellulären Matrix (EZM) wurden im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression bzw. der Freisetzung von Matrix abbauenden Proteasen, den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gefunden. MMPs sind zinkhaltige Enzyme, die den Abbau von Bindegewebsstrukturen der EZM, wie z.B. Kollagenfasern, fördern. Malik et al. (1996) und Mach et al. (1997) zeigten eine erhöhte Expression von MMPs in Monozyten bzw. Makrophagen. Stimulation mit einer CD40L-exprimierenden Zelllinie bzw. rekombinantem sCD40L induzierte in einer Monozytenzelllinie und in Monozyten/Makrophagen aus peripherem Blut die Expression von interstitieller Kollagenase-1 (MMP-1), Gelatinase A und B (MMP-2 und -9) und Stromelysin-1 (MMP-3), -mRNA und -protein. Weitere Arbeiten zeigten die Expression dieser und weiterer MMPs in humanen EC (Mach et al., 1999) und vaskulären SMC (Schönbeck et al., 1997, 1999). In diesen Arbeiten wurde zusätzlich gezeigt, dass CD40L die Expression der biologischen Inhibitorproteine („tissue inhibitor of metalloproteinases“, TIMPs) der MMPs nicht oder nur schwach beeinflusst. Der Abbau der EZM durch MMPs ist insofern von Bedeutung, als die fortgeschrittene atherosklerotische Läsion über einen erhöhten Anteil von Strukturproteinen durch Ausbildung einer sog. fibrösen Kappe stabilisiert wird. Der Einfluss des CD40/CD40L-Systems auf diese Vorgänge wurde durch Mausmodelle untermauert, bei denen die „Ausschaltung“ des CD40/CD40L-Systems mit einer vermehrten Einlagerung von stabilisierenden Kollagenfasern einherging (Schönbeck et al., 2000; Lutgens et al., 2000). Die Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts in Richtung einer erhöhten enzymatischen Aktivität der MMPs birgt die Gefahr der Destabilisierung und Ruptur einer bestehenden atherosklerotischen Plaque und den mit ihr verbundenen bzw. gefürchteten thromboembolischen Komplikationen, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall (Mach et al., 1998).

1.4.3 Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität vaskulärer Zellen durch verstärkte Expression von Gewebethromboplastin („Tissue Factor“)

Schon in den frühen 80-iger Jahren wurde berichtet, dass Thrombozyten und aktivierte T-Lymphozyten die prokoagulatorische Aktivität der Gefäßwand und mononukleärer Zellen beeinflussen. Smariga und Maynard (1982) beschrieben die Expression von Gewebethromboplastin („tissue factor“, TF), des Initiators des extrinsischen Weges der Blutgerinnung, in Fibroblasten und SMC. Gregory und Edgington (1985) beschrieben die Aufregulation von TF in Monozyten durch T-Helferzellen über einen Kontakt-abhängigen Mechanismus. Als Mechanismus konnte in späteren Arbeiten die Interaktion zwischen CD40 und CD40L nachgewiesen werden (Mach et al., 1997; Pradier et al., 1996). In weiteren Arbeiten wurde die Erhöhung der TF-Expression in Endothelzellen durch CD40L-exprimierende T-Lymphozyten (Miller et al., 1998) bzw. durch aktivierte Thrombozyten (Slupsky et al., 1998) gezeigt. Kürzlich zeigten Schönbeck und Kollegen (2000) die Aufregulation der TF-Expression in vaskulären SMC nach CD40-Ligation, ohne eine gleichzeitige Beeinflussung des physiologischen Inhibitorproteins („tissue factor pathway inhibitor“, TFPI). Diese Daten deuten darauf hin, dass die CD40/CD40L-Interaktion direkt die prokoagulatorische Aktivität während inflammatorischer Prozesse moduliert.

1.5 Atherogenese und die Rolle von Thrombozyten/thrombozytärem CD40L bei der Progression der Atherosklerose

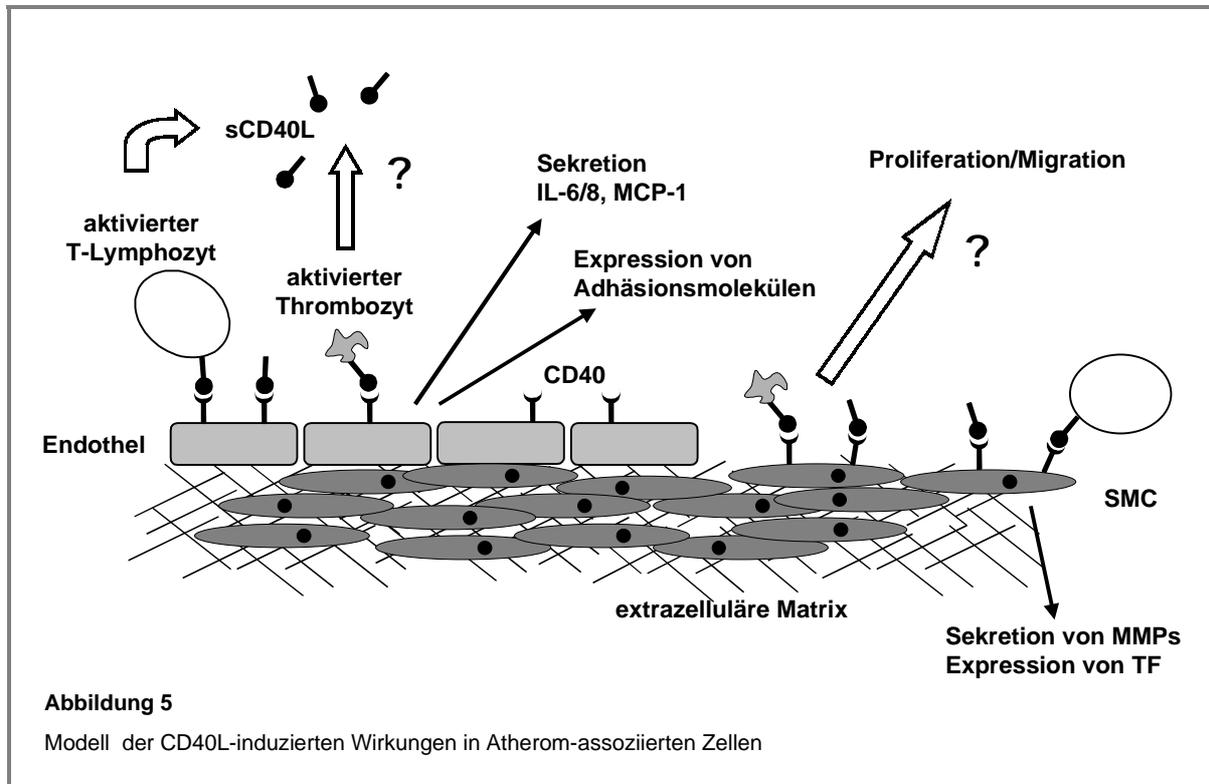
Ein Gefäß besteht in seinem histologischen Aufbau aus drei voneinander abgrenzbaren Schichten, an deren Aufbau wiederum verschiedenste Struktur-/Proteine und Zelltypen beteiligt sind. Die äußerste Schicht wird als Adventitia bezeichnet. Sie besteht aus einem lockeren Verband von Fibroblasten und Strukturproteinen, wie Kollagenen und Elastinen. Die mittlere Schicht, die Media, besteht hauptsächlich aus SMC und verleiht dem Gefäß seine strukturelle Integrität. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulation des Gefäßtonus. Die innerste Schicht wird Intima genannt und besteht u.a. aus Fibroblasten, SMC und Strukturproteinen. Den Abschluss zur luminalen Seite des Gefäßes bildet eine einzellige Schicht von EC, das sog. Gefäßendothel. Die Hauptaufgabe des Gefäßendothels besteht in der Regulation der Fließeigenschaften des Blutes, der Adhäsivität für Leukozyten und Thrombozyten und ebenfalls der Regulation des Gefäßtonus über die Bildung von SMC-relaxierenden Mediatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostazyklin (PGI₂). Ein gesundes Endothel weist nahezu keine adhäsiven Eigenschaften für Blutzellen auf und gewährleistet damit einen ungehinderten Blutfluss. Den Anfangspunkt der Atherogenese stellt

die sog. „endotheliale Dysfunktion“ dar, d.h. das Endothel ist nicht mehr in der Lage, seine physiologische Aufgabe auszuüben. Die ersten pathologisch sichtbaren Veränderungen im Bereich der Arterienwand sind intimale Lipideinlagerungen, die reich an oxidiertem „low density lipoprotein“ (oxLDL) sind. Die veränderten adhäsiven Eigenschaften des Endothels fördern die Einwanderung von Makrophagen, die infolge der erheblichen Phagozytose von Lipiden zu Schaumzellen werden. Nachfolgend erhöht sich durch freigesetzte Wachstumsfaktoren die Dichte an SMC, die wiederum EZM synthetisieren und freisetzen. Es kommt zur Verdickung der Intima.

Maßgeblich beteiligt an den geschilderten Prozessen sind Thrombozyten. An Stellen, an denen das Endothel geschädigt ist, kommt es u.a. zur Freilegung der daruntergelegenen Strukturen, dem Subendothel. Durch den Kontakt mit z.B. Kollagen kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten. Infolge der Aktivierung setzen sie den Inhalt ihrer Speichergranula frei, bei dem es sich um biologisch hochaktive Verbindungen, wie z.B. den Wachstumsfaktor „platelet-derived growth factor“ (PDGF), handelt. In vivo ist PDGF ein wichtiger Faktor für die Migration von SMC, mit der Folge der Einwanderung von SMC in das entsprechende Areal. Daneben werden weitere Faktoren, wie z.B. Thromboxan A₂ und Adenosindiphosphat (ADP), freigesetzt, was die Aktivierung, Aggregation und Adhäsion weiterer Thrombozyten fördert.

Arbeiten in jüngster Zeit haben gezeigt, dass die CD40/CD40L-Interaktion entscheidend die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von EC verändern kann (s. oben). Eine aktuelle Studie von Bruemmer et al. (2001) zeigte an humanen Iliacal-Arterien, dass die Expression von CD40 in vaskulären SMC und Makrophagen mit der Entwicklung früher atherosklerotischer Läsionen einhergeht, was die Beteiligung der CD40/CD40L-Interaktion an zellulären Entzündungsprozessen verdeutlicht. Die Entdeckung der CD40L-Expression auf aktivierten Thrombozyten (Henn et al., 1998) erbrachte neue Erklärungsansätze für die Veränderung der Eigenschaften des Endothels und der Gefäßwand. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von CD40L bzw. Thrombozyten wurde in einer Arbeit von Aukrust et al. (1999) gefunden. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris war der Spiegel von sCD40L im Plasma erhöht. Daraus wurde gefolgert, dass CD40L möglicherweise das Fortschreiten der Erkrankung bei diesen Patienten begünstigt. Als Quelle des gemessenen sCD40L vermuteten die Autoren die Thrombozyten.

Die Wirkungen von CD40L in Bezug auf inflammatorische und proatherogene Effekte lassen sich wie in Abb. 5 dargestellt zusammenfassen:



1.6 Fragestellungen der Arbeit

Zwei Themenkomplexe sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

- ❶ Im ersten Teil der Arbeit wird die Regulation der Expression von CD40L auf der Oberfläche von Thrombozyten untersucht, die Beeinflussung der Oberflächenexpression durch den Arzneistoff Clopidogrel charakterisiert und die an der Expression beteiligten intrazellulären Signalwege ermittelt. Anschließend wird untersucht, in welchem subzellulären Kompartiment CD40L im Thrombozyten lokalisiert ist. Abschließend wird die Regulation der CD40L-Expression auf Pro-Megakaryozyten untersucht und die molekulare Identität von thrombozytärem CD40L aufgeklärt.
- ❷ Im zweiten Teil der Arbeit wird die Wirkung von sCD40L auf die Aktivierung mitogener Signalwege in SMC untersucht. Daran anschließend werden die Effekte von löslichem und Membran-gebundenen CD40L auf die Proliferation und die Apoptose in SMC charakterisiert. Abschließend wird eine mögliche Beteiligung von CD40L an der Migration von SMC untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen und Chemikalien

Kollagen war von Nycomed (München); BAPTA/AM, GF-109203X, Genistein und der sCD40L-Kit von Alexis Biochemicals (Grünberg); sCD40L von Cell Concepts (Umkirch); PD98059 von New England Biolabs (Frankfurt a.M.); D-Erythrosphingosin und TNF α von Biomol (Hamburg); U46619 von Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA); SB202190 von Calbiochem (Bad Soden) und IFN γ von R&D Systems (Wiesbaden). α -Thrombin wurde freundlicherweise von Dr. J. Stürzebecher (Erfurt) zur Verfügung gestellt.

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungen wurden in bestverfügbarer Qualität und Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

Elektrophorese-Laufpuffer

1 x Laufpuffer
0,1 % SDS

10 x Laufpuffer:

250 mM Tris
1,9 M Glycin

2 x NP-40-Puffer:

300 mM NaCl
2 % Nonidet P-40
100 mM Tris / HCl
2 mM EDTA
0,04 % NaN₃
1 % (V/V) PMSF
pH 8

2 x Laemmli-Puffer:

125 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0
4 % SDS
20 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
100 mM Dithiothreitol (DTT)

Lysepuffer (Thrombozytenmembranen)

250 mM Saccharose
10 mM Tris / HCl
pH 7,5

PBS:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
8,3 mM Na₂HPO₄
pH 7,4

RIPA-Puffer

150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,4 % Desoxycholat
1 % Nonidet P-40
50 mM Tris / HCl
1 % (V/V) PMSF
pH 8

4 x Sammelgelpuffer:

0,5 mM Tris / HCl
0,4 % SDS
pH 6,8

10 x TBS:

100 mM Tris / HCl
1,5 mM NaCl
pH 7,4

TBST:

1 x TBS mit:
0,1 % Tween 20

TBSTM:

1 x TBS mit:
0,1 % Tween 20
5 % Magermilchpulver

Testmedium (HEPES-Tyrode):

134 mM NaCl
12 mM NaHCO₃
2,9 mM KCl
0,36 mM NaH₂PO₄
1 mM MgCl₂,
5 mM HEPES
5 mM Glucose
pH 7,4

Transfer-Puffer:

1 x Laufpuffer
20 % Methanol

4 x Trenngelpuffer:

1,5 mM Tris / HCl
0,4 % SDS
pH 8,8

Waschpuffer für Thrombozyten:

113 mM NaCl
4 mM Na₂HPO₄,
24 mM Na H₂PO₄
4 mM KH₂PO₄
pH 6,5

2.3 Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen CD61 (Klon SZ21), CD62P (Klon CLB-Thromb/6), CD63 (Klon CLB-gran12) und CD40L (Klon TRAP1) waren von Coulter-Immunotech (Marseille, Frankreich). Weitere monoklonale Antikörper gegen CD40L wurden von Ancell (Byport, MN, USA, Klon 24-31) und Alexis Biochemicals (Grünberg, Klon MK13A4) bezogen. Monoklonale Antikörper gegen CD42b waren von Dako (Hamburg). Polyklonale Antikörper gegen CD40L, CD62P, IκBα, NFκB (p50 und p65) sowie die Cy3-, FITC- und Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz- und Western Blot Untersuchungen waren von Santa Cruz (Heidelberg). Monoklonale anti-CD40-Antikörper waren von

PharMingen (Heidelberg, armenischer Hamster IgM, Klon HM40-3) und TNF α -neutralisierende Antikörper von R&D Systems (Wiesbaden). Als isotypische Kontrollantikörper wurden monoklonale Maus-IgG₁-Antikörper von Sigma (Klon MOPC-21) eingesetzt. Phosphospezifische, polyklonale Antikörper gegen die MAP-Kinasen ERK-1/2 und p38-MAPK sowie gegen Akt waren von New England Biolabs (Frankfurt a.M.).

2.4 Isolierung von gewaschenen Thrombozyten aus Vollblut und Thrombozytenkonzentraten

Frisches Zitrat-Vollblut (Zitronensäure-Zitrat-Dextrose ACD, 1:7 (V/V)) aus der Ellenbeugenvene gesunder Spender wurde in Portionen zu 2 ml aufgeteilt und 45 s in der Tischzentrifuge bei 2100 x g zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde abgehoben und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt (PRP + 20 % V/V ACD). Anschließend wurden die Thrombozyten für 35 s bei 3000 x g pelletiert, mit mindestens 1 ml Waschpuffer vorsichtig gewaschen, erneut für 30 s bei 3000 x g pelletiert und sofort weiterverarbeitet.

Tagesfrisches Vollblut der hiesigen Blutbank wurde in Portionen zu jeweils 35 ml in 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und bei 250 x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Das PRP wurde bis auf einen Rest von 5 mm abgehoben. Thrombozytenkonzentrate, ebenfalls aus der Blutbank, konnten direkt weiterverarbeitet werden. Der pH-Wert wurde mit ACD (20 % V/V) auf pH 6,5 eingestellt und in Portionen zu 35 ml bei 700 x g pelletiert. Die Thrombozytenpellets wurden mit 5 ml Waschpuffer resuspendiert, zu 30 ml vereinigt und erneut wie oben pelletiert. Für die Versuche wurden die Thrombozyten in einem adäquaten Volumen Testmedium aufgenommen und schnellstmöglich verarbeitet.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Kultur von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC)

Die verwendeten bovinen SMC entstammen dem Ramus interventricularis anterior der Koronararterie zweijähriger Färsen. Die Präparation erfolgte nach der Methode der enzymatischen Disaggregation wie von Zucker et al. (1998) beschrieben. Das Kulturmedium bestand aus 80 % Ham's F12, 20 % DMEM und den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml). Die Primärkultivierung erfolgte in Kulturflaschen unter Begasung mit Kohlendioxid (5 %) bei 37°C.

In Kulturmedium mit 10 % FCS bei 37°C und 5 % Kohlendioxid kultivierte SMC wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und mit 5 ml einer Lösung von Trypsin

(0,05 %) und EDTA (0,5 mM) vom Gefäßboden gelöst. Durch wiederholtes Aufsaugen mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in Einzelzellen aufgelöst. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen, in das zur Inaktivierung des Trypsins 5 ml FCS-haltiges Kulturmedium vorgelegt war, wurde 5 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert. Das weitere Vorgehen war abhängig von den nachfolgenden Experimenten: Für DNA-Synthesemessungen wurde das Zellpellet in 50 ml serumfreiem Medium (SFM) resuspendiert und zu 100 µl auf 96-Loch-Platten ausgesät. Für Zellzählungen wurde obige Zellsuspension 1:5 mit SFM verdünnt und ebenfalls zu 100 µl in 96-Loch-Platten ausgesät. Das SFM enthielt 80 % HAM's F12, 20 % DMEM, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,85 µg/ml Insulin, 0,2 mg/ml Glutamat, 5 µg/ml Transferrin und 35,2 µg/ml Ascorbinsäure. Für Migrations- und Western Blot Untersuchungen bzw. für die Weiterkultivierung wurde das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und in 24-Loch-Platten zu 500 µl verteilt bzw. in 150 mm Ø-Kulturschalen gesplittet. Bei Zellen in Kulturmedium wurde dieses bis zur Konfluenz der Zellen zweimal pro Woche ausgetauscht. Es wurden Zellen der Passagen 4-12 für die Experimente verwendet. Alle Arbeiten wurden steril und mit auf 37°C vorgewärmten Lösungen durchgeführt.

Die bei den Ergebnissen angegebene Zahl (n) entspricht der Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche mit verschiedenen Zelllinien.

2.5.2 Kultur von Pro-Megakaryozyten

Die Pro-Megakaryozyten Zelllinie MEG-01 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig) bezogen. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in Kulturflaschen bei 37°C und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.5.3 Kultur von T-Zell-Lymphomen

Zwei Zelllinien des menschlichen T-Zell-Lymphomtyps „Jurkat“ (je 1×10^6 Zellen) wurden von der Firma American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Dabei handelte es sich um die Linie „Jurkat D1.1“, die konstitutiv CD40L auf der Oberflächenmembran exprimiert und die Linie „Jurkat J45.01“, die als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und den Antibiotika Penicillin

(100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in Kulturflaschen bei 37°C und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.6 Apoptose-Assay

SMC wurden in 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert (ca. $2-2,5 \times 10^4$ SMC) und durch Serumentzug für 24 h synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen bis zu 72 h mit sCD40L (10 µg/ml) bzw. PDTC (100 nM) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden alle Zellen sofort aufgearbeitet. Der Zellkulturüberstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen lysiert. Im Lysat wurden dann als Marker der Apoptose die gebildeten DNA-Histon-Komplexe mittels des „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) quantitativ gemessen.

2.7 DNA-Synthese-Messung (BrdU-Assay)

SMC wurden in 96-Loch-Platten ausgesät (ca. 5000 SMC pro Loch, Konfluenzgrad vor Versuchsbeginn etwa 70 %). Drei Löcher wurden lediglich mit Medium beschickt (einer der beiden benötigten Korrekturwerte des Tests; Blank A). Nach 72 Stunden Synchronisation wurde die Stimulation (37°C, 5 % CO₂) der DNA-Synthese je nach Experiment mit unterschiedlichen Stimuli im Dreifachansatz durchgeführt. Die Markierung der Zellen und die Ausarbeitung aller Ansätze erfolgte mit Hilfe des „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

Nach 20 Stunden Stimulation wurde 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) als falscher Basenbaustein in einer Endkonzentration von 10 µM zu den Stimulationsansätzen für weitere 4 Stunden zugesetzt. Drei Löcher wurden nicht mit BrdU markiert (der zweite benötigte Korrekturwert, Blank B). Die Aufarbeitung der Ansätze erfolgte ab hier bei Raumtemperatur. Nach insgesamt 24-stündiger Inkubation wurden der Überstand entfernt und die Zellen für 30 Minuten fixiert und denaturiert. Nach Entfernung der Fixierlösung wurden alle Ansätze für 90 Minuten mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde 3x mit PBS gewaschen, alle Ansätze anschließend mit Substratlösung (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) versetzt und etwa 15-20 min inkubiert, bis die Positivkontrolle (FCS) deutlich blau gefärbt war. Anschließend wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlug und die Absorption nach 1 Minute bei 450 nm gegen 630 nm mit einem „Microplate-Reader“ (Modell 550, BioRad, München) gemessen. Die Absorption stellte nach

Abzug der beiden Korrekturwerte (Blank A = unspezifische Bindung des BrdU an das Plattenmaterial, Blank B = unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zellen) ein Maß für die DNA-Synthese dar.

2.8 Durchflusszytometrie

2.8.1 Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Zur Analyse der Oberflächenexpression von CD40L, CD62P und CD63 wurden gewaschene Thrombozyten in Testmedium mit Zusatz von 2 mM CaCl₂ und 0,5 mg/ml BSA in einer Dichte von 10.000/μl resuspendiert. Diese Dichte erlaubt die Stimulation der Thrombozyten ohne gleichzeitige Aggregation. Anschließend erfolgte die Stimulation mit verschiedenen Agonisten für 5 min. Für die Untersuchung von Inhibitoren erfolgte eine Vorinkubation für 5 min. 25 μl Thrombozytensuspension wurden nachfolgend mit 5 μl FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern für weitere 30 min in Dunkelheit inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung wurden FITC- oder PE-gekoppelte isotypische Antikörper verwendet. Nach Verdünnung mit 500 μl Isoton® (Beckmann Coulter, Krefeld) wurden die Proben sofort in einem EPICS-XL Zytometer (Beckmann Coulter, Krefeld) untersucht. Die Thrombozytenpopulation wurde anhand ihrer Eigenschaften im Vor- bzw. Seitwärtsstreulicht identifiziert. Die Streulichteigenschaften der Thrombozyten waren zuvor durch positive Färbung mit Antikörpern gegen das Thrombozyten-spezifische CD42b-Antigen ermittelt worden. Die Detektoren wurden auf logarithmische Amplifikation gesetzt und 30.000 Thrombozyten untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der System II (3.0) Software.

2.8.2 Quantitative Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Die quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CD40L, CD62P und CD63 auf Thrombozyten erfolgte mittels der Methode nach Quinn et al. (1999) unter Benutzung von Kalibrierungsbeads aus dem „Platelet GPIIb/IIIa Occupancy Kit“ (Biocytex, Marseille, Frankreich). Gewaschene Thrombozyten (10.000/μl) wurden mit verschiedenen Agonisten für 5 min stimuliert. Je 25 μl Thrombozytensuspension wurden dann mit 5 μl nicht konjugierten Antikörpern gegen CD40L, CD62P und CD63 für weitere 30 min inkubiert. Nachfolgend wurden 20 μl FITC-konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt und die Proben nach weiteren 30 min analysiert. Parallel dazu wurden mehrere Ansätze mit definierten Mengen an Maus-IgG-beschichteten Beads mit FITC-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert und

vermessen. Die Kalibrierungsgerade wurde durch Bezug der mittleren Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der beschichteten Antikörper je Ansatz ermittelt. Die quantitative Oberflächenexpression von CD40L, CD62P und CD63 unter ruhenden bzw. stimulierten Bedingungen wurde dann über deren mittlere Fluoreszenzintensität aus der Kalibriergeraden abgeleitet.

2.8.3 Durchflusszytometrie von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC)

SMC wurden in 6-Loch-Platten unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung mussten die Zellen zunächst abgelöst werden. Dazu wurden diese einmal mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 500 µl warmem Dissoziationsmedium 20 min bei 37°C unter leichtem Schütteln im Inkubator belassen. Die abgelösten Zellen wurden dann durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt und die Vereinzlung optisch unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die SMC wurden für 30 s bei 6000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 150 µl PBS + 0,5% BSA resuspendiert und die Vereinzlung erneut kontrolliert. Zur Erfassung der Streulichteigenschaften der SMC-Population wurden diese zunächst mit kaltem Ethanol fixiert und die Kerne mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumhomodimer gefärbt. 50 µl Zellsuspension wurden mit 250 µl Isoton® verdünnt und die Zellpopulation anhand der Fluoreszenz des Farbstoffes identifiziert.

Die Regulation von CD40 und CD40L auf SMC wurde folgendermaßen untersucht. SMC wurden 1-3 Tage mit TNFα (10 ng/ml), IFNγ (1000 U/ml) oder beiden Zytokinen kultiviert. Zu Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension (ca. 25.000 SMC) mit 10 µl PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD40 bzw. CD40L für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 250 µl Isoton® verdünnt und 5000 SMC vermessen.

2.8.4 Durchflusszytometrie von T-Zell-Lymphomzellen (Jurkat)

Zur Ermittlung des CD40L-Expressionsniveaus auf den humanen T-Zell-Lymphomlinien Jurkat D1.1 und Jurkat J45.01 wurden 500 µl Zellsuspension (1×10^6) für 5 min mit kaltem Ethanol fixiert und für weitere 5 min mit Ethidiumhomodimer angefärbt. Anschließend wurden 50 µl dieses Ansatzes mit 500 µl Isoton® verdünnt und die Zellpopulation anhand der Fluoreszenz des Farbstoffes und der Streulichteigenschaften ermittelt. Parallel dazu wurden 10 µl anti-CD40L-PE- bzw. Isotyp-PE-Antikörper mit 50 µl gewaschener Zellsuspension in Dunkelheit inkubiert und die CD40L-Oberflächenexpression bestimmt.

2.9 Expression von CD40L auf Thrombozyten nach Clopidogrelbehandlung (Probandenstudie)

Als Teilprojekt einer Probandenstudie, die die Untersuchung der Thrombozytenfunktion unter dem Einfluss der Antiplättchen-Substanzen Clopidogrel und Acetylsalicylsäure zum Ziel hatte, wurde auch die ADP-induzierte Expression von CD40L auf Thrombozyten untersucht. Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki und mit dem zustimmenden Votum der Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Zehn gesunde männliche Probanden mit einem Durchschnittsalter von $28,7 \pm 2,1$ Jahren nahmen für 7 Tage 75 mg Clopidogrel als Tablette (Plavix®, Sanofi Pharma Bristol Myers Squibb SNC, Paris, Frankreich) ein, nachdem sie entsprechend aufgeklärt wurden und schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben hatten. Die Untersuchung der CD40L-Expression erfolgte zu Beginn (vor) und am Ende der Studie 1 h nach der letzten Tabletteneinnahme mittels Durchflusszytometrie.

2.10 Immunfluoreszenz

2.10.1 Untersuchung von CD40L, CD62P und CD63 in Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten ($10.000/\mu\text{l}$) wurden 5 bzw. 30 min auf Glasplättchen inkubiert. Bei der 30-minütigen Inkubation kam es zur Ausbreitung der Thrombozyten auf dem Glasplättchen. Danach wurden die Zellen 5 min mit kaltem Methanol fixiert und luftgetrocknet. Die Präparate wurden 3x mit PBS gewaschen und mit 10 % Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingene, CA, USA) in PBS zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper ($20 \mu\text{g/ml}$ in PBS/0,5 % BSA) erfolgte bei 37°C für 60 min. Als Negativkontrolle fungierten unspezifische Maus IgG-Antikörper. Danach wurden die Präparate 3x für je 10 min mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und mit FITC-gekoppelten anti-Maus Antikörpern (1:100 in PBS/0,5 % BSA) für 45 min bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gewaschen, mit „SlowFade™ Antifade Reagenz“ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) auf Objektträgern eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch (BX-50, Olympus Optical, Hamburg) untersucht.

2.10.2 Färbung von filamentösem Aktin (F-Aktin) in Thrombozyten

Auf Glasplättchen ausgebreitete Thrombozyten wurden für 15 min mit Paraformaldehyd (1 % in PBS) fixiert und für 10 min mit Aceton permeabilisiert. Nach einem Wasch- und Rehydrierungsschritt mit PBS/0,5 % BSA wurde F-Aktin mit OregonGreen™-Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) für 20 min bei 37°C angefärbt. Die Präparate wurden gewaschen, ebenfalls in „SlowFade™ Antifade Reagenz“ eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.10.3 Nachweis von NFκB in SMC

SMC wurden auf Glasobjektträgern kultiviert, vor dem Experiment 24 h durch Serumentzug synchronisiert und für 15, 30 und 60 min mit sCD40L (10 µg/ml) und TNFα (10 ng/ml) stimuliert. Der Kulturüberstand wurde entfernt, die Zellen für 5 min mit kaltem Methanol fixiert und luftgetrocknet. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 20 min mit 10 % Pferdeserum in PBS geblockt. Die Inkubation mit anti-NFκB-Antikörpern (2 µg/ml in 1,5 % Pferdeserum in PBS) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Präparate für 45 min mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:100 in 1,5 % Pferdeserum in PBS) inkubiert. Nach dem Eindecken in „SlowFade™ Antifade Reagenz“ auf Objektträgern wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.11 Immunopräzipitation

2.11.1 Probenvorbereitung: Zytoskelett von Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten wurden für 5 min mit TRAP (100 µM) bei 37°C in Anwesenheit von RGDS-Peptid (500 µM) stimuliert. Durch Zugabe der gleichen Menge Triton-Lysepuffer, supplementiert mit Antiproteasen und 1 % (V/V) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, gesättigt in Ethanol), wurden die Thrombozyten lysiert. Die zytoplasmatischen Aktinfilamente wurden durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 min abgetrennt. Aus dem Überstand wurde dann das Membranzytoskelett durch Zentrifugation bei 100.000 x g für 2,5 h und 4°C gewonnen. Die beiden Pellets wurden für 30 min in RIPA-Puffer auf Eis unter PMSF- und Antiprotease-Schutz lysiert. Zur Gewinnung von Gesamtthrombozytenlysat wurden parallel gewaschene Thrombozyten (100.000/µl) pelletiert und in RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert. Alle Ansätze wurden kurz mit Ultraschall behandelt und für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die so gewonnenen Überstände wurden sodann der Immunopräzipitation unterzogen.

2.11.2 *Probenvorbereitung: Thrombozytenlysate und Stimulationsüberstände*

Gewaschene Thrombozyten einer Vollblutkonserve wurden in 2,5 ml Testmedium resuspendiert (ca. 3 ml Gesamtvolumen) und in drei Teile aufgeteilt. Zwei Drittel Thrombozytensuspension wurden je für 5 min mit TRAP (500 μ M) stimuliert. Danach wurden alle drei Teile 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge (13.000 rpm) zentrifugiert. Die Überstände aller Proben wurden vorsichtig und möglichst vollständig vom Pellet getrennt. Der Überstand einer der beiden stimulierten Proben wurde zur Abtrennung der während der Stimulation gebildeten Mikropartikel 2 h bei 105.000 x g ultrazentrifugiert. Anschließend wurden das Pellet der unstimulierten Probe und das Mikropartikelpellet für 30 Minuten mit 2 ml NP40-Puffer incl. 1 % PMSF (V/V) auf Eis lysiert. Die Überstände (je ca. 1 ml) der unstimulierten Probe, der stimulierten Probe und der Mikropartikelprobe wurden 1:2 mit 2 x NP40-Puffer incl. 2% PMSF (V/V) versetzt und ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Danach wurde 5 Minuten lang bei 12.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und der Immunopräzipitation unterzogen.

2.11.3 *Immunopräzipitation*

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden alle Ansätze mit 20 μ l Protein-G-PLUS-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg) versetzt und 30 Minuten bei 4°C im Rundschtüttler inkubiert (sog. Preclear). Anschließend wurde 15 Sekunden bei maximaler Leistung zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2,5 μ g Anti-CD40L-Antikörpern (TRAP1) versetzt und 6-12 Stunden bei 4°C im Rundschtüttler inkubiert. Hierbei kommt es zur Bindung des gesuchten Proteins (CD40L) an den Präzipitationsantikörper. Nach der Antikörperinkubation wurden 20 μ l Protein-G-PLUS-Agarose hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 4°C im Rundschtüttler inkubiert, was die Bindung des CD40L-Antikörperkomplexes an die Agarose bewirkte. Dieser Agarose-Antikörper-Protein-Komplex wurde abzentrifugiert und 3x mit RIPA- bzw. NP40-Puffer gewaschen und der Überstand vollständig durch Absaugen entfernt. Das Pellet wurde in 60 μ l Laemmli-Puffer resuspendiert und 4 Minuten auf 90°C erhitzt, um das Protein aus seiner Bindung mit dem Antikörper zu lösen. Der Überstand wurde sodann für die anschließenden Western Blot Untersuchungen verwendet.

2.12 Migrations-Assay

Gefäßmuskelzellen wurden wie beschrieben passagiert und in 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Durch Serumentzug wurden die Zellen für 24 Stunden synchronisiert. Mit einem Mechanotransduktor wurde ein Kanal definierter Breite in dem Zellmonolayer erzeugt und abgelöste Zellen mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Stimulation der Zellmigration mit PDGF-BB (20 ng/ml) und CD40L (1 – 10 µg/ml) für 72 Stunden (37°C, 5 % CO₂). Der Zellüberstand wurde entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Kerne der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (Hoe33258, 10 µg/ml in PBS) für 10 Minuten angefärbt. Drei Ausschnitte des Kanals mit einer Gesamtfläche von ca. 18 mm² wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Die fluoreszierenden Kerne der im jeweiligen Abschnitt in den Kanal eingewanderten Zellen wurden ausgezählt und addiert.

2.13 Präparation von Lymphozytenmembranen

Die Präparation von Lymphozytenmembranen erfolgte nach der Methode von Batot et al. (1998). 2×10^7 Lymphozyten wurden nach 2 maligem Waschen in 10 ml PBS in 1 ml PBS incl. 1% PMSF (V/V) resuspendiert und 2x für 10 s bei 40W mit Ultraschall behandelt. Das Zellhomogenat wurde für 10 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet, bestehend aus zwei Schichten zu je 4 ml 35% (m/V) und 15% (m/V) Saccharose in PBS mit 1 mM EDTA. Anschließend wurde für 75 min bei 150.000 x g zentrifugiert. Die Plasmamembranen reicherten sich dabei an der Grenze zwischen den beiden Saccharoseschichten an und wurden durch Absaugen gewonnen, 1:4 mit PBS verdünnt und wiederum 45 min bei 100.000 x g pelletiert. Die erhaltenen Pellets wurden in PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

2.14 Präparation von Thrombozytensubfraktionen/ -membranen

Die Präparation von Thrombozytensubfraktionen erfolgte nach der Methode von Barber und Jamieson (1970). Gewaschene Thrombozyten wurden zu 5 ml auf einen kontinuierlichen isotonen Glycerolgradienten (30 ml, 0-40%) aufgetragen und zunächst 30 min bei 1465 x g und 4°C und dann für weitere 10 min bei 5860 x g und 4°C zentrifugiert. Durch diesen Arbeitsschritt wird das Zytoplasma, nicht jedoch die Organellen mit 4,3 M Glycerol beladen. Das Pellet wurde zügig in 5 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert und kräftig gevortext.

Hierbei kommt es zur Lyse der Plasmamembranen, die Organellen aber bleiben intakt. Das Lysat wurde anschließend auf 10 ml einer 27%-igen Saccharoselösung (d 1,106) aufgetragen und für 3 h bei $63.500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. In diesem Schritt sedimentieren die Organellen und sonstige Zelltrümmer, die Plasmamembranen wandern in einen schmalen Bereich an der Saccharosegrenzschicht und das Zytoplasma verbleibt auf der Saccharoseschicht. Für Western Blot Untersuchungen wurden die Zytosol- und die Membranfraktion (je etwa 4 ml) mit 4 ml 2 x Laemmli-Puffer bzw. das Granulapellet mit 8 ml 1 x Laemmli-Puffer versetzt, 10 min auf 95°C erhitzt, aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur Gewinnung der Plasmamembranen wurde die Saccharosegrenzschicht abgenommen, mit Lysepuffer 1:10 verdünnt und erneut für 1 h bei $105.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthält die Plasmamembranen. Diese wurden in PBS resuspendiert und ebenfalls zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.15 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe des „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad, München) bestimmt. Als Referenz wurde eine Eichgerade mit BSA hergestellt. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 15 min nach Zugabe des Bradfordreagenz in einem „Microplate-Reader“ Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.16 Regulation der CD40L-Expression in Pro-Megakaryozyten (MEG-01)

MEG-01 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen wurden 1-4 Tage mit PMA (15 nM) stimuliert, die noch in Suspension befindlichen Zellen wurden abgenommen und die am Boden der Platte haftenden Zellen wurden nichtenzymatisch mit 500 μl Dissoziationsmedium abgelöst. Anschließend wurden beide Fraktionen durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Streulichteigenschaften erfasst und 30.000 Zellen bei logarithmischer Amplifikation auf CD40L-Expression untersucht.

2.17 Western Blot

2.17.1 Gewinnung des Zelllysates

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden SMC, wie beschrieben, bis zu einer Konfluenz von 90 % in 24-Loch-Platten kultiviert, dem jeweiligen Experiment entsprechend stimuliert und geerntet. Dazu wurde der Überstand entfernt, 1x mit PBS gewaschen, die Zellen mit 50 µl Laemmli-Puffer lysiert und mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst. Thrombozytenlysate in RIPA-Puffer wurden mit der gleichen Menge 2x Laemmli-Puffer versetzt. Danach wurden die jeweiligen Proben kurz sonifiziert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 95°C erhitzt, wobei durch das im Probenpuffer enthaltene DTT in den Proteinen vorhandene Disulfidbrücken reduktiv gespalten und durch das SDS denaturiert, gleichmäßig negativ aufgeladen und linearisiert werden.

2.17.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung und Analyse von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden diskontinuierliche Gele nach der Methode von Fling und Gregerson (1986) verwendet. Hierzu wurde ein Sammelgel (4 % Acrylamid) auf ein Trenngel (7,5, 12 oder 15 % Acrylamid) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden 10 oder 15 µl Probe auf das Gel aufgeladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V (konstant) für 45 Minuten in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1x Laufpuffer + 0,1 % SDS. Als Molekulargewichtsmarker diente ein biotinylierter Proteinstandard von New England Biolabs (Frankfurt a.M.).

2.17.3 Transfer der Proteine auf PVDF-Membran

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden diese nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine methanolbenetzte PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon P, Millipore-Sigma, Deisenhofen) übertragen. Der Transfer erfolgte in einer „Semi-dry“-Blotting Apparatur (BioRad, München) bei 10 V (konstant) für 30 Minuten in Anwesenheit von Transferpuffer.

2.17.4 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen (Antikörperhybridisierung)

Mit spezifischen Antikörpern wurden die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine detektiert. Der Erstantikörper wurde je nach den Empfehlungen der verschiedenen Hersteller 1:250 – 1:1000, der Zweitantikörper 1:3000 in TBSTM verdünnt. Bei der Bestimmung der MAP-Kinasen (ERK1/2 und p38-MAPK) sowie der Akt-Kinase wurden Antikörper gegen die phosphorylierte Form verwendet.

Nach folgendem Schema wurde vorgegangen:

1. Inkubation der PVDF-Membran in TBSTM für mindestens 1 Stunde. Damit wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran reduziert („Blocken“).
2. Inkubation mit der Erstantikörperlösung für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einer Laborwippe. Dazu wurde die Membran mit der Antikörperlösung in eine Folie unter Vermeidung von Lufteinschluss eingeschweißt. Die Antikörperlösung wurde mehrfach verwendet.
3. Einmaliges kurzes Abspülen der Membran mit TBST.
4. Dreimaliges Waschen der Membran mit TBST für je 15 Minuten.
5. Inkubation der Membran mit einem polyklonalen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegen die jeweilige Tierspezies des Erstantikörpers (Maus, Kaninchen oder Ziege) für 45 Minuten. Auch hier wurde die Membran zusammen mit der Antikörperlösung eingeschweißt.
6. Wiederholung der Schritte 3. und 4.
7. Abtropfenlassen der Membran und Zugabe von ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence, Roche Diagnostics, Mannheim). Durch die Oxidation von Luminol resultiert an den Stellen auf der Membran mit Peroxidaseaktivität Lichtemission.
8. Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK). Nach der Entwicklung wurden die Stellen der Antikörperbindung als schwarze Banden sichtbar.

2.17.5 Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung

Nach der Detektion wurde die PVDF-Membran in einer Amidoschwarzlösung (Sigma) 10 Minuten lang gefärbt. Nach der Entfernung der überschüssigen, nicht Protein-gebundenen Farbstoffmenge durch Inkubation für 10 Minuten in der gleichen Lösung ohne Amidoschwarz wurden die Proteinbanden sichtbar und es konnte eine gleichmäßige Proteinbeladung auf der Membran geprüft werden.

2.18 Zellzählung

SMC wurden wie beschrieben passagiert und in 96-Loch-Platten ausgesät (Konfluenzgrad ca. 20 %). Nach 72-stündiger Synchronisation wurde das SFM erneuert und die Zellen mit FCS (10 %), PDGF (20 ng/ml), und CD40L (10 µg/ml) für 96 Stunden (37°C, 5 % CO₂) in Dreifachbestimmung stimuliert. Der Zellüberstand wurde entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Kerne der Zellen mit dem DNA-Farbstoff bis-Benzimid (Hoe33258, 10 µg/ml in PBS) für 10 Minuten angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde ein repräsentativer Ausschnitt pro Loch bei 100-facher Vergrößerung fotografiert und die fluoreszierenden Kerne ausgezählt.

2.19 Statistik

Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden generell drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei mehr als drei Versuchen ist dies bei der jeweiligen Abbildung vermerkt. Bei Western Blots wurde jeweils eine repräsentative Abbildung von drei separaten Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis dargestellt.

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelerperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0,05 festgesetzt. In den Abbildungen wurden Signifikanzunterschiede durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

Bei statistischen Berechnungen wurde zunächst eine Varianzanalyse (Einweg-ANOVA für die Einzelwerte) durchgeführt. Signifikanzunterschiede wurden mit dem Dunnet-Test überprüft. Im Falle des Kruskal-Wallis-Tests wurden Signifikanzunterschiede mit den Dunn's Multiple Comparisons Test überprüft (nur bei Abb. 12 verwendet, es wurden Prozentwerte verglichen, deren Normalverteilung man nicht voraussetzen kann). Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Instat, Version 3.01 für Windows 95 der Firma GraphPad Software (San Diego, Kalifornien, USA).

3 ERGEBNISSE

CD40-LIGAND (CD40L) IN THROMBOZYTEN

3.1 Expression von CD40L auf der Oberfläche von Thrombozyten

Auf ruhenden Thrombozyten wird CD40L nur in sehr geringem Maße exprimiert. Eine Oberflächenexpression von CD40L lässt sich allerdings mit einer großen Anzahl von Thrombozyten-aktivierenden Substanzen bewirken. Dazu gehören u.a. ADP, Kollagen, Thrombin, Thrombinrezeptor-(PAR-1)-aktivierendes Peptid (SFLLRN, TRAP), das Thromboxan-A₂-Mimetikum U46619, Phorbolmyristatacetat (PMA) und das Calcium-Ionophor-A23187. Die Oberflächenexpression von CD40L, P-Selektin (CD62P) und CD63 wurde mittels quantitativer Durchflusszytometrie nach Stimulation mit ADP (30 µM) bzw. TRAP (100 µM) auf gewaschenen Thrombozyten untersucht und als absolute Anzahl der Moleküle pro Thrombozyt angegeben (Tabelle 1).

Tabelle 1:

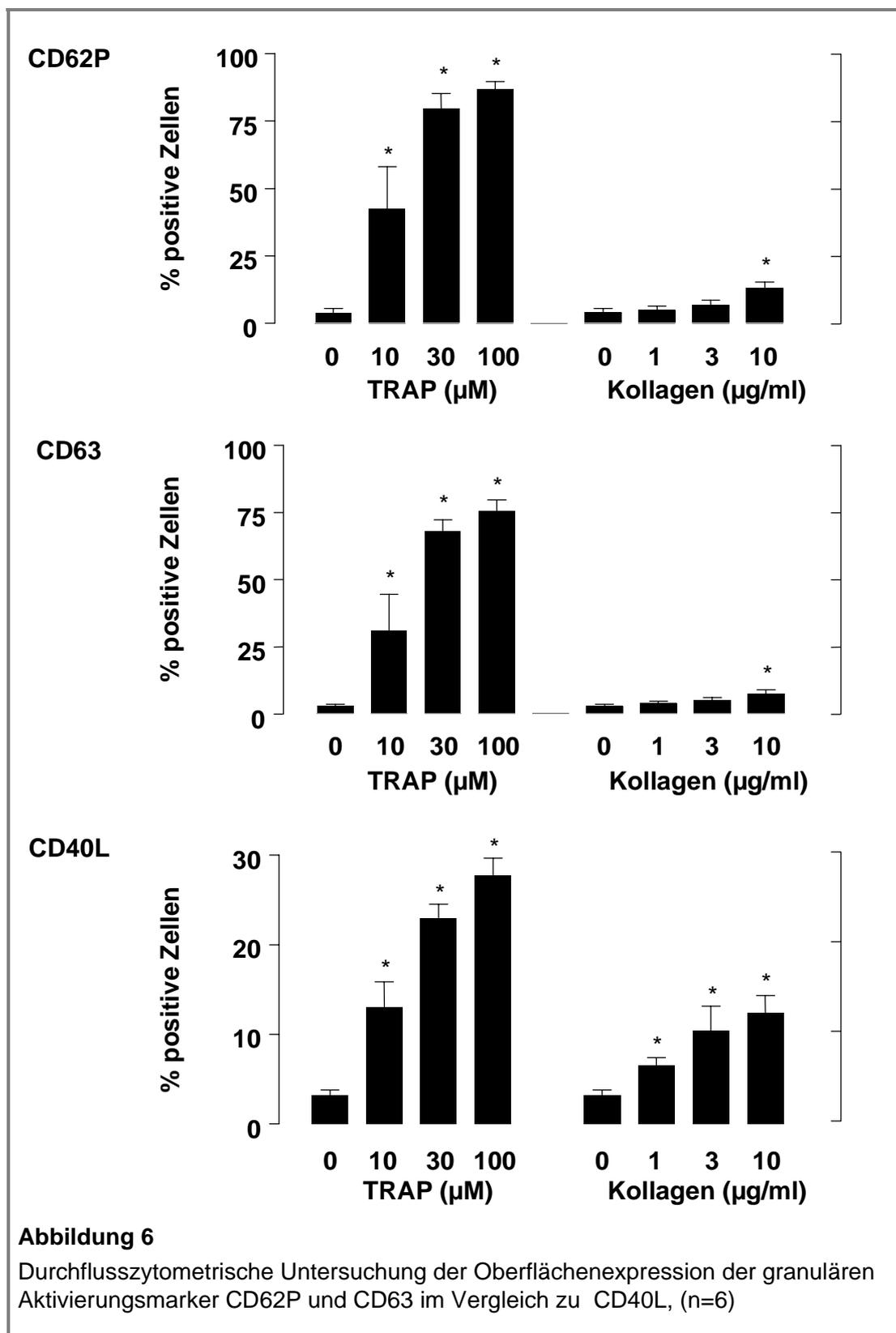
	CD40L	CD62P	CD63
Kontrolle	65 ± 9	124 ± 26	282 ± 41
ADP	227 ± 16*	5679 ± 1549*	1321 ± 401*
TRAP	314 ± 35*	6432 ± 1900*	3971 ± 612*

(Quantitative Durchflusszytometrie, n = 4)

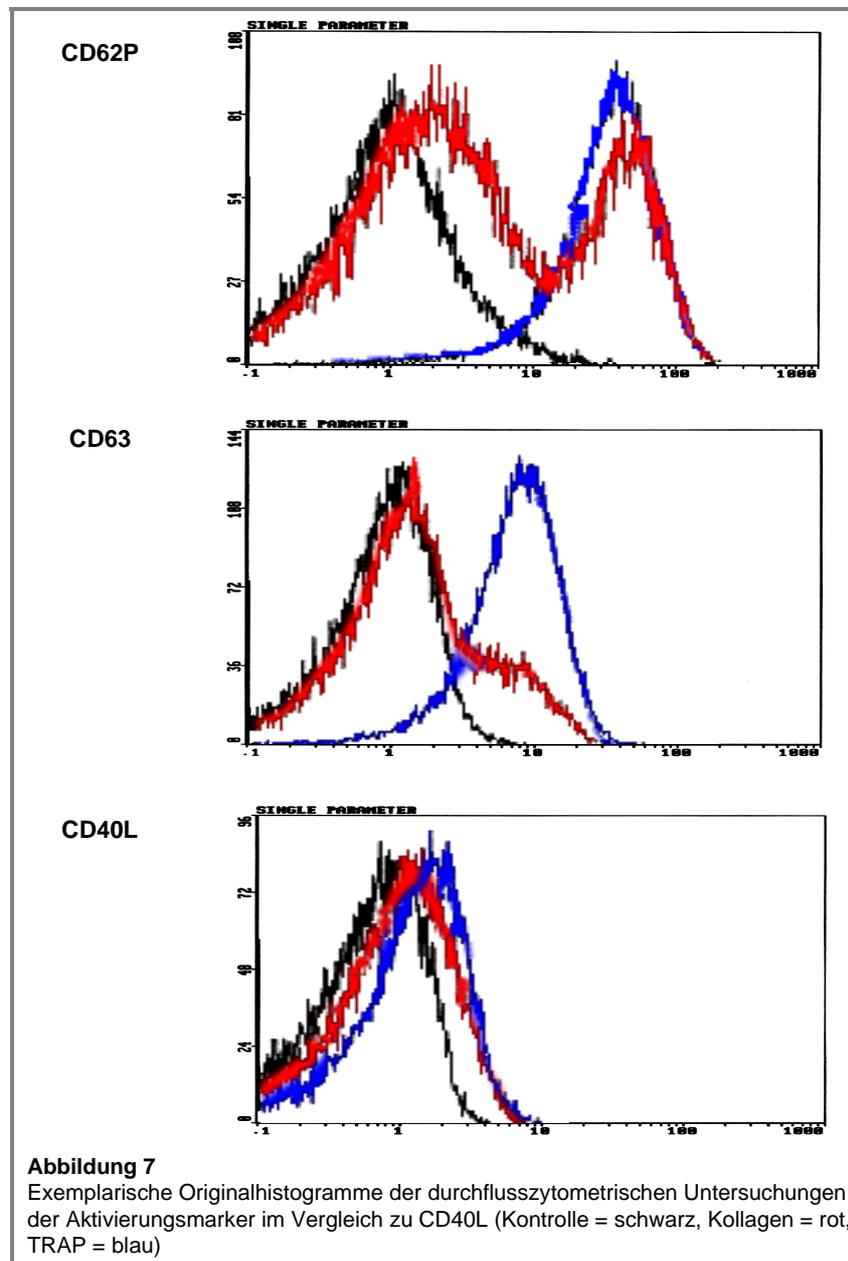
Diese Daten zeigen, dass CD40L verglichen mit dem α-granulären Marker CD62P und dem lysosomalen Marker CD63 nur schwach exprimiert wird. So steht der Zunahme der CD40L-Expression um den Faktor 5 unter Stimulation mit TRAP (100 µM) eine Zunahme der CD62P-Moleküle um den Faktor 50 gegenüber.

Bei der Stimulation mit TRAP wurden die Thrombozyten vollständig aktiviert, was sich in der Oberflächenexpression aller drei Marker, CD62P, CD63 und CD40L, äußerte. Stimulierte man Thrombozyten jedoch mit schwachen Agonisten (in Bezug auf die Translokation granulärer Marker), wie z.B. Kollagen, ergab sich ein anderes Bild: Lediglich bei der höchsten verwendeten Konzentration von 10 µg/ml Kollagen fand sich eine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von CD62P und CD63. Im Gegensatz dazu bewirkten

niedrige Konzentrationen von Kollagen (1-3 $\mu\text{g/ml}$) bereits eine signifikante Zunahme der CD40L-Expression. Abb. 6 zeigt die Befunde zusammenfassend.



Exemplarische Originalhistogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abb. 7) verdeutlichen die differentielle Regulation der granulären Marker gegenüber CD40L.

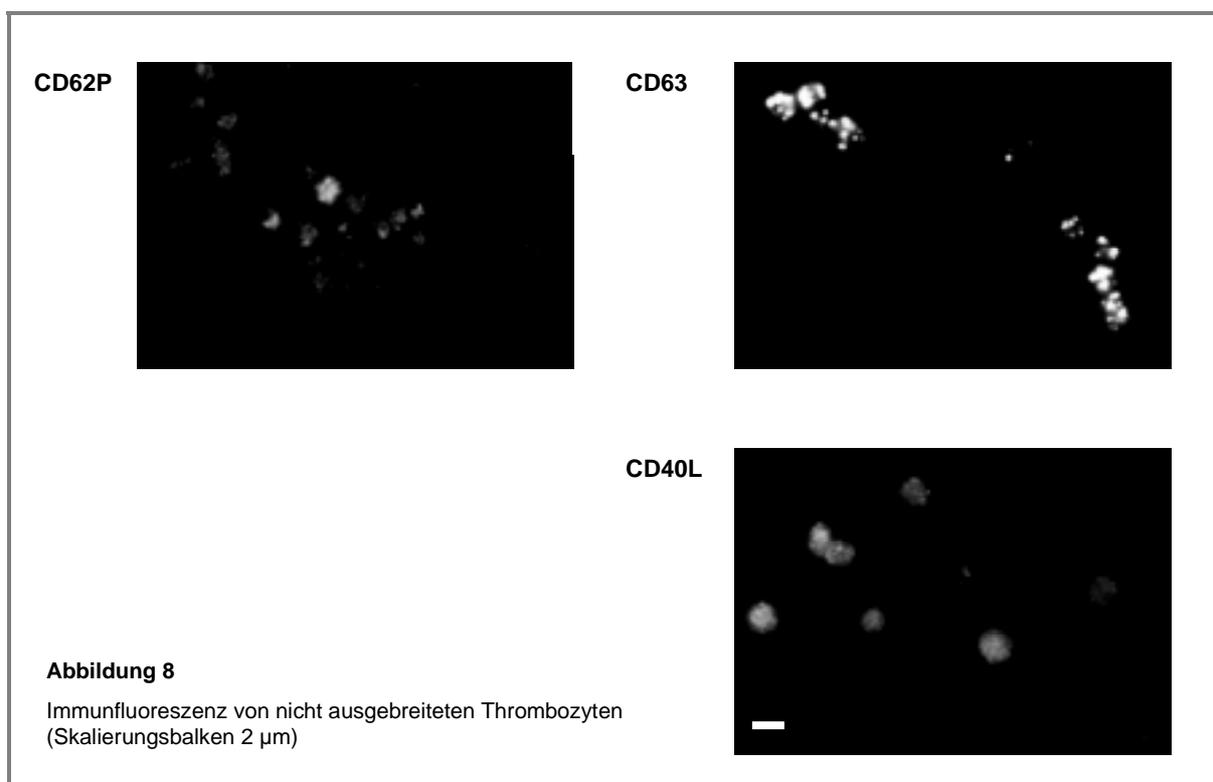


Interessanterweise zeigte sich, dass selbst nach Stimulation mit einer sehr hohen Konzentration von Kollagen (50 µg/ml) nur eine Subpopulation von Thrombozyten die granulären Marker exprimierte, während es nach Stimulation mit TRAP (100 µM) zu einer vollständigen Verschiebung der Fluoreszenzintensität kam. Betrachtet man aber die Kollagen-induzierte Expression von CD40L, zeigte sich ein differentielles Bild: Alle Thrombozyten wurden aktiviert, was an der uniformen Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu sehen ist.

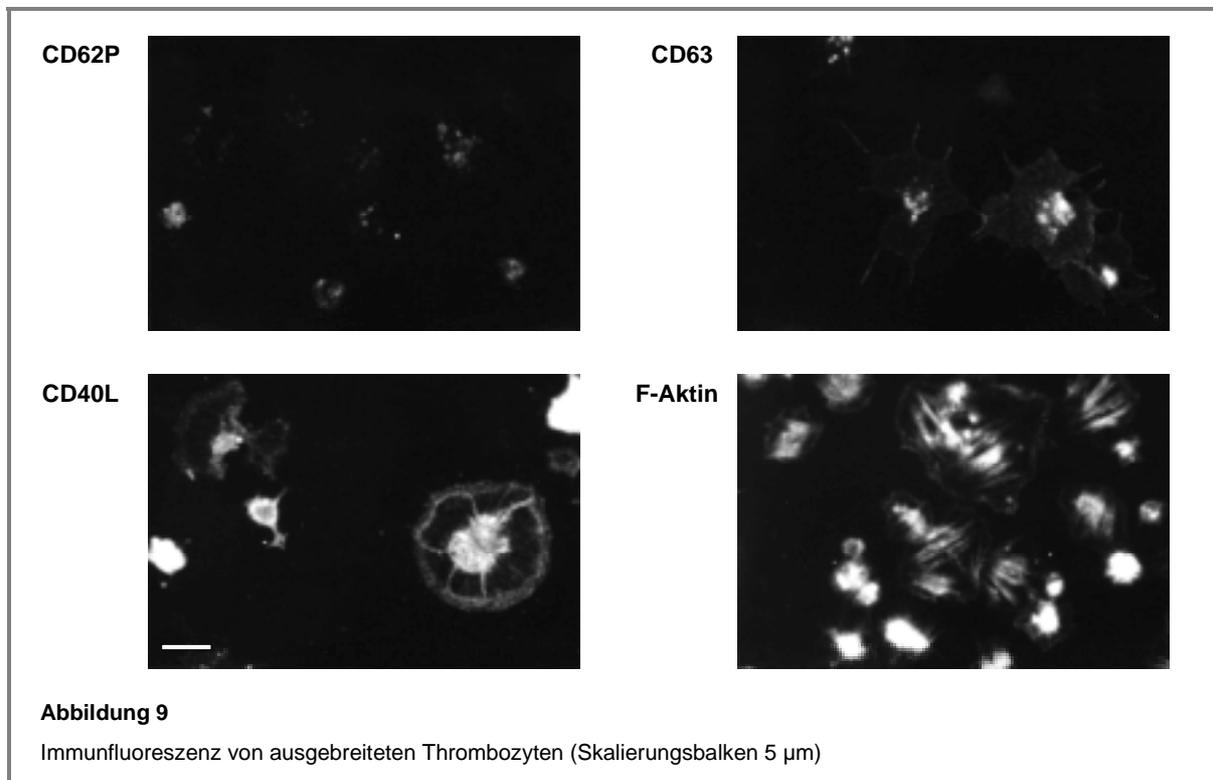
3.2 Subzelluläre Lokalisation von CD40L in Thrombozyten

Eine mögliche Erklärung für die durchflusszytometrischen Ergebnisse einer differentiellen Oberflächenexpression der untersuchten Aktivierungsmarker könnte eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation dieser Marker sein. Bisher wurde angenommen, dass CD40L (ebenfalls) in den α -Granula der Thrombozyten lokalisiert ist (Gawaz, 1999). Es existieren allerdings keine fundierten biochemischen Untersuchungen zu diesem Sachverhalt. Nachdem die vorangegangenen Ergebnisse ebenfalls annehmen ließen, dass es sich bei thrombozytärem CD40L nicht um ein granuläres Protein handelt, wurde dieser Fragestellung in den folgenden Untersuchungen nachgegangen.

Zunächst wurden nicht ausgebreitete Thrombozyten auf Glasobjektträgern mittels Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CD62P, CD63 und CD40L untersucht. CD62P und CD63 zeigten sich eindeutig lokalisiert in granulären Strukturen. Die Färbung von CD40L zeigte, obwohl eine geringe Granularität vorhanden war, eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 8).

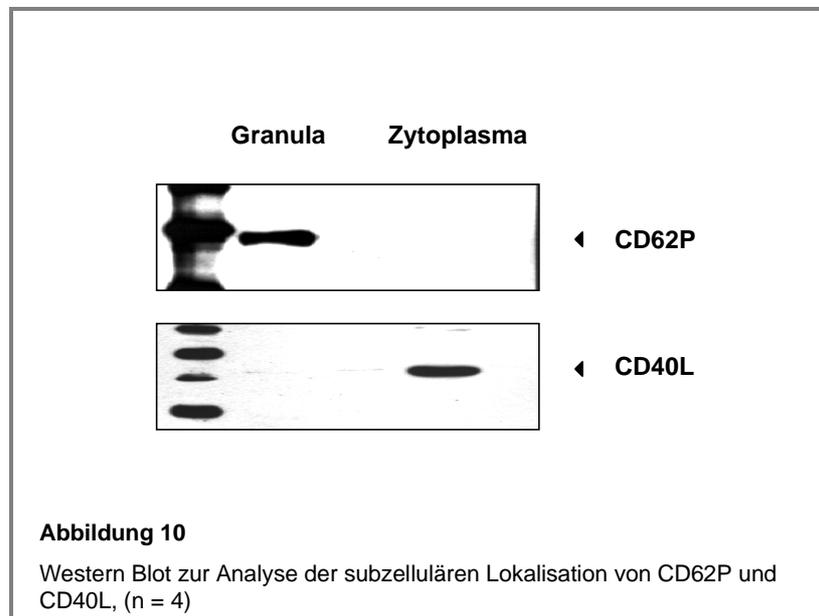


Die unterschiedlichen Verteilungsmuster werden noch deutlicher, wenn man auf Glasobjektträgern ausgebreitete Thrombozyten in gleicher Weise untersucht. Abb. 9 zeigt das granuläre Verteilungsmuster von CD62P und CD63. Im Gegensatz zu CD62P und CD63 zeigte CD40L einerseits eine konzentrierte Lokalisation im Zentrum des Thrombozyten mit nur geringer Granularität. Andererseits zeigte sich auch eine radiäre Struktur in Form eines peripheren Ringes. Um sicherzustellen, dass es sich nicht hauptsächlich um eine Assoziation von CD40L an das Zytoskelett handelt, wurde zusätzlich das Anfärbungsmuster von filamentösem Aktin (F-Aktin) untersucht, das eine gänzlich andere, gebündelte Struktur aufwies.



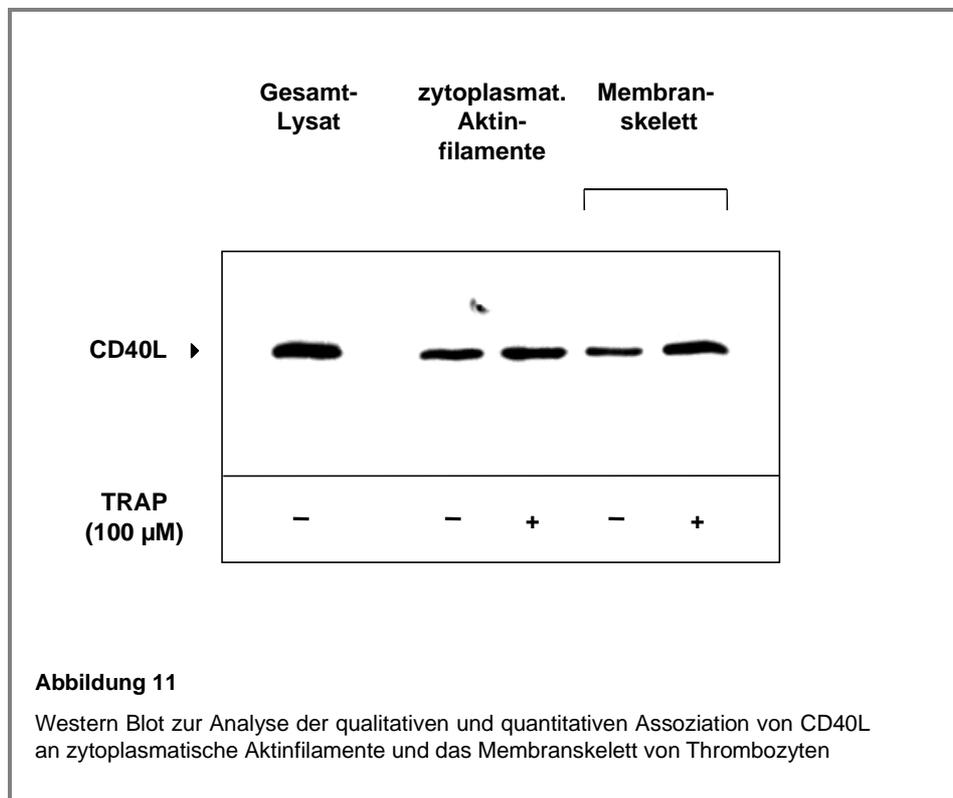
Diese Daten lassen darauf schließen, dass CD40L eher zytoplasmatisch lokalisiert ist. Eine Assoziation an zytoskelettale Strukturen konnte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da auch hier eine gewisse zentrale Fluoreszenz beobachtet wurde.

Die Lichtmikroskopie ist mit ihrer begrenzten Auflösung bei der Untersuchung der Morphologie solch kleiner Zellen wie Thrombozyten nicht geeignet, um endgültige Aussagen über die subzelluläre Lokalisation von CD40L zu machen. Aus diesem Grunde wurden Subfraktionierungen von Thrombozyten angefertigt und diese biochemisch weiter untersucht. Dazu wurden Glycerol-beladene Thrombozyten einer hypotonen Lyse unterzogen und durch Ultrazentrifugation Granula und Zytoplasma aufgetrennt. Diese Subfraktionen wurden dann im Western Blot untersucht. Das granuläre Protein CD62P war ausschließlich in der Granulafraktion zu finden, während CD40L ausschließlich in der Zytoplasmafraktion detektiert werden konnte (Abb. 10).



Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie keinen Hinweis für eine Assoziation von CD40L mit filamentösem Aktin zeigte, kann eine Anbindung an das Zytoskelett des Thrombozyten nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden einerseits zytoplasmatische Aktinfilamente und andererseits das Membranskelett aus Thrombozyten isoliert. Mittels Triton-X-100-Lyse ist es möglich, membranäre Strukturen zu zerstören, während Aktinfilamente des Zytoskelettes unter diesen Bedingungen unlöslich bleiben. Durch Zentrifugation bei 12.000 x g gewinnt man zunächst die zytoplasmatischen Aktinfilamente und aus dem Überstand kann durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g das Membranskelett präpariert werden. Anschließend wurden beide Präparationen einer Lyse in RIPA-Puffer unterzogen. Nun wurde CD40L aus den Lysaten immunopräzipitiert und im Western Blot untersucht. Zum Vergleich wurde

CD40L aus Gesamthrombozytenlysat ebenfalls immunpräzipitiert und im Western Blot untersucht. CD40L lag sowohl an zytoplasmatische Aktinfilamente als auch an das Membranskelett assoziiert vor (Abb. 11).



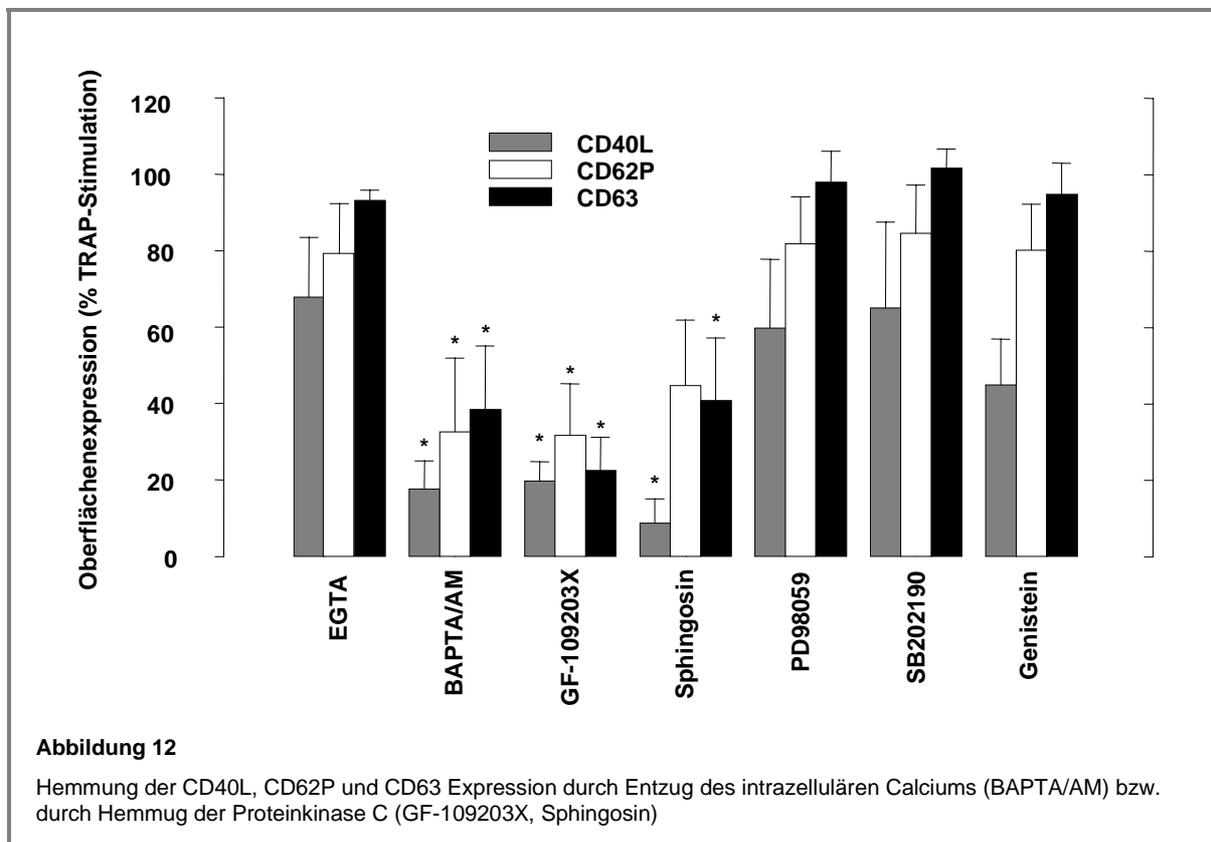
Quantitativ betrachtet, handelte es sich jedoch bei dem aus den Zytoskelettpräparationen immunpräzipitierbaren CD40L um weniger als 10%, des Ertrages aus Gesamthrombozytenlysat. Dies ergibt sich daraus, dass für identisch starke Signale im Western Blot die 10-fache Menge an Thrombozytenzytoskelettprotein präpariert werden musste.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Aktivierung der Thrombozyten durch TRAP mit einer Zunahme der CD40L-Assoziation an das Zytoskelett einhergeht. Wie in Abb. 11 zu sehen, kam es lediglich zu einer geringen Zunahme der CD40L-Assoziation an das Zytoskelett. Diese Daten machen wahrscheinlich, dass CD40L vorwiegend als lösliches Protein im Zytosol des Thrombozyten vorliegt.

3.3 Regulation der CD40L-Expression in Thrombozyten

3.3.1 Beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionswege

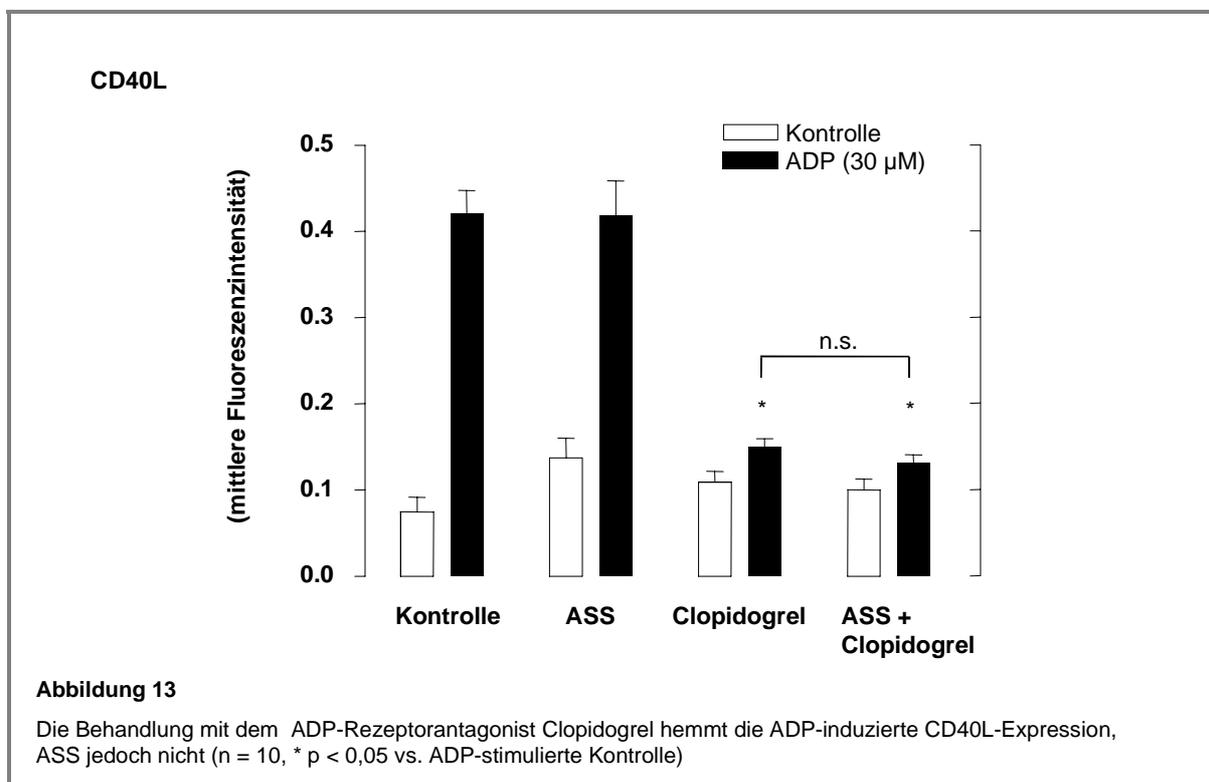
Als Nächstes wurde untersucht, welche intrazellulären Signaltransduktionswege an der Expression von CD40L, CD62P und CD63 bei der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt sind. Dazu wurden gewaschene Thrombozyten für 5 min mit Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege inkubiert und anschließend für weitere 5 min mit TRAP (100 μ M) stimuliert. Die Messung der Oberflächenexpression der drei Marker erfolgte durchflusszytometrisch. Abb. 12 zeigt, dass die Komplexierung intrazellulären Calciums mittels BAPTA/AM (100 μ M) und die Hemmung der Proteinkinase C mittels GF-109203X (1 μ M) bzw. D-erythro-Sphingosin (10 μ M) zu einer stark reduzierten Expression aller drei Marker führte. Die Komplexierung extrazellulären Calciums mittels EGTA (2 mM) hatte dabei ebensowenig Einfluss auf die Expression der drei Marker wie die Hemmung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38 und ERK-1/2 mit SB202190 (10 μ M) bzw. PD98059 (10 μ M). Die Hemmung der Tyrosinkinasen mit Genistein (10 μ M) ergab zwar eine Tendenz zur Reduktion der CD40L-Expression, diese war allerdings nicht statistisch signifikant.



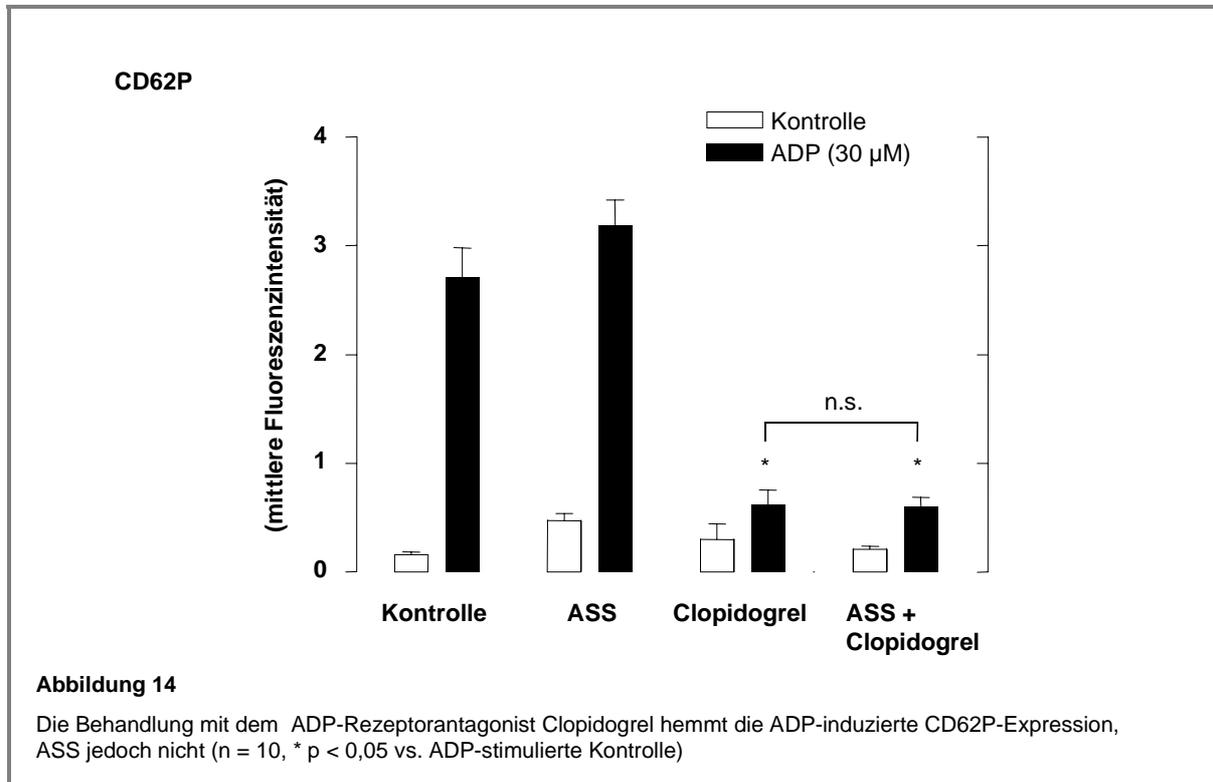
Die Daten zeigen, dass die Sekretion von α -Granula, Lysosomen und die Expression von CD40L offenbar von denselben Signaltransduktionswegen abhängig sind.

3.3.2 Wirkung von Clopidogrel auf die Expression von CD40L

Clopidogrel, die Nachfolgesubstanz von Ticlopidin, ist vor einigen Jahren erfolgreich in die Therapie eingeführt worden. Der aktive Metabolit von Clopidogrel bindet irreversibel an den kürzlich klonierten ADP-Rezeptor P2Y₁₂ und unterbindet dadurch die ADP-vermittelte Thrombozytenaktivierung (Savi et al., 2000). Als Teil einer Probandenstudie wurden die Effekte von Clopidogrel und Acetylsalicylsäure (ASS) auf die CD40L-Expression untersucht. 10 gesunde männliche Probanden ($28,7 \pm 2,1$ Jahre) nahmen über 7 Tage 75 mg/d Clopidogrel ein. Die ADP (30 μ M)-induzierte CD40L-Expression wurde zu Beginn und am Ende der Studie durchflusszytometrisch untersucht. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich vor der ADP-Stimulation für 15 min mit ASS (100 μ M *in vitro*) als Negativkontrolle bei Raumtemperatur inkubiert. In Abb. 13 ist dargestellt, dass die Behandlung mit Clopidogrel die ADP-vermittelte CD40L-Expression vollständig unterbindet, während ASS erwartungsgemäß unwirksam ist.

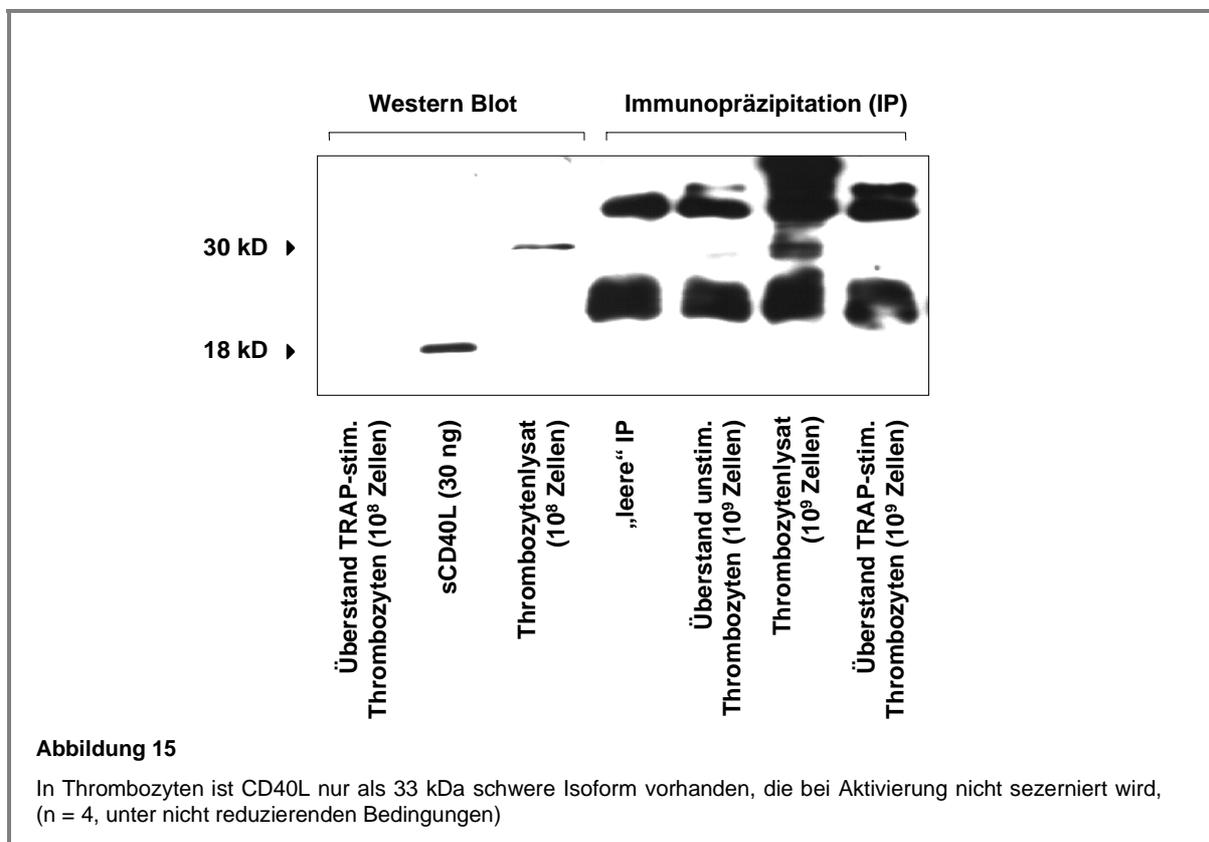


Ähnliche Befunde ergaben sich in Bezug auf die Expression des α -granulären Markers CD62P. Erwartungsgemäß hatte ASS keinen Einfluss auf die ADP-induzierte Expression, während Clopidogrel sie vollständig aufhob (Abb. 14).



3.4 Molekulare Identität von thrombozytärem CD40L

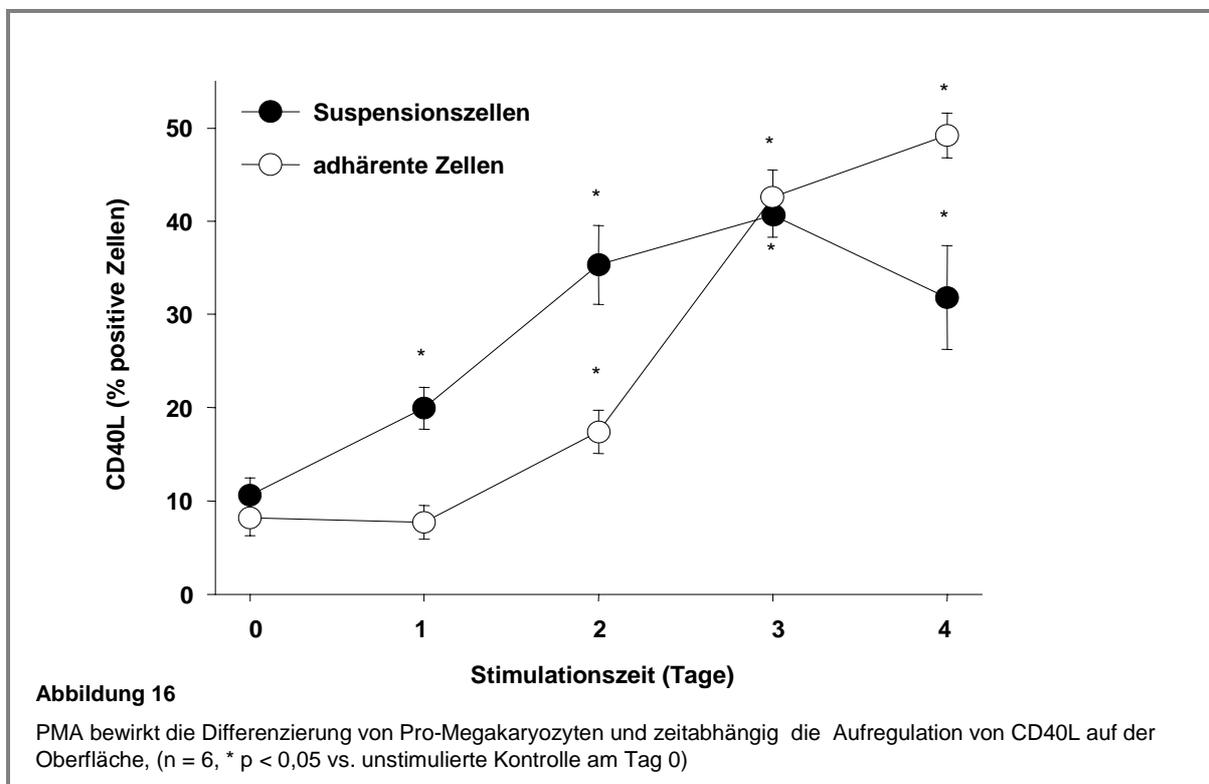
In T4⁺-Lymphozyten wurden mehrere Isoformen von CD40L beschrieben. Zum einen 33 bzw. 28 kDa große Formen mit Transmembrandomäne und zum anderen trunkierte, lösliche Formen mit Molekulargewichten von 18 bzw. 15 kDa. Die löslichen Formen werden allerdings nicht durch Proteolyse von Membran-ständigem CD40L, sondern nach Synthese der 33 kDa schweren Form abgespalten, intrazellulär gespeichert und infolge Stimulation freigesetzt (Graf et al., 1995). Thrombozyten als kernlose Zellen müssten daher seitens ihrer Vorläuferzellen mit löslichen Formen ausgestattet sein, da sie keine eigene Proteinsynthese durchführen können. Die folgende Untersuchung hatte das Ziel, die molekulare Identität von thrombozytärem CD40L zu klären. Zu diesem Zweck wurden gewaschene Thrombozyten (10^8 - 10^9 Zellen/Ansatz) für 30 min mit TRAP (500 μ M) bei 37°C stimuliert. Zum Vergleich wurden nicht stimulierte Ansätze bei 37°C inkubiert. Die Thrombozyten wurden abzentrifugiert und lysiert. Die Detektion von CD40L in beiden Fraktionen, d.h. im Zellpellet und im Überstand, erfolgte einerseits durch direkten Western Blot und andererseits nach vorheriger Immunopräzipitation. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigt Abb. 15.



In beiden Versuchsansätzen, d.h. im direkten Western Blot und nach vorangegangener Immunopräzipitation, ist CD40L nur im Zellpellet als 33 kDa Form nachweisbar. Die Detektionsgrenze für sCD40L betrug 3 ng im direkten Western Blot und 30 ng bei der Immunopräzipitation. Diese Daten zeigen, dass Thrombozyten über keine der bekannten modifizierten Formen von CD40L in gespeicherter Form verfügen, die sie infolge Aktivierung freisetzen könnten. Ebenso tritt nach der Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP unter den hier gewählten Bedingungen offenbar keine proteolytische Freisetzung löslicher Formen aus membrangebundenem CD40L auf.

3.5 Expression von CD40L auf Pro-Megakaryozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CD40L auf Thrombozyten exprimiert wird, galt die nachfolgende Untersuchung dem Ziel, zu überprüfen, ob auch die Vorläuferzellen der Thrombozyten, die Megakaryozyten, CD40L exprimieren. Dazu wurde die Oberflächenexpression von CD40L in der Pro-Megakaryozyten-Zelllinie MEG-01 unter ruhenden Bedingungen und nach 4-tägiger Stimulation mit PMA (15 nM) durchflusszytometrisch untersucht. CD40L wurde schon unter ruhenden Bedingungen auf geringem Niveau exprimiert. PMA bewirkte eine Differenzierung der Zellen. Eine Subpopulation der sonst in Suspension wachsenden Zellen heftete sich am Boden der Kulturgefäße an. Sowohl bei den suspendierten Zellen als auch bei den angehefteten Zellen kam es zeitabhängig zu einem Anstieg der CD40L Expression. Dieser Anstieg war bei den Zellen in Suspension bereits nach 24 h deutlich und erreichte nach 3 Tagen sein Maximum mit einer 4-fach höheren Expression. Bei den adhärenenten Zellen begann der Anstieg erst am 2. Tag, erreichte am 3. Tag allerdings die gleichen Werte wie bei den Zellen in Suspension. Abb. 16 stellt die Ergebnisse graphisch dar.



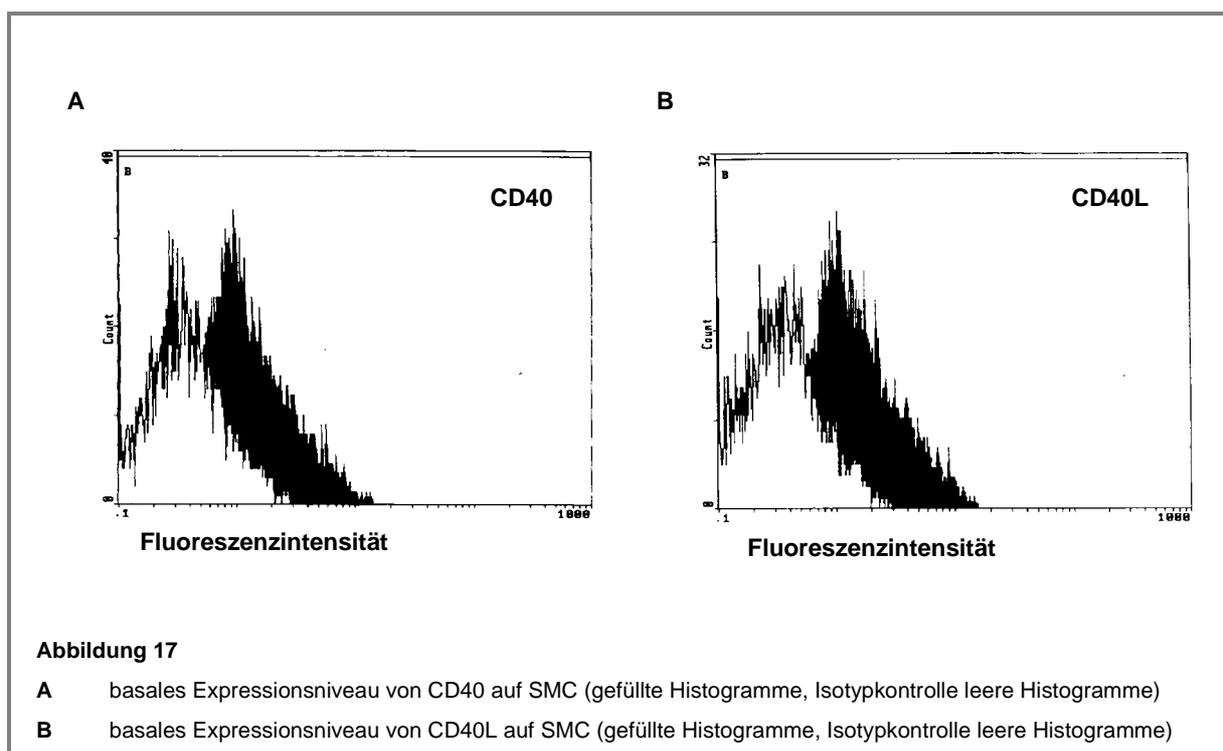
WIRKUNGEN VON CD40L AUF GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN

Von CD40L ist bekannt, dass er neben seiner Bedeutung in der Immunregulation eine Fülle von Prozessen beeinflusst, die potentiell an der Pathogenese bzw. der Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen beteiligt sein könnten. So wurde die Sekretion von Zytokinen, wie IL-6/-8, von EC oder die Freisetzung von MMPs und TF durch SMC beschrieben.

Ziel der folgenden Untersuchungen war daher, die Bedeutung von CD40L für die Aktivierung mitogener Signalwege, die Proliferation und die Migration von SMC zu ergründen.

3.6 CD40 und CD40L werden auf SMC koexprimiert

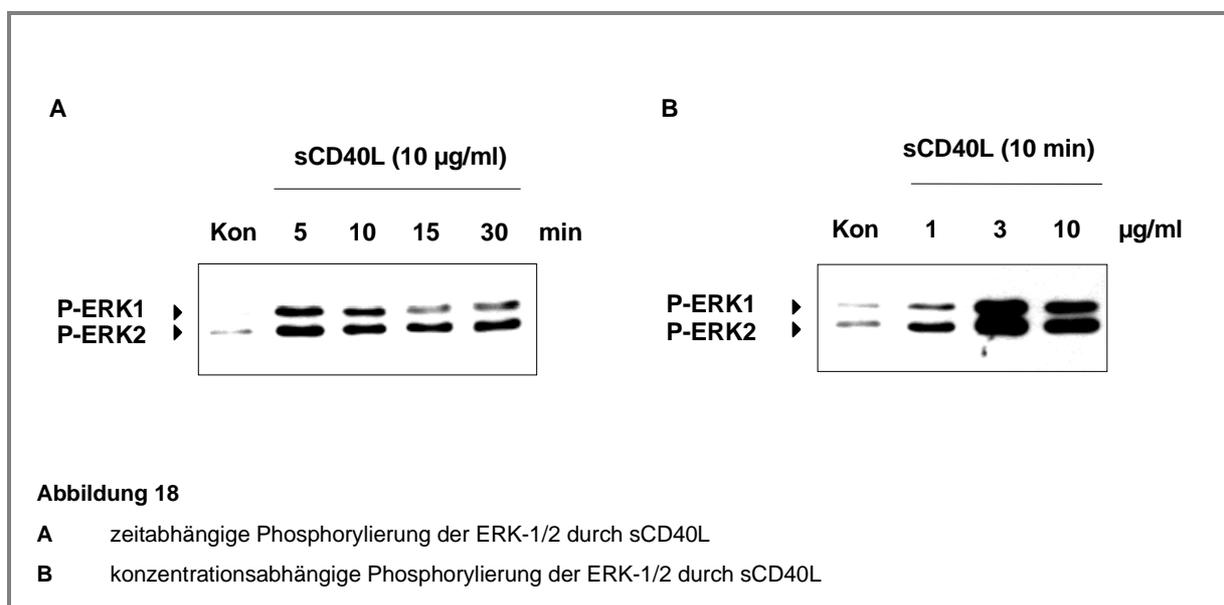
Zuerst wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß der CD40-Rezeptor auf der Oberfläche von SMC exprimiert wird und ob CD40L koexprimiert wird. Dazu wurden SMC nach mechanischer (nicht enzymatischer) Ablösung und Vereinzelung durchflusszytometrisch untersucht. Abb. 17 zeigt, dass CD40 und CD40L auf den verwendeten SMC koexprimiert wurden, wenngleich auch auf geringem Niveau. Die in der Literatur beschriebene Hochregulation von CD40 durch Inkubation mit IFN γ über 3 Tage (Lazaar et al., 1998) konnte hier nicht beobachtet werden.



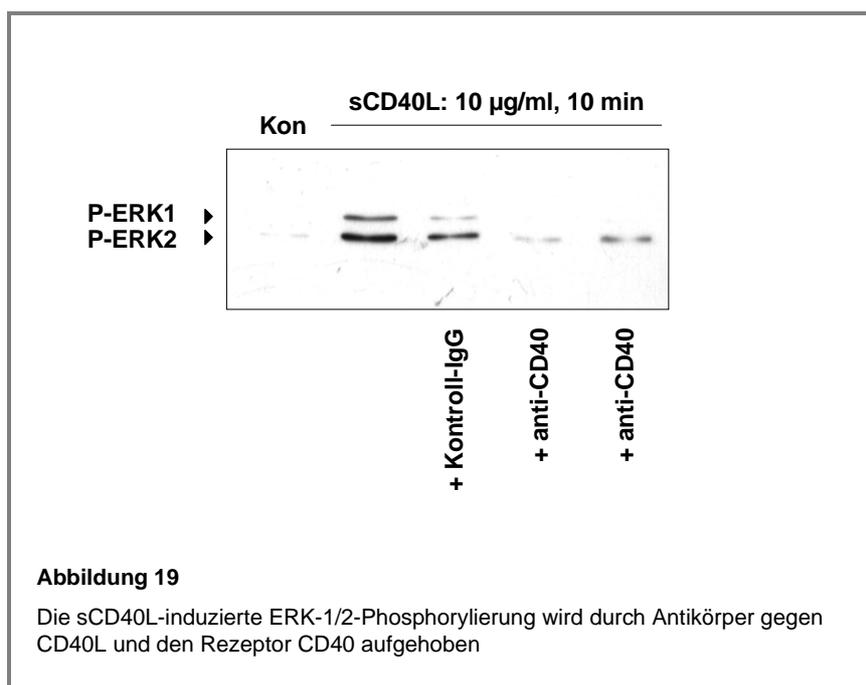
3.7 Wirkungen von sCD40L auf die intrazelluläre Signaltransduktion in SMC (Proteinkinasen)

3.7.1 sCD40L bewirkt die Phosphorylierung der ERK-1/2

Die Phosphorylierung der ERK-1/2 ist ein Signalweg, der eine mögliche Bedeutung bei proliferativen Prozessen hat. Um den Effekt auf diesen Signalweg zu untersuchen, wurden SMC mit rekombinantem humanen sCD40L stimuliert. Abb. 18 zeigt, dass sCD40L sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 führte.



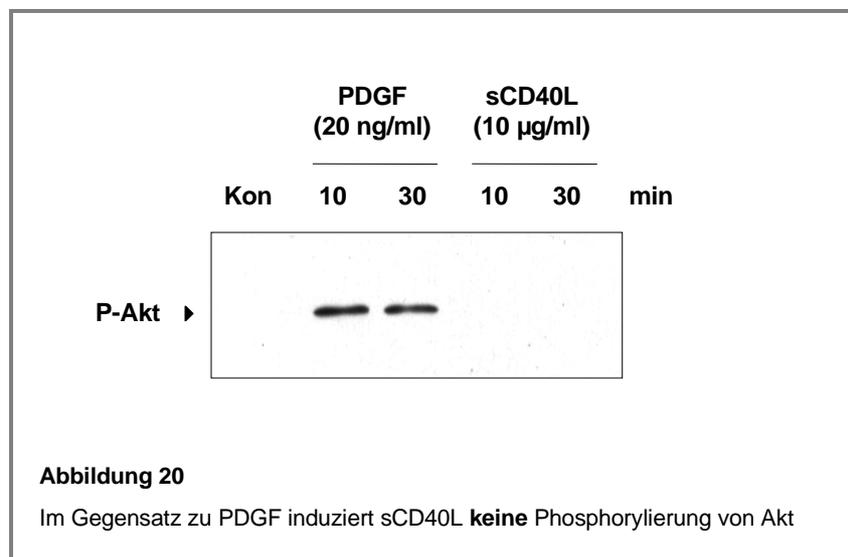
Nachfolgend wurde geprüft, ob die beobachtete Phosphorylierung spezifisch über die Interaktion von sCD40L mit seinem Rezeptor CD40 vermittelt wird. Dazu wurden SMC für 10 min mit 10 µg/ml sCD40L in An- bzw. Abwesenheit neutralisierender Antikörper gegen CD40, CD40L und eines unspezifischen Kontrollantikörpers inkubiert. Abb. 19 zeigt, dass die ERK-1/2-Phosphorylierung durch die spezifischen Antikörper, nicht aber durch den Kontrollantikörper aufgehoben wurde.



3.7.2 sCD40L bewirkt keine Phosphorylierung von Akt

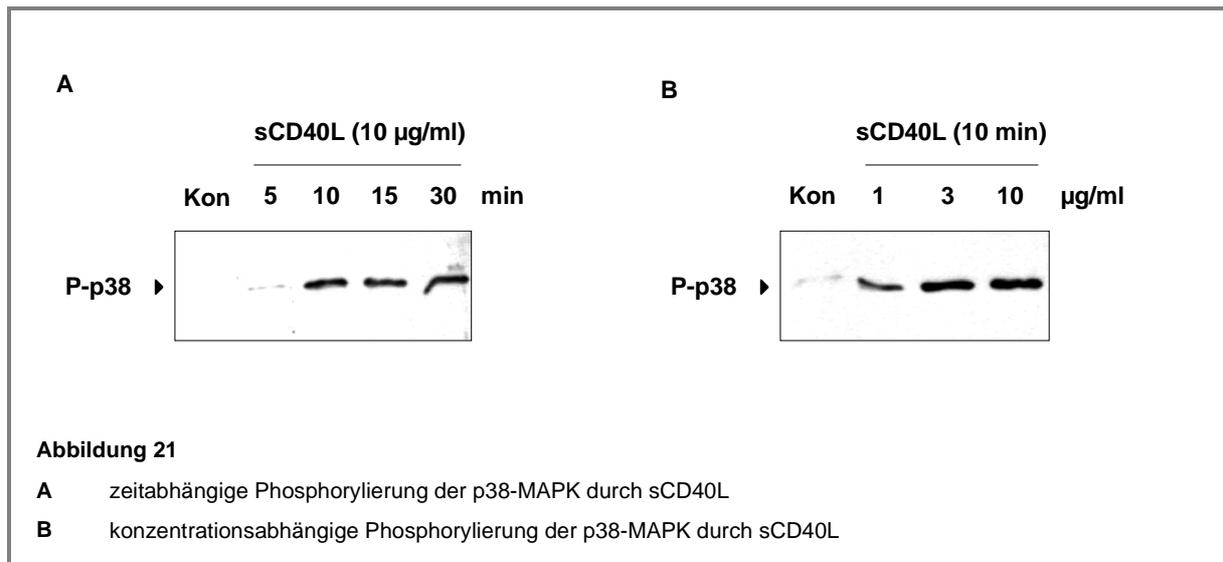
Ein weiterer wichtiger Signalweg für die Proliferation von SMC ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)-Weg. Die PI3-Kinase bewirkt nachgeschaltet die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt (Proteinkinase B).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sCD40L auch eine Phosphorylierung von Akt bewirkt. SMC wurden für 10 bzw. 30 min mit sCD40L (10 µg/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde PDGF (20 ng/ml) eingesetzt. In Abb. 20 ist zu sehen, dass sCD40L keine Phosphorylierung der Akt bewirkte, wohl aber PDGF.

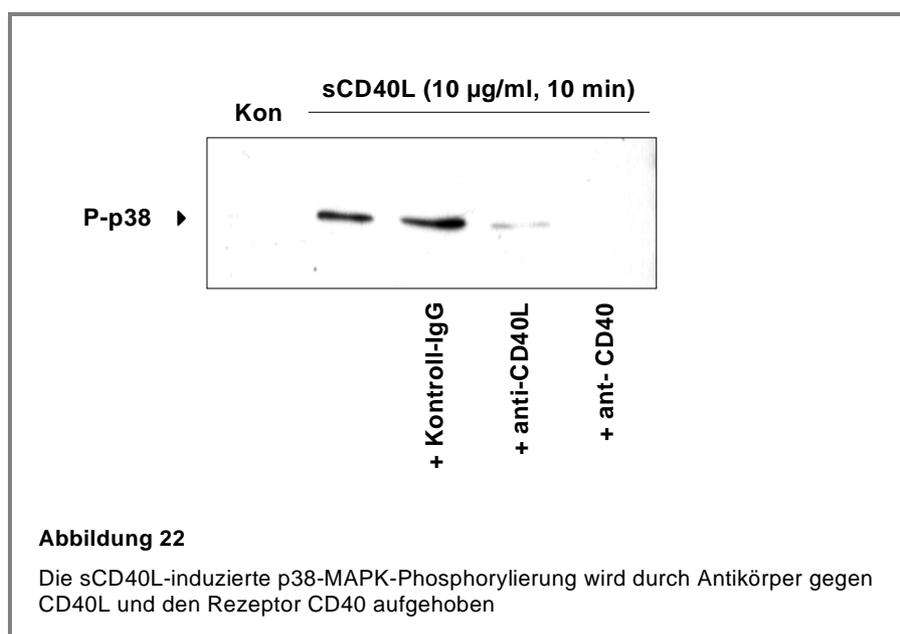


3.7.3 sCD40L induziert die Phosphorylierung der p38-MAPK

Ein intrazellulärer Signalweg, der mit Stress-induzierten, antiproliferativen Prozessen bzw. der Induktion der Migration in Zusammenhang gebracht wird, ist der p38-MAPK-Weg. Daher wurde untersucht, ob die Stimulation mit sCD40L auch zu einer Phosphorylierung der p38-MAPK in SMC führt. Dazu wurden SMC zeit- und konzentrationsabhängig mit sCD40L stimuliert (Abb. 21).



Die Phosphorylierung der p38-MAPK war mit Antikörpern gegen CD40 bzw. CD40L aufhebbar, was auf die Spezifität der Interaktion zwischen CD40 und CD40L hinweist (Abb. 22).



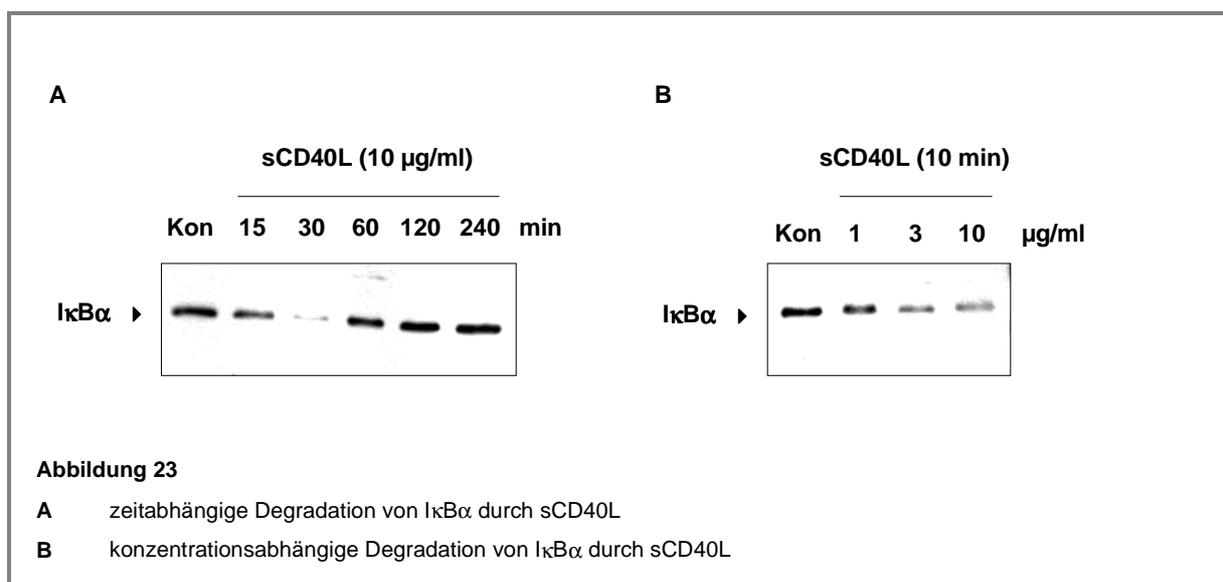
3.8 Wirkungen von sCD40L auf das NF κ B-System

Der Transkriptionsfaktor „nuclear factor- κ B“ (NF κ B) gehört zu einer großen Familie von Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Aktivierung im Zellkern die Transkription von Genen auslösen können. Für NF κ B konnte gezeigt werden, dass unter anderem auch Protoonkogene, wie *c-myc*, aktiviert werden, die an der Proliferation von Zellen beteiligt sind. Mit Inhibitoren von NF κ B, wie z.B. N-Acetyl-Cystein, konnte die Proliferation von kultivierten SMC unterbunden werden (Bellas et al., 1995). Die Untereinheiten von NF κ B, die die Transkription von Genen auslösen, wie z.B. p50 oder p65, liegen normalerweise inaktiv an inhibitorische Proteine gebunden im Zytoplasma vor. Bei Aktivierung von NF κ B wird das Inhibitorprotein I κ B α zunächst phosphoryliert, dann ubiquitiniert und degradiert. Die nun freien p50/p65 Untereinheiten können als Homo- bzw. Heterodimere in den Zellkern translozieren und Transkriptionsprozesse auslösen (Schreck et al., 1992).

Im Folgenden wurde die Beeinflussung des NF κ B-Systems durch sCD40L in kultivierten koronararteriellen SMC untersucht.

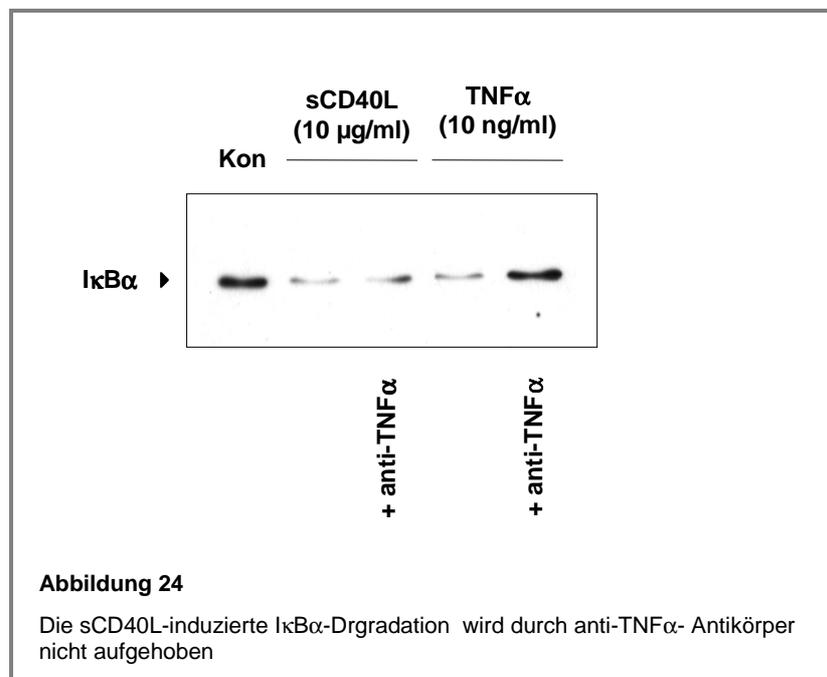
3.8.1 Degradation des Inhibitorproteins I κ B α

Die Stimulation von SMC mit sCD40L führte zeit- bzw. konzentrationsabhängig zur Degradation des Inhibitorproteins I κ B α (Abb. 23). Das Maximum des Effektes war nach 30 min und einer Konzentration von 10 μ g/ml zu beobachten.



In einem Mausmodell wurde beschrieben, dass die CD40L-induzierte ERK-1/2-Aktivierung die Freisetzung von gespeichertem TNF α bewirkte. Diese TNF α -Freisetzung konnte durch die Blockade des CD40-Rezeptors mit neutralisierenden Antikörpern wieder aufgehoben werden (Tan et al., 1999). Es ist ebenso bekannt, dass TNF α NF κ B aktiviert. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob die I κ B α -Degradation nach sCD40L-Stimulation in SMC ebenfalls indirekt über eine Freisetzung von TNF α bewirkt wird.

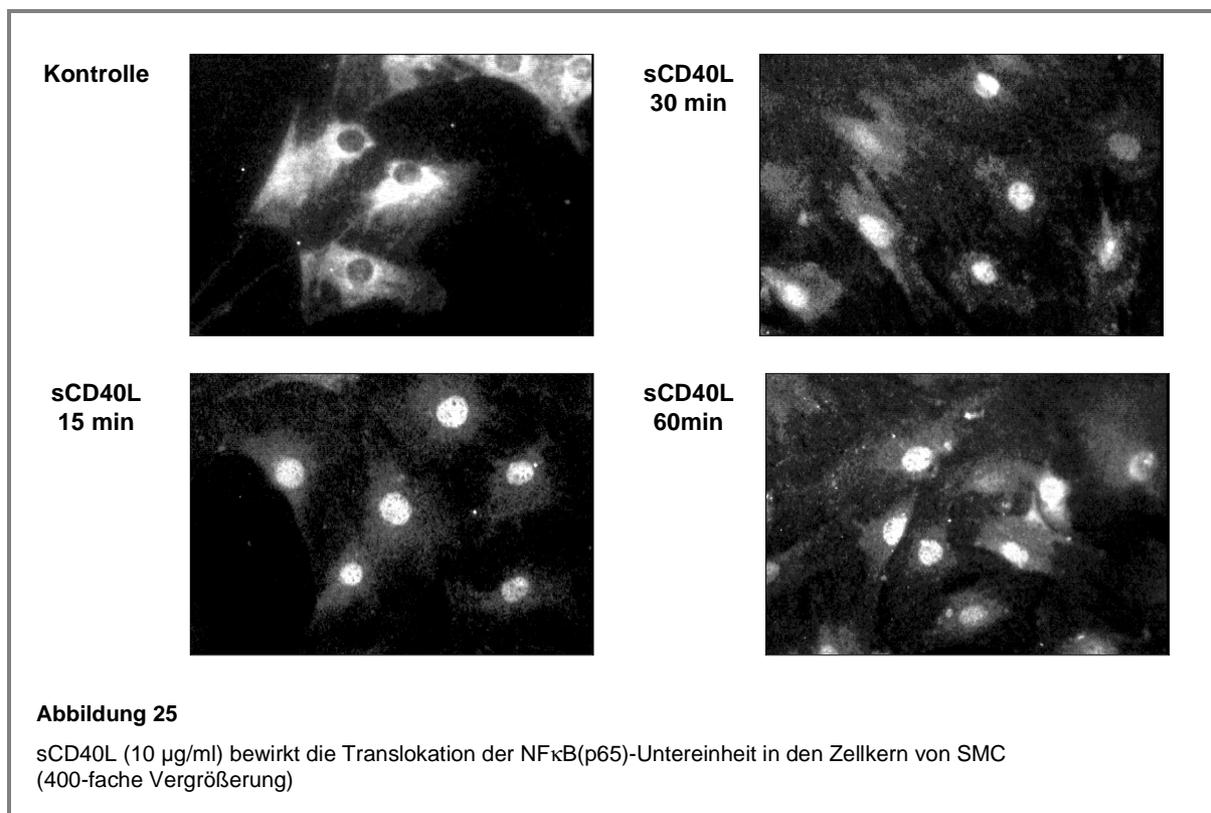
Dazu wurden SMC für 30 min mit sCD40L (10 μ g/ml) in An- bzw. Abwesenheit TNF α -neutralisierender Antikörper stimuliert. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden SMC unter denselben Bedingungen mit TNF α (10 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde der Effekt auf die Degradation von I κ B α im Western Blot untersucht (Abb. 24).



Der Effekt von sCD40L wird durch anti-TNF α -Antikörper nicht beeinflusst. Die TNF α -induzierte I κ B α -Degradation dagegen wird auf das Kontrollniveau zurückgeführt. Ergänzend wurde in den Stimulationsüberständen der Gehalt an TNF α mittels eines Enzym-Immunoassays gemessen. Hierbei konnte keine Freisetzung von TNF α unter Stimulation mit sCD40L nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die sCD40L-induzierte Degradation von I κ B α über eine direkte Interaktion von CD40L mit dem CD40-Rezeptor ohne eine Beteiligung von TNF α vermittelt wird.

3.8.2 Translokation von NF κ B in den Zellkern von SMC

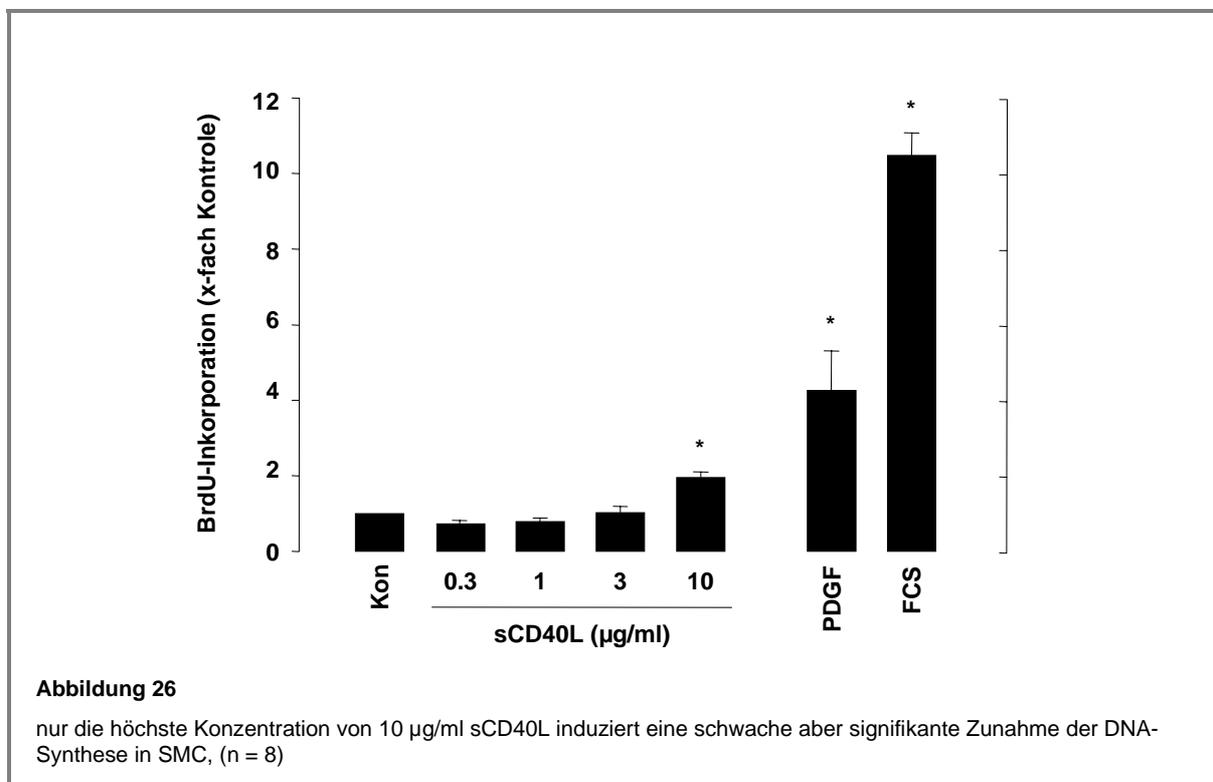
Als Folge der I κ B α -Degradation können die NF κ B-Untereinheiten in den Zellkern translozieren und Transkriptionsprozesse auslösen. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurden SMC mit sCD40L (10 μ g/ml) 15-60 min stimuliert und exemplarisch die Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Parallel zur Degradation von I κ B α erscheint die aktivierte p65-Untereinheit im Zellkern (Abb. 25).



3.9 Wirkung von CD40L auf die Proliferation von SMC

3.9.1 Stimulation der DNA-Synthese in SMC durch sCD40L

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sCD40L potentiell mitogene Signalwege aktiviert, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sCD40L auch zur Induktion der DNA-Synthese in SMC führt. Dazu wurden SMC für 24 h konzentrationsabhängig mit sCD40L stimuliert und die Zunahme der DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation bestimmt. In Abb. 26 ist dargestellt, dass sCD40L in einer Konzentration von 10 µg/ml zu einer schwachen aber signifikanten Zunahme der DNA-Synthese führte.

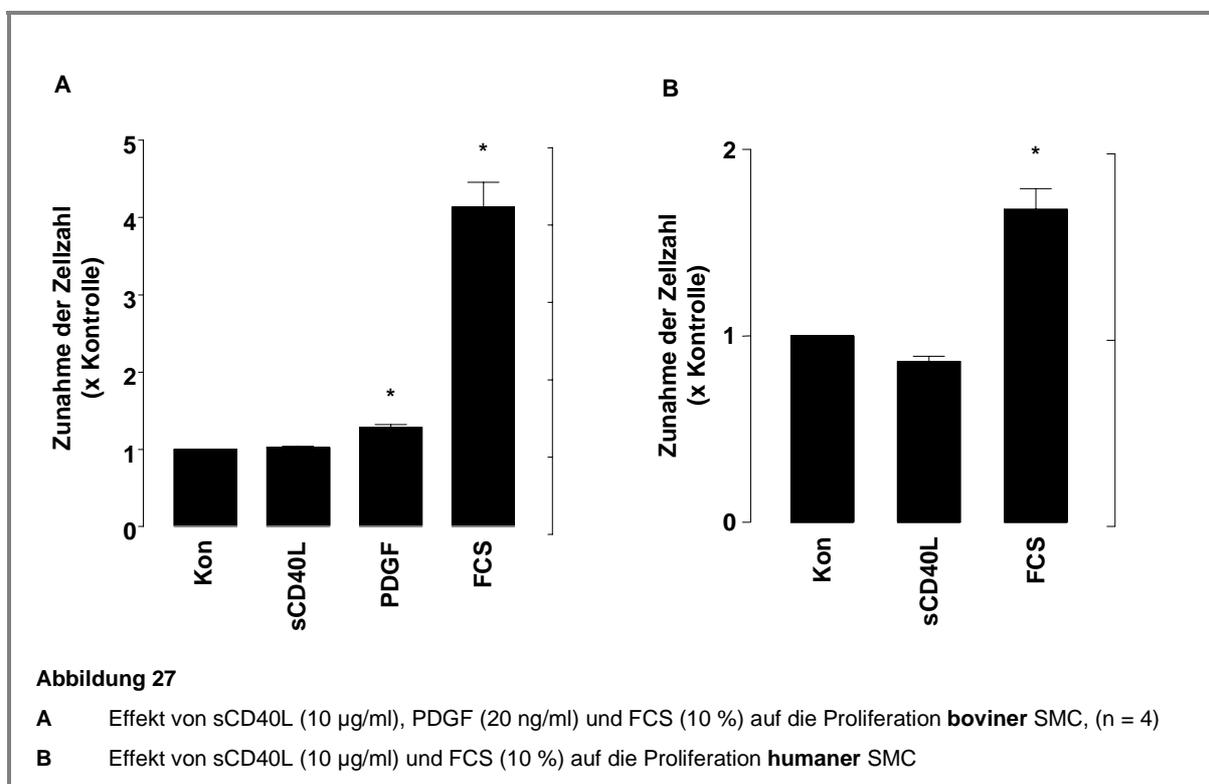


In verschiedenen Zellsystemen wurde eine Beteiligung der p38-MAPK an antimitogenen Prozessen beschrieben. Um zu testen, ob die sCD40L-induzierte DNA-Synthese möglicherweise stärker ausfällt, wenn die p38-MAPK ausgeschaltet ist, wurde der gleiche Versuchsansatz in Gegenwart des spezifischen p38-MAPK-Hemmstoffes SB202190 (10 µM) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch keine Steigerung der sCD40L (10 µg/ml)-induzierten DNA-Synthese beobachtet werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob sCD40L die mitogene Wirkung bekannter Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF oder Thrombin, potenziert. Dazu wurden SMC für 24 h mit PDGF (20 ng/ml) bzw. Thrombin (1 U/ml) in Anwesenheit von sCD40L (10 µg/ml) stimuliert und die Steigerung der DNA-Synthese gemessen. sCD40L war nicht in der Lage, die PDGF- bzw. Thrombin-induzierte DNA-Synthese zu steigern (n = 4, nicht gezeigt).

3.9.2 Keine Zunahme der Zellzahl von SMC durch Stimulation mit sCD40L

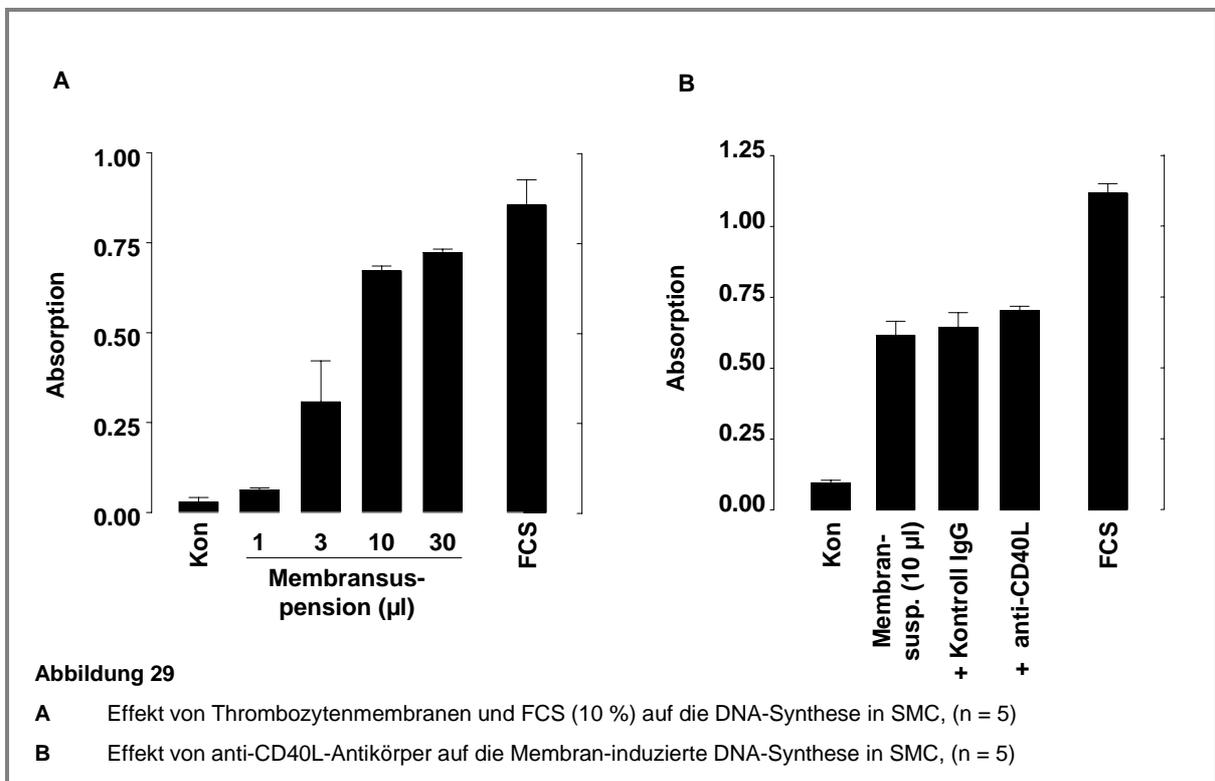
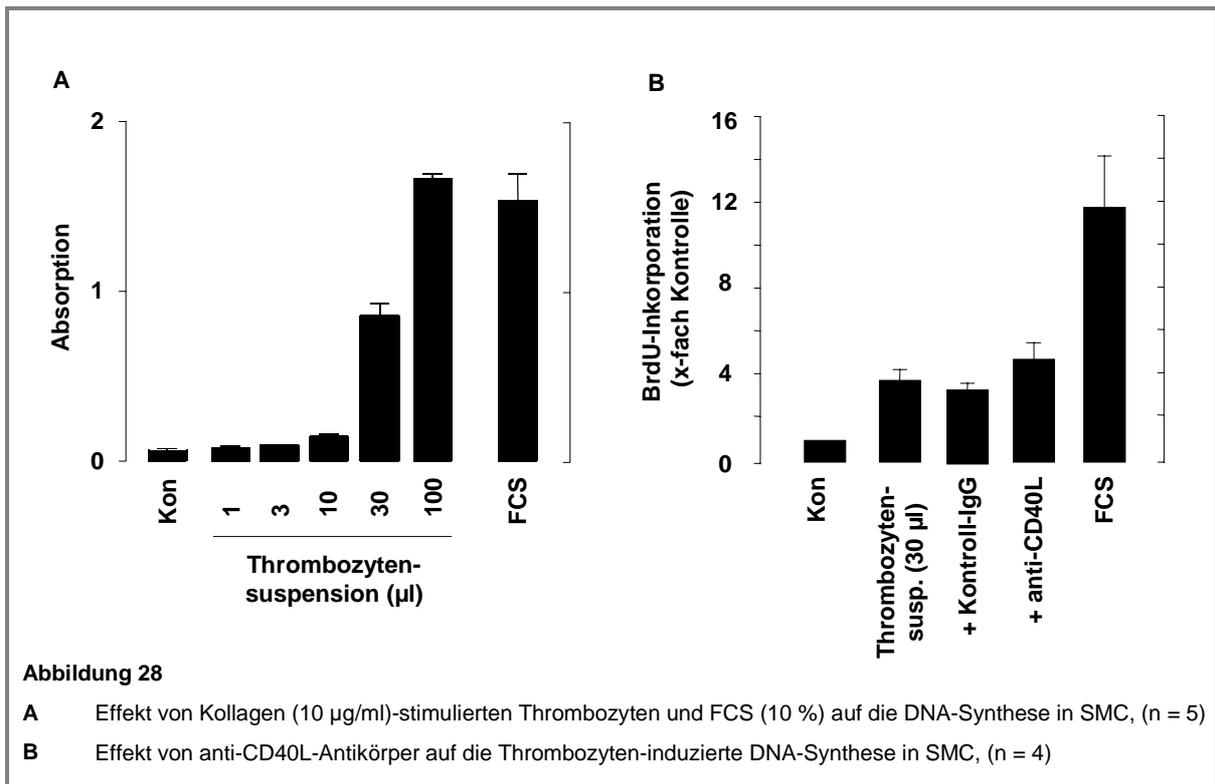
Die natürliche Folge der DNA-Synthese ist die sich anschließende Zunahme der Zellzahl. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden sowohl bovine SMC als auch humane SMC aus der Vena saphena für 96 h mit 10 µg/ml sCD40L stimuliert und die Zellzahl bestimmt. Als Positivkontrolle wurde FCS (10 %) und/oder PDGF (20 ng/ml) eingesetzt. Überraschenderweise konnte in beiden Zellsystemen keine Proliferation der Zellen unter Stimulation mit sCD40L beobachtet werden (Abb. 27). Die Teilungsgeschwindigkeit der SMC war in den untersuchten Zellsystemen durchaus unterschiedlich. So betrug die relative Zuwachsrate der Zellen im bovinen System unter Stimulation mit PDGF bzw. FCS 30 % bzw. 400 %, während sie im humanen System unter FCS-Stimulation nur 170 % betrug.



3.9.3 Wirkung von Membran-gebundenem CD40L auf die DNA-Synthese in SMC

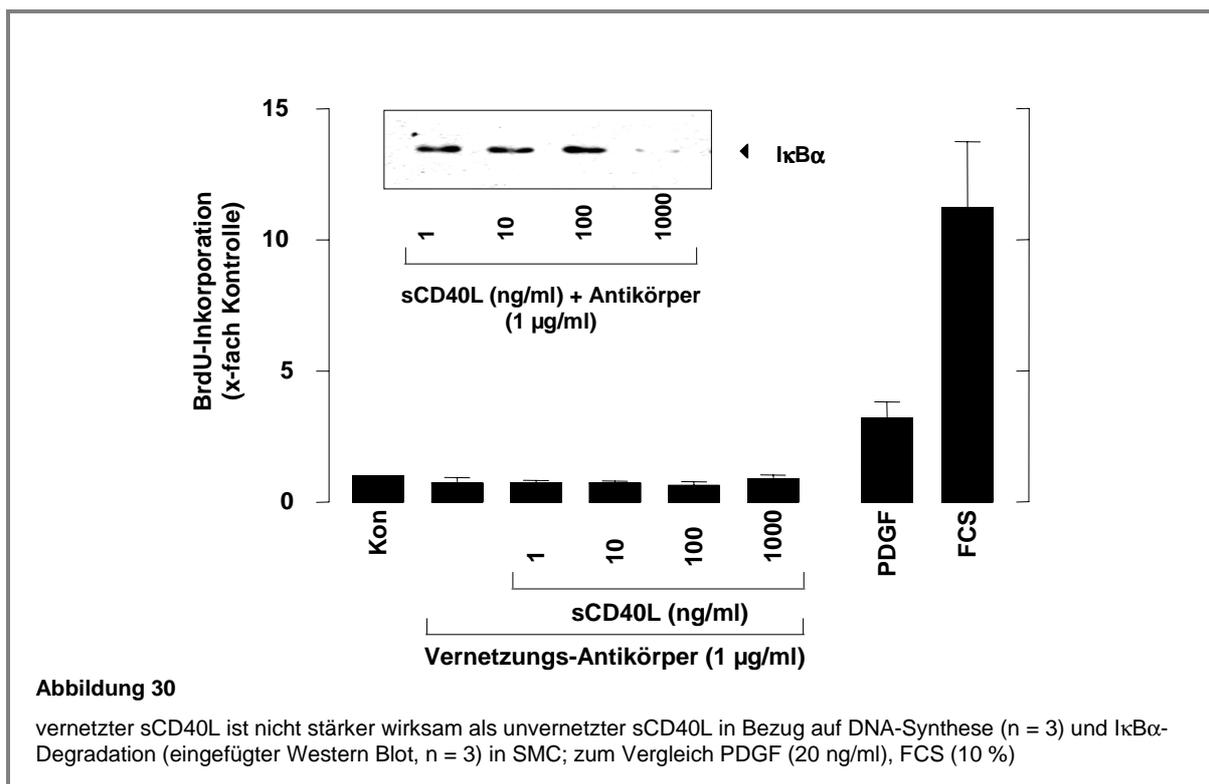
Ein möglicher Grund, warum sCD40L keine Proliferation von SMC bewirkt, könnte darin liegen, dass die sCD40L-induzierten Signalwege zu schwach sind. Für Fas-Ligand, ein anderes Mitglied TNF-verwandter Proteine, wurde beschrieben, dass dessen biologische Aktivität verlorenght, wenn die Membran-gebundene Form in die lösliche Form überführt wurde (Schneider et al., 1998). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zuerst wurden Plasmamembranen von zwei verschiedenen T-Zelllymphoblast-Zelllinien des menschlichen „Jurkat“-Lymphoms präpariert. Die Linie Jurkat D1.1 exprimiert konstitutiv CD40L auf ihrer Oberfläche, während die Linie J45.01 als Vergleich diente. Die Expressionsniveaus von CD40L wurden durchflusszytometrisch bestimmt und betragen für D1.1 > 80 % bzw. < 5 % positive Zellen für J45.01. Mit diesen Membranpräparationen wurden SMC in steigenden Konzentrationen stimuliert und die DNA-Synthese nach 24 h gemessen. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch keine Zunahme der DNA-Synthese gemessen.

In einem zweiten Ansatz wurden SMC mit gewaschenen Thrombozyten und Thrombozytenmembranpräparationen stimuliert. Dazu wurden gewaschene Thrombozyten in einer Dichte von 10.000/µl für 5 min mit Kollagen (10 µg/ml) stimuliert (vgl. Abb. 6). Anschließend wurden SMC mit steigenden Mengen an Thrombozyten und Thrombozytenmembranen für 24 h stimuliert und die Zunahme der DNA-Synthese in bekannter Weise gemessen. Zum Vergleich der mitogenen Potenz wurde Serum als Positivkontrolle mitgeführt. Sowohl Thrombozyten (Abb. 28 A) als auch Thrombozytenmembranen (Abb. 29 A) führten konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der DNA-Synthese. Dieser Effekt war jedoch nicht mit anti-CD40L-Antikörpern hemmbar (Abb. 28 B bzw. 29 B).



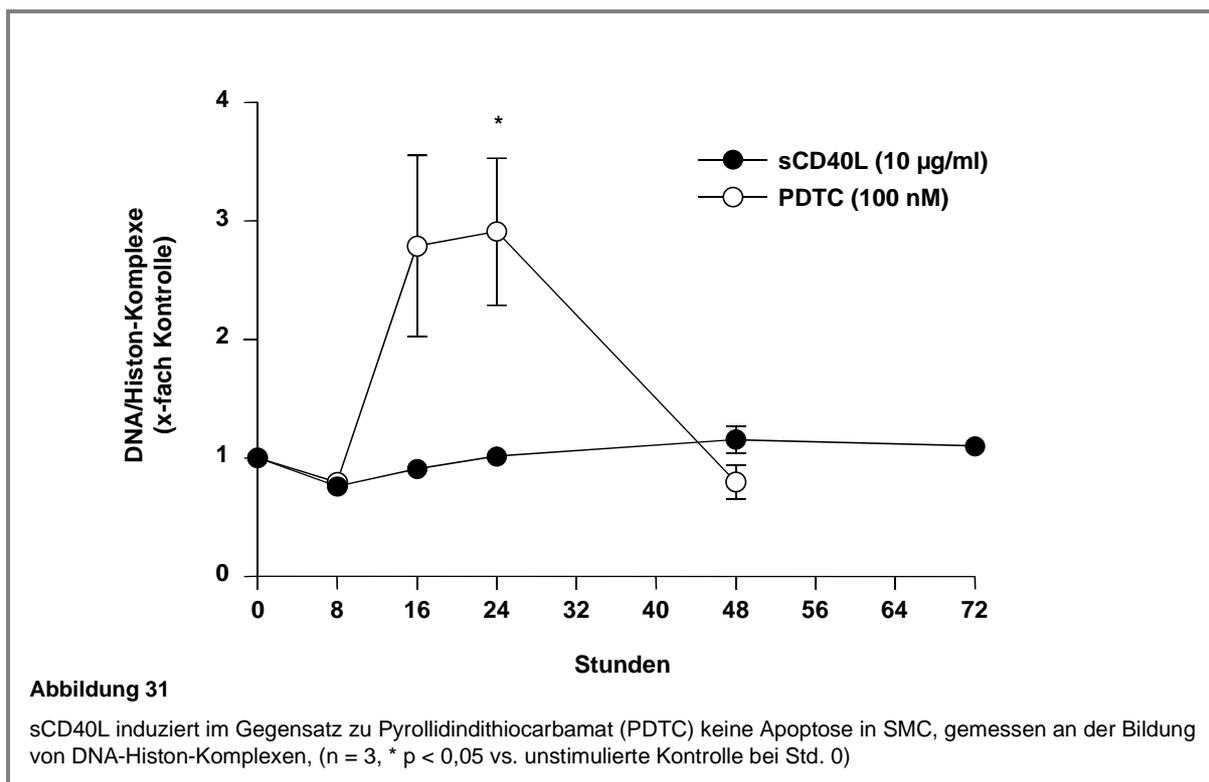
Ruhende Thrombozyten führten ebenfalls zu einer Zunahme der DNA-Synthese, jedoch erst bei der Höchstmenge von 100 μ l Thrombozytensuspension. Die Stärke der Stimulation war vergleichbar mit der von 10 μ l stimulierter Thrombozyten. Das Verhältnis von 10 μ l Thrombozytensuspension zu SMC betrug bei einer durchschnittlichen Dichte der SMC von 5000/Loch 20:1. Die Proteinkonzentration der verwendeten Thrombozytenmembranpräparation betrug 830 μ g/ml. Die Antikörper (10 μ g/ml) wurden 15 min mit dem jeweiligen Stimulus vorinkubiert. Die Schwankungen in der absoluten Stärke der Stimulation waren zwischen den Einzelexperimenten mitunter so groß, dass in den Abb. 28 A und 29 A/B ein repräsentatives Ergebnis, jeweils in Triplets durchgeführt, dargestellt ist.

Von löslichem Fas-Ligand ist bekannt, dass dieser seine biologische Aktivität zurückerlangt, wenn mehrere Moleküle vernetzt werden, da diese Vernetzung wieder Membran-gebundenen Fas-Ligand simuliert (Schneider et al., 1998). Untersuchungen zur Reifung von B-Lymphozyten weisen auf eine nahezu 1000-fach höhere Wirksamkeit von vernetztem sCD40L hin. Aus diesem Grund wurde die Hypothese überprüft, ob vernetzter CD40L möglicherweise stärkere Effekte auf die DNA-Synthese und nachgeschaltet auf die Proliferation von SMC hat. Dazu wurden SMC mit sCD40L (1-1000 ng/ml), dem N-terminal eine zusätzliche Aminosäuresequenz (sog. FLAG-Tag) angehängt ist, in Anwesenheit vernetzender anti-FLAG-Antikörper (1 µg/ml) vom IgM-Typ stimuliert. Parallel zur Messung der DNA-Synthese wurde der Effekt von vernetztem sCD40L auf die Degradation von IκBα untersucht (vgl. Abb. 23). In beiden Versuchsansätzen hatte das Vernetzen von sCD40L keine stärkere Wirksamkeit zur Folge (Abb. 30).



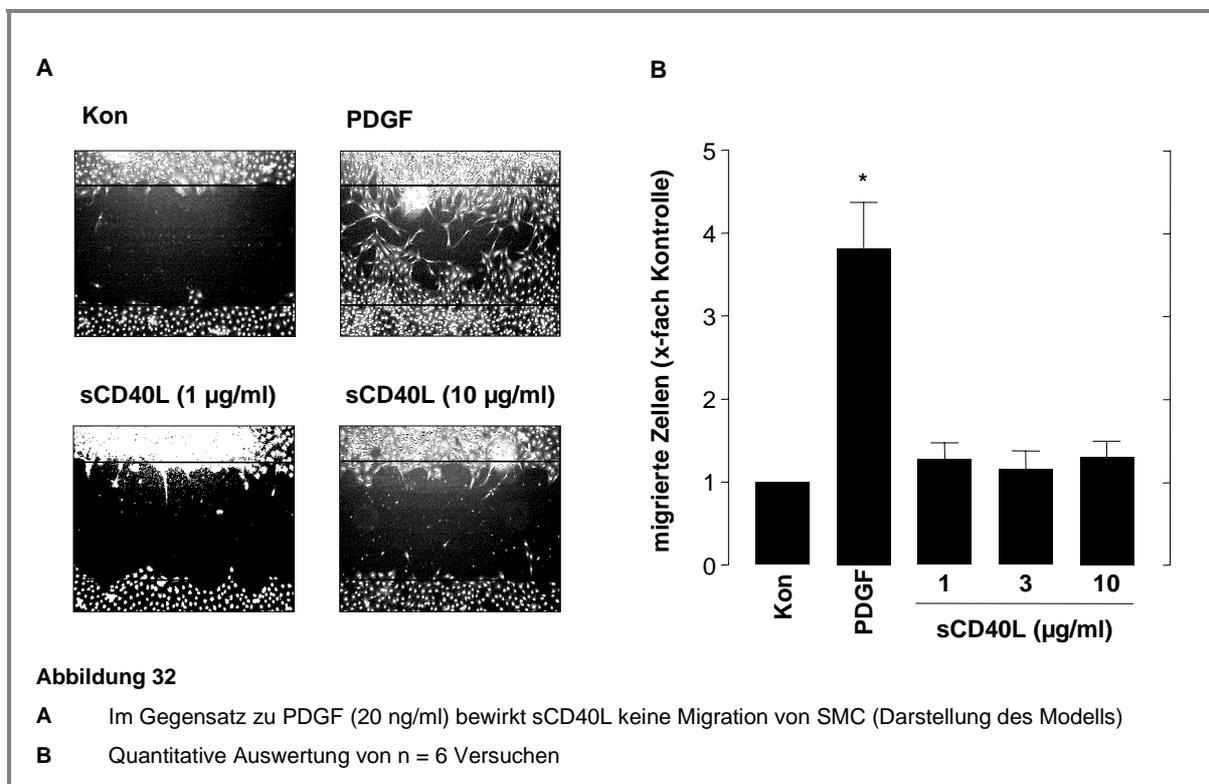
3.10 Wirkung von sCD40L auf die Apoptose von SMC

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass sCD40L die Phosphorylierung der p38-MAPK induziert (vgl. Abb. 21), deren Beteiligung an pro-apoptotischen Signalwegen in verschiedenen Zellsystemen gezeigt wurde. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Proliferation von SMC nach Stimulation mit sCD40L könnte die gleichzeitige Induktion von Apoptose sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden SMC bis zu 72 h mit sCD40L (10 µg/ml) bzw. Pyrollidindithiocarbamat (PDTC, 100 nM) als Positivkontrolle inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden als Marker für apoptotischen Zelluntergang DNA-Histon-Komplexe in den SMC gemessen. In sCD40L-behandelten Zellen konnten über die gesamte Beobachtungszeit keine DNA-Histon-Komplexe nachgewiesen werden, während in PDTC-behandelten Zellen eine 3-fache Steigerung nach 16-24 h gegenüber Kontrollzellen zu beobachten war, was für einen apoptotischen Untergang der SMC sprach (Abb. 31).



3.11 Effekt von sCD40L auf die Migration von SMC

Abschließend wurde die Wirkung von CD40L auf die Migration von SMC untersucht. In EC konnte eine Beteiligung der p38-MAPK an der Migration gezeigt werden (Rousseau et al., 1997). Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde in eine konfluente Schicht von SMC ein zellfreier Spalt definierter Breite erzeugt. Anschließend wurden die Zellen mit sCD40L (10 µg/ml) und PDGF (20 ng/ml) stimuliert und nach 72 h die migrierten Zellen ausgezählt. Wie in Abb. 32 zu sehen, interagiert sCD40L offenbar nicht mit der Migration von SMC, während PDGF diese deutlich stimuliert.



Zum gleichen Ergebnis kamen Untersuchungen mit vernetztem sCD40L. SMC wurden im gleichen Modell 72 h mit vernetztem sCD40L (1-1000 ng/ml mit anti-FLAG-IgM 1 µg/ml) bzw. PDGF (20 ng/ml) stimuliert, es konnte aber keine Induktion der Migration durch vernetzten sCD40L beobachtet werden.

4 DISKUSSION

Nachdem von Henn et al. (1998) zum ersten Mal die Expression von CD40L auf der Oberfläche von Thrombin-stimulierten Thrombozyten beschrieben wurde, sind keine weiteren wesentlich neue Daten zu CD40L in Thrombozyten veröffentlicht worden.

Daher beschäftigte sich der erste Teil dieser Arbeit mit der systematischen Untersuchung der subzellulären Lokalisation, der Regulation der Expression und der molekularen Identität von CD40L in Thrombozyten. Die Ergebnisse sollen in den folgenden Ausführungen diskutiert werden.

4.1 Expression und subzelluläre Lokalisation von CD40L in Thrombozyten

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass eine große Zahl Thrombozyten-aktivierender Substanzen, wie z.B. ADP, Thrombin, TRAP, Kollagen, das Thromboxanmimetikum U46619, Phorbol ester und Calciumionophor A23187, in der Lage sind, die Expression von CD40L auf der Oberfläche von Thrombozyten bewirken. Die quantitative Untersuchung der CD40L-Expression zeigte jedoch im Vergleich zu CD62P und CD63 ein relativ geringes Niveau. So stand der Zunahme der CD40L-Expression um den Faktor 5 nach Stimulation mit TRAP eine 14- bzw. 50-fach gesteigerte Expression von CD63 bzw. CD62P durch den gleichen Agonisten gegenüber.

Vergleicht man allerdings die Expression von CD40L und die der granulären Marker CD62P und CD63 in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulus, zeigt sich ein anderes Bild. Während TRAP die Expression aller drei Marker bewirkte, stellte Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml einen schwachen Agonisten in Bezug auf die Translokation der granulären Marker dar, induzierte aber schon in 10-fach geringerer Konzentration die Expression von CD40L. Selbst bei Verwendung der sehr hohen Konzentration von 50 µg/ml Kollagen kam es nur bei einer Subpopulation von Thrombozyten zu einer Expression der granulären Marker, wohingegen eine homogene Expression von CD40L nachweisbar war.

Eine Arbeit von Schwarz et al. (2000) zeigte ein vergleichbares Phänomen bei der Untersuchung der Oberflächenexpression von CD40L und CD62P unter Verwendung von Thrombin (0,5 U/ml), U46619 (2 µM) und ADP (30 µM) als Stimuli. Thrombin induzierte die Expression beider Marker. Betrachtet man allerdings die Expression von CD40L und CD62P nach Stimulation mit U46619 bzw. ADP, zeigte sich bei ersterem die rasche Expression von CD40L und eine verzögerte Expression von CD62P. ADP bewirkte eine vergleichbare Expression von CD40L wie U46619, aber keine Expression von CD62P.

Zur Erklärung dieser Beobachtungen wurde als Arbeitshypothese angenommen, dass CD40L nicht - wie von Gawaz (1999) angenommen, der CD40L lediglich in einer Tabelle zur Lokalisation der bekannten thrombozytären Mediatoren bei den α -Granula mit einem Fragezeichen aufführt, und von Henn et al. (1998) aus den Untersuchungen mit Gesamthrombozytenlysat vermutet - granulär lokalisiert ist, sondern in einem anderen subzellulären Kompartiment des Thrombozyten. Denkbare Strukturen könnten das Zytoplasma oder die Membransysteme, wie das offene kanalikuläre bzw. das dichte tubuläre System oder das endoplasmatische Retikulum, sein. Diese Unterschiede in der subzellulären Lokalisation könnten die unterschiedlichen Expressionsmuster von CD40L gegenüber den granulären Markern CD62P und CD63 nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten erklären.

Die folgenden Untersuchungen erbrachten in unterschiedlichen biochemischen Ansätzen Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie von sowohl nicht- als auch ausgebreiteten Thrombozyten zeigte - trotz ihrer limitierten Auflösung bei der Untersuchung solch kleiner Zellen - eine höchstwahrscheinlich zytoplasmatische Lokalisation von CD40L, während sich CD62P und CD63 erwartungsgemäß eindeutig granulär lokalisiert darstellten. Die anschließenden Western Blot Untersuchungen von Thrombozytensubfraktionen bestätigten die zytoplasmatische Lokalisation von CD40L. CD40L wurde ausschließlich im Zytoplasma detektiert, CD62P nur in den Granula. Das Zytoplasma als Lokalisationsort bietet mehrere Möglichkeiten der Verteilung von Proteinen. Einerseits können sie gelöst, andererseits an Strukturproteine oder Membranstrukturen (s. oben) assoziiert, vorliegen. Eine Assoziation an beispielsweise filamentöses Aktin war allerdings wenig wahrscheinlich, da sich das Anfärbemuster von CD40L deutlich von dem des Aktins unterschied. Die Assoziation an das Zyto- bzw. das Membranskelett der Thrombozyten war ebenfalls nur gering ausgeprägt. Durch die Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP konnte weder eine Zunahme der Assoziation an diese subzellulären Strukturen, noch eine Dissoziation beobachtet werden.

Interessanterweise bestand eine verblüffende Ähnlichkeit mit dem Anfärbemuster des vor kurzem entdeckten Aktin-assoziierten 2E4-Proteins Kaptin (Bearer und Abraham 1999), über dessen Funktion allerdings wenig bekannt ist.

Die Untersuchung der intrazellulären Signalwege, die in die Expression von CD40L, CD62P und CD63 involviert sind, zeigte überraschenderweise die Abhängigkeit aller drei Marker von denselben Signalwegen. Durch gezielte Inhibition einzelner Teilkomponenten der intrazellulären Signaltransduktion zeigte sich die Abhängigkeit der Expression von der Verfügbarkeit intrazellulären Calciums und der Proteinkinase C. Im Gegensatz dazu waren MAP-Kinasen (ERK-1/2, p38) bzw. extrazelluläres Calcium nicht beteiligt. Diese Daten zeigen, dass die TRAP-induzierte Expression zytoplasmatischer Proteine, wie CD40L und die thrombozytäre Sekretion, scheinbar über die gleichen Signalwege vermittelt werden kann. Die vorliegenden Daten werden von den Untersuchungen von Schwarz et al. (2000) mit U46619-stimulierten Thrombozyten gestützt, die ebenfalls die Unabhängigkeit der CD40L-Expression von den MAP-Kinasen ERK-1/2 und p38 zeigten. Des Weiteren zeigten sie die Hemmbarkeit der CD40L-Expression durch cAMP- bzw. cGMP-erhöhende Substanzen, wie Prostaglandin E₁ und Natriumnitroprussid.

Die Erkenntnisse zur Signaltransduktion der CD40L-Expression und der granulären Sekretion wurden durch die Befunde der Probandenstudie bestätigt und erweitert. Die einwöchige Clopidogrelgabe, bei der es zur vollständigen, irreversiblen Hemmung des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors der Thrombozyten durch den aktiven Metaboliten von Clopidogrel kommt (Savi et al., 2000), hatte die vollständige Hemmung der ADP-induzierten CD40L-, CD62P- und CD63-Expression zur Folge. Diese Daten sprechen für die Notwendigkeit der Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors bei der ADP-induzierten Expression von CD40L einerseits und der granulären Sekretion andererseits.

Henn et al. (1998) beschrieben die Beteiligung von Thrombozyten an entzündlichen CD40L-vermittelten Reaktionen der Gefäßwand. So bewirkten Thrombin-stimulierte Thrombozyten die Aufregulation der Oberflächenexpression von E-Selektin und den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Sekretion von IL-8 und MCP-1 in EC. Diese Effekte waren durch den anti-CD40L-Antikörper TRAP1 hemmbar. Der Stellenwert von Clopidogrel in der Antiplättchentherapie gewinnt durch diese Befunde insofern an Bedeutung, als die CD40L-vermittelten entzündlichen Prozesse, wie die Induktion der Expression von TF und der damit verbundenen Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität oder die erhöhte Aktivität von MMPs in der Gefäßwand infolge der gehemmten ADP-induzierten Oberflächenexpression von CD40L, reduziert bzw. ausgeschaltet werden könnten.

4.2 Molekulare Identität von thrombozytärem CD40L

Die Klärung der molekularen Identität von CD40L in Thrombozyten fand vor dem Hintergrund statt, dass von Graf et al. (1995) in T4⁺-Lymphozyten verschiedene Formen von CD40L beschrieben wurden. Die löslichen Formen wurden allerdings nicht durch Proteolyse von Membran-ständigem CD40L, sondern nach posttranslationeller Modifikation der neu synthetisierten nativen 33 kDa Form freigesetzt. Henn et al. (1998) beschrieben in Thrombozyten nur die membranständigen Formen (33, 28 kDa), deren Sequenz mit der aus Lymphozyten identisch war. Weiterhin postulierten sie die Freisetzung von CD40L nach gleichzeitiger Stimulation mit ADP und Adrenalin, ohne dies jedoch experimentell zu bestätigen. Da Thrombozyten als kernlose Zellen Proteine nicht in signifikanten Mengen neu zu synthetisieren vermögen, müssten sie hierzu mit modifizierten Formen seitens ihrer Vorläuferzellen, der Megakaryozyten, ausgestattet sein.

Ein weiterer Hinweis für das mögliche Vorhandensein modifizierter Formen von CD40L in Thrombozyten war die Beobachtung, dass bei Patienten mit instabiler Angina pectoris im Gegensatz zu solchen mit stabiler Angina pectoris bzw. Gesunden erhöhte Spiegel an löslichem CD40L im Serum gemessen wurden (Aukrust et al., 1999). So standen den Spiegeln der Gesunden (≈ 1 ng/ml) bei Patienten mit instabiler Angina pectoris solche von ($\approx 3,5$ ng/ml) gegenüber, wobei Werte bis zu 12 ng/ml gemessen wurden. Anzumerken ist allerdings, dass diese Arbeit bis dato die einzige Untersuchung darstellt, die Spiegel von sCD40L in vivo, sei es bei Gesunden oder Patienten mit entzündlichen Gefäßerkrankungen im Serum quantifiziert hat. Gleichzeitig beschrieben die Autoren die Freisetzung großer Mengen an löslichem CD40L in TRAP-stimuliertem plättchenreichen Plasma bei Gesunden und Patienten mit stabiler Angina pectoris, während diese bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris deutlich geringer war. Sie folgerten aus ihren Daten, dass die Thrombozyten die Quelle des löslichen CD40L bei diesen Patienten sei.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen CD40L in beiden Versuchsansätzen, d.h. im direkten Western Blot und nach vorangegangener Immunopräzipitation, nur im Zellpellet als die native, 33 kDa schwere Form. Ebenso tritt nach der TRAP-induzierten Aktivierung der Thrombozyten, im hier untersuchten Zeitfenster von 30 min keine proteolytische Freisetzung löslicher Formen aus Membran-gebundenem CD40L auf. Die Detektionsgrenze für sCD40L betrug 3 ng im direkten Western Blot und 30 ng bei der Immunopräzipitation. Die Methoden waren damit sensitiv genug, um die Mengen an sCD40L nachzuweisen, die Aukrust und Kollegen in Thrombozytenpellets mit $14\text{-}24$ ng/ 10^8 Zellen bzw. in Überständen TRAP-stimulierter Thrombozyten mit $8\text{-}18$ ng/ 10^8 Zellen bestimmt hatten. Eine mögliche Ursache

für die deutlichen Differenzen in den Daten könnte darin bestehen, dass der ELISA, den Aukrust für die Quantifizierung von sCD40L verwendete, seitens des Herstellers wegen nicht validierbarer Messergebnisse als ungeeignet für Plasmaproben ausgewiesen ist.

In einer jüngst von Henn et al. (2001) erschienenen Arbeit wurde die Freisetzung einer 18 kDa schweren löslichen Form von CD40L, gemessen mit einem selbst entwickelten ELISA, nach ein- bis mehrstündiger Stimulation von Thrombozyten mit Kollagen (10 µg/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) gezeigt. Die Kombination von ADP und Adrenalin (je 10 µM) führte auch zu einer Freisetzung von sCD40L, die aber nicht bei jeder untersuchten Probe vorhanden war. Als Mechanismus wird die proteolytische Abspaltung der Membran-gebundenen Form durch den koexprimierten CD40-Rezeptor gezeigt. Die Autoren schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass dieser Mechanismus die zeitliche Limitierung der Wirkungen von Membran-gebundenem CD40L in EC und Makrophagen bewirkt, da sie mit sCD40L keine Induktion inflammatorischer Reaktionen, wie die Expression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, in eben diesen Zelltypen beobachten konnten. Diese Schlussfolgerung steht aber im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die sowohl mit sCD40L als auch mit Membran-gebundenem CD40L zu vergleichbaren Ergebnissen kamen (vgl. 1.4). Prinzipiell ist diese Art der Inaktivierung der CD40L-Wirkung für die zeitliche Limitierung der T-Helferzellwirkung schon gezeigt worden. In diesem Fall bewirkt der CD40-Rezeptor des B-Lymphozyten nach Ligation durch den Liganden der T-Zelle dessen proteolytische Abspaltung und Internalisierung (Yellin et al., 1994).

Zusammenfassend lassen die Daten der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass Thrombozyten über keine der bekannten modifizierten Formen von CD40L in gespeicherter Form verfügen, die sie unmittelbar auf den Aktivierungsreiz freisetzen könnten. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Stimulationszeiten stehen die Daten dieser Arbeit auch nicht im Gegensatz zu den aktuellen Daten von Henn, die die Bildung löslicher Formen von CD40L nach Stunden untersuchten.

4.3 CD40L-Expression während der Megakaryozytenreifung

Zur Untersuchung der CD40L-Expression während der Megakaryozytenreifung wurde die immortalisierte Megakaryoblastenlinie MEG-01 verwendet. In diesen Zellen wurde die Differenzierung zu adhärennten Megakaryozyten durch den Phorbolester PMA beschrieben. Weiterhin bewirkte PMA die Aufregulation verschiedener Proteine, u.a. des Glykoprotein-IIb/IIIa und der Cyclooxygenase-1 (Mroske et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auch die zeitabhängige Aufregulation von CD40L in diesen Zellen. Unterschiedlich war jedoch der Verlauf bei den suspendierten und den adhärennten Zellen. Die Aufregulation erfolgte auf den suspendierten Zellen schneller, erreichte nach dreitägiger Stimulation aber vergleichbar hohe Niveaus in beiden Zelltypen.

Diese Daten können dahingehend interpretiert werden, dass die CD40L-Expression in einer frühen Phase der Differenzierung erfolgt und die Reifung zu adhärennten Zellen in einem späteren Stadium stattfindet.

Bei der Pathogenese bzw. der Progression der Atherosklerose spielt die Proliferation und die Migration von SMC eine wichtige Rolle. In Arbeiten von Mach et al. (1997, 1998) wurde gezeigt, dass sowohl der CD40-Rezeptor als auch der Ligand auf Zellen atheromatösen Gewebes, wie EC, SMC und Macrophagen, exprimiert wird. Aus diesen Ergebnissen wurde eine ursächliche Beteiligung dieses Ligand/Rezeptor-Paares an der Progression der Erkrankung abgeleitet. Über die direkten Wirkungen von CD40L auf die Proliferation und Migration von vaskulären SMC ist bis heute allerdings nur sehr wenig bekannt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von löslichem CD40L auf die Aktivierung mitogener Signalwege in SMC und der Effekt von löslichem und Membran-gebundenen CD40L auf die Proliferation und Migration von SMC untersucht.

4.4 Effekte von sCD40L auf die intrazelluläre Signaltransduktion in SMC

Im hier untersuchten Zellsystem bewirkte sCD40L konzentrations- und zeitabhängig die Aktivierung einer Reihe von intrazellulären Signalkaskaden, die in Zusammenhang mit z.T. gegensätzlichen Effekten gebracht werden. Einerseits wurde die Aktivierung der ERK-1/2 beobachtet, die in Zusammenhang mit proliferativen Prozessen gebracht wird (Force und Bonventre, 1998). Andererseits wurde die Aktivierung der p38-MAPK beobachtet, die eher mit einer zellulären Stressantwort assoziiert wird (Bogoyevitch, 2000). Als zelluläre Reaktionen der p38-Phosphorylierung wurden antiproliferative, pro-apoptotische Prozesse (Kyriakis und Avruch, 2001) aber auch die Migration von EC beschrieben (Rousseau et al., 1997). Im Gegensatz dazu induzierte sCD40L jedoch nicht die Aktivierung des PI3-Kinase Weges, da keine Phosphorylierung der Akt gemessen werden konnte.

Die Spezifität der sCD40L-Effekte wurde mit Hilfe neutralisierender Antikörper, sowohl gegen den CD40-Rezeptor als auch gegen den Liganden selbst, überprüft. Unter diesen Bedingungen konnte die Phosphorylierung der ERK-1/2 und der p38-MAPK nicht mehr nachgewiesen werden.

Des weiteren bewirkte sCD40L die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, gemessen an der Degradation des inhibitorischen Proteins IκBα und der Translokation der NFκB(p65)-Untereinheit in den Zellkern von SMC. NFκB ist ein wichtiger Mediator der Proliferation von SMC. So konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Expression von NFκB eine essentielle Voraussetzung für die Proliferation boviner SMC ist (Bellas et al., 1995).

In humanen SMC aus der Trachea konnte die sCD40L-induzierte NF κ B-Aktivierung mit nachfolgender Sekretion von IL-6 nur nach vorgeschalteter Erhöhung des Expressionsniveaus des CD40-Rezeptors mittels 72-stündiger Vorinkubation der Zellen mit IFN γ beobachtet werden (Lazaar et al., 1998). Ähnliche Befunde wurden von Sempowski et al. (1997) in humanen Lungenfibroblasten beschrieben. Im vorliegenden System konnten die Effekte von sCD40L auf die Signaltransduktion, ohne vorherige Behandlung mit Zytokinen, beobachtet werden. Dieser Sachverhalt kann über die basale Expression des CD40-Rezeptors auf der Oberfläche der verwendeten bovinen SMC erklärt werden, welche mittels Durchflusszytometrie detektiert wurde. Erstaunlicherweise konnte diese basale Expressionsrate von CD40 weder durch die Behandlung über unterschiedliche Zeiträume mit IFN γ oder TNF α noch durch die Kombination beider Zytokine gesteigert werden.

In einem Mausmodell mit Neurogliazellen wurde die Freisetzung von gespeichertem TNF α über einen ERK-1/2-abhängigen Mechanismus durch sCD40L gezeigt (Tan et al., 1999). Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob die I κ B α -Degradation ein indirekter Effekt von sCD40L ist, der durch eine auto bzw. parakrine Wirkung von freigesetztem TNF α zustandekommt. Ein solcher „Schleifenmechanismus“ erwies sich aber als unwahrscheinlich, da die I κ B α -Degradation unter Stimulation mit sCD40L in Anwesenheit neutralisierender anti-TNF α -Antikörper nicht aufgehoben wurde. Ergänzende Messungen von TNF α in den Stimulationsüberständen der Zellen mit einem Enzymimmunoassay ergaben auch keine Hinweise auf eine TNF α -Freisetzung.

Aus diesen Daten wird geschlossen, dass die Aktivierung des NF κ B-Systems über eine direkte Interaktion von CD40L mit seinem Rezeptor CD40 ohne eine Beteiligung von TNF α zustandekommt.

4.5 Wirkungen von CD40L auf die DNA-Synthese und Proliferation von SMC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sCD40L mitogene Signalwege aktiviert, wurde die Wirkung auf die DNA-Synthese untersucht. Die konzentrationsabhängige Stimulation von SMC mit sCD40L führte bei 10 µg/ml zu einer schwachen, aber statistisch signifikanten Stimulation der DNA-Synthese. Eine nachgeschaltete Proliferation der SMC blieb unter dieser Konzentration von sCD40L über einen Messzeitraum von 96 h allerdings aus. Ebenfalls konnte die mitogene Wirkung von klassischen Wachstumsfaktoren, wie PDGF oder Thrombin, nicht durch die gleichzeitige Stimulation mit sCD40L gesteigert werden.

Für die fehlende Proliferation von SMC, trotz stattfindender DNA-Synthese, können mehrere Faktoren verantwortlich sein:

1. Einerseits konnte gezeigt werden, dass sCD40L den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. Andererseits wurde von Bretschneider et al. (1997) im gleichen Zellsystem für TRAP gezeigt, dass die Aktivierung von NFκB zwar notwendig ist, aber allein nicht ausreicht, um die Proliferation von SMC zu bewirken. Unter diesem Gesichtspunkt wäre denkbar, dass zusätzlich zu der CD40L-induzierten Stimulation im Sinne einer Initiation weitere, bislang unbekannte Faktoren, bei Kostimulation die Proliferation von SMC auslösen könnten.
2. Die sCD40L-induzierte Phosphorylierung der p38-MAPK könnte in die Inhibition mitogener Prozesse bzw. in die Auslösung von Apoptose in SMC involviert sein (Kyriakis und Avruch, 2001). Die Hemmung der p38-MAPK mit dem spezifischen Inhibitor SB202190 führte jedoch nicht zu einer Steigerung der DNA-Synthese in SMC, wenn diese mit sCD40L stimuliert wurden. Die Beteiligung des CD40/CD40L Rezeptor/Ligand-Paares an apoptotischen Prozessen wird aufgrund der verwirrenden Datenlage aus den Untersuchungen mit Zellen bzw. Zelllinien unterschiedlicher Gewebe sehr kontrovers diskutiert (Schönbeck und Libby, 2001). In einer Fibroblasten-Zelllinie verhinderte die Ligation von CD40 den TNFα-induzierten apoptotischen Zelluntergang (Hess et al., 1998). In dendritischen Zellen bewirkte die CD40-Ligation den Schutz vor FasL-induzierter Apoptose (Bjorck et al., 1997). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen in neuronalen Zellen (Ruan et al., 1997) und kultivierten Hepatozyten (Afford et al., 1999), in denen CD40L Apoptose induzierte.
Im vorliegenden Zellsystem konnten keine Effekte von sCD40L auf die Induktion der Apoptose beobachtet werden.

3. Ein weiterer wichtiger Befund, im Hinblick auf die fehlende Proliferation der SMC durch sCD40L besteht darin, dass der PI3-Kinase/Akt-Signalweg durch sCD40L nicht aktiviert wird. Die Akt spielt eine ursächliche Rolle beim Zellwachstum, bei proliferativen Prozessen sowie beim Überleben und der Differenzierung von Zellen (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass für die Proliferation von Fibroblasten zwei voneinander unabhängige Phasen in der Aktivierung der Signaltransduktion notwendig sind. Der erste Schritt involviert die ERK-1/2-Kaskade und führt die Zellen aus der G0- hin zur S-Phase des Zellzyklus. Der zweite Schritt, der entscheidend für den Übergang aus der S- in die M-Phase des Zellzyklus ist, und in der Proliferation der Zellen mündet, benötigt die Aktivierung des PI3-Kinase-Weges (Jones und Kazlauskas, 2001).
4. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Signalstärke der sCD40L-induzierten Wirkungen zu schwach ist. FasL, ein anderer Vertreter TNF-verwandter Proteine, bewirkt in vielen Zellsystemen über seinen Rezeptor Fas (CD95) den apoptotischen Zelluntergang (Nagata, 1999). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die biologische Aktivität von Membran-gebundenem FasL nahezu vollständig verlorengelht, wenn es zur proteolytischen Umwandlung in die lösliche Form (sFasL) kommt. Wurde sFasL jedoch mit IgM-Antikörpern vernetzt, konnte die biologische Aktivität wiederhergestellt werden (Schneider et al., 1998).

Verwendet man rekombinanten sCD40L, dem ein Signalpeptid, ein sog. FLAG-Tag angehängt ist, und vernetzt diesen mittels anti-FLAG-IgM-Antikörper, so ist dessen biologische Aktivität im Falle der Untersuchung der B-Lymphozyten Reifung um den Faktor 1000 größer. Untersucht man aber die mitogene Potenz von vernetztem sCD40L in SMC, so bringt die Vernetzung keine Steigerung der Signalstärke mit sich.

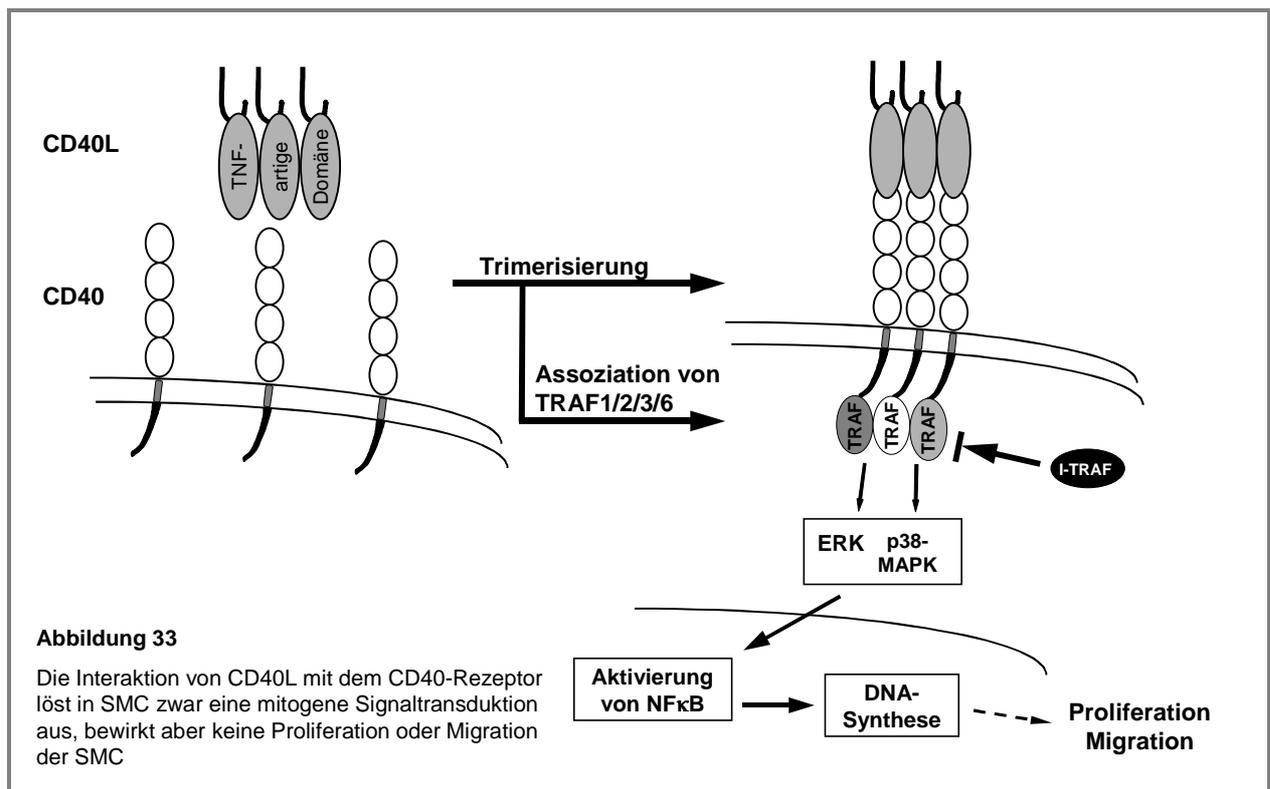
Die Untersuchungen mit Membran-gebundenem CD40L erbrachten auch keine Hinweise für eine höhere Wirksamkeit in Bezug auf mitogene Signale. Membranpräparationen von zwei verschiedenen T-Lymphozyten-Linien, von denen eine konstitutiv CD40L auf ihrer Oberfläche exprimiert, verursachten in SMC keine stärkere DNA-Synthese als sCD40L. Mit Kollagen-stimulierten Thrombozyten bzw. Membranpräparationen von Thrombozyten ließ sich eine sehr starke DNA-Synthese in SMC induzieren. Diese war allerdings nicht mit anti-CD40L-Antikörpern beeinflussbar. Diese Befunde sprechen gegen die Hypothese der zu geringeren Signalstärke des löslichen Fragmentes.

4.6 Wirkung von CD40L auf die Migration von SMC

Zum Abschluss dieser Arbeit wurde der Effekt von sCD40L und vernetztem sCD40L auf die Migration von SMC untersucht, einem weiteren wichtigen Ereignis bei der Progression der Atherosklerose bzw. dem sog. kardiovaskulären Remodelling (Ross, 1999). Dieser Fragestellung wurde auch vor dem Hintergrund der Aktivierung des p38-MAPK-Weges nachgegangen. In EC war dieser Signalweg an der Wachstumsfaktor-induzierten Umorganisation des Aktinskelettes und nachfolgender Migration beteiligt (Rousseau et al., 1997).

Im hier untersuchten Zellsystem bewirkte sCD40L, ob vernetzt oder nicht, keine Induktion der Migration, wobei dies nicht am Zellsystem lag, da sich die verwendeten SMC mit PDGF gut zur Migration anregen ließen.

Fasst man die Daten des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit zusammen, so konnte gezeigt werden, dass sCD40L zwar die mitogene Signaltransduktion, wie die ERK-1/2, p-38-MAPK und NFκB, aktiviert und auch DNA-Synthese induziert, aber die Proliferation bzw. Migration von kultivierten koronararteriellen SMC nicht stimuliert. In Anlehnung an die CD40L-induzierte Signaltransduktion und die daraus folgenden zellulären Reaktionen in B-Lymphozyten (vgl. Abb. 4) ergibt sich für SMC das in Abb. 33 dargestellte Bild.



Aus dem oben dargestellten Schema lässt sich schlussfolgern, dass CD40L nicht als Wachstumsfaktor für SMC angesehen werden kann. Inwieweit in vivo durch das Zusammenspiel vieler verschiedener, z.T. hoch aktiver Mediatoren, andere Verhältnisse eine Rolle spielen könnten, lässt sich derzeit nicht abschließend beantworten und bedarf noch weitergehender Untersuchungen. Aus der bestehenden Datenlage (vgl. 1.4 und 1.5) und den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man CD40L eher als Modulator inflammatorischer Prozesse bei entzündlichen Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose, ansehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung der Expression von CD40L auf der Oberfläche Thrombin-stimulierter Thrombozyten gab es bis vor kurzem keine weiteren Untersuchungen zur Regulation der Expression oder zum Vorhandensein modifizierter, löslicher Formen von CD40L in Thrombozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine differentielle Expression von CD40L im Vergleich zu den granulären Thrombozytenmarkern CD62P und CD63 nach Stimulation mit Kollagen gegenüber Stimulation mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid-6 (TRAP) gezeigt. Als wahrscheinlichste Ursache dieser differentiellen Oberflächenexpression konnte eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von CD40L gegenüber den granulären Markern nachgewiesen werden. Immunfluoreszenzuntersuchungen wiesen auf eine zytoplasmatische Lokalisation von CD40L hin und wurden durch Western Blot Untersuchungen bestätigt. Eine Assoziation an das Zyto- bzw. Membranskelett der Thrombozyten war nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden. Allerdings war die Expression von CD40L einerseits und den granulären Markern andererseits von denselben intrazellulären Signalwegen abhängig, nämlich der Verfügbarkeit intrazellulären Calciums und der Proteinkinase C. Ebenso konnte die Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte Expression von CD40L und CD62P durch den ADP-Rezeptorantagonisten Clopidogrel vollständig unterbunden werden, was auf eine Beteiligung des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors hindeutet. In der Pro-Megakaryozyten-Zelllinie MEG-01 wurde die Aufregulation der CD40L-Expression mittels Phorbol ester nachgewiesen. Die Untersuchung der molekularen Identität von thrombozytärem CD40L zeigte nur das Vorhandensein der membranständigen 33 kDa Form, die nach Stimulation mit TRAP nicht sezerniert wurde. Es konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, dass Thrombozyten über gespeicherte, lösliche Formen von CD40L verfügen, die sie infolge Aktivierung freisetzen könnten.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass CD40L in vielen Atherom-assoziierten Zelltypen potentiell proinflammatorische Faktoren beeinflusst. Über die Wirkung von CD40L auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) ist nur sehr wenig bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD40L die mitogene Signaltransduktion, wie die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK-1/2, p38-MAPK, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und die DNA-Synthese in bovinen koronararteriellen SMC, induzierte. Mittels neutralisierender Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung dieser Signalwege durch die spezifische Interaktion von CD40L mit seinem Rezeptor CD40 vermittelt wurde. Eine nachgeschaltete Proliferation boviner und humaner SMC konnte nach Stimulation mit löslichem sowie mit Membran-gebundenen CD40L ebensowenig beobachtet werden, wie die Migration boviner SMC. Die fehlende Proliferation der SMC war nicht durch die Induktion von Apoptose zu erklären.

CD40L ist daher nicht als Wachstumsfaktor für SMC, sondern eher als Modulator inflammatorischer Prozesse bei entzündlichen Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose, anzusehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Young LS, Adams DH. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J Exp Med* 189: 441-446, 1999
- Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 100: 614-620, 1999
- Barber AJ, Jamieson GA. Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J Biol Chem* 245: 6357-6365, 1970
- Batot G, Paquet MH, Doussiere J, Vergnaud S, Martel C, Vignais PV, Morel F. Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome b558. *Biochim Biophys Acta* 1406: 188-202, 1998
- Bearer EL, Abraham MT. 2E4 (kaptin): a novel actin-associated protein from human blood platelets found in lamellipodia and the tips of the stereocilia of the inner ear. *Eur J Cell Biol* 78: 117-126, 1999
- Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96: 2521-2527, 1995
- Berberich I, Shu G, Siebelt F, Woodgett JR, Kyriakis JM, Clark EA. Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J* 15: 92-101, 1996
- Bjorck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol* 9: 365-372, 1997
- Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 45: 826-842, 2000
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- Bretschneider E, Wittpoth M, Weber AA, Glusa E, Schrör K. Activation of NFkappaB is essential but not sufficient to stimulate mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 365-368, 1997
- Bruemmer D, Riggers U, Holzmeister J, Grill M, Lippek F, Settmacher U, Regitz Z, V, Fleck E, Graf K. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol* 87: 21-27, 2001
- Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 14: 559-564, 1993
- Dechanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoche J, Moreau JF. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol* 159: 5640-5647, 1997

- Fling SP, Gregerson DS. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155: 83-88, 1986
- Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31: 152-161, 1998
- Gawaz M. *Das Blutplättchen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999
- Graf D, Korthäuer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol* 22: 3191-3194, 1992
- Graf D, Müller S, Korthäuer U, van-Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 25: 1749-1754, 1995
- Gregory SA, Edgington TS. Tissue factor induction in human monocytes. Two distinct mechanisms displayed by different alloantigen-responsive T cell clones. *J Clin Invest* 76: 2440-2445, 1985
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802, 1995
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391: 591-594, 1998
- Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 98: 1047-1054, 2001
- Hess S, Gottfried E, Smola H, Grunwald U, Schuchmann M, Engelmann H. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28: 3594-3604, 1998
- Hollenbaugh D, Mischel PN, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 182: 33-40, 1995
- Jones SM, Kazlauskas A. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol* 3: 165-172, 2001
- Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci* 92: 4342-4346, 1995
- Karmann K, Min W, Fanslow WC, Pober JS. Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 184: 173-182, 1996
- Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*. 3: 1031-1039, 1995
- Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* 155: 4917-4925, 1995

- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001
- Lazaar AL, Amrani Y, Hsu J, Panettieri-RA J, Fanslow WC, Albelda SM, Pure E. CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle. *J Immunol* 161: 3120-3127, 1998
- Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med* 175: 1091-1101, 1992
- Li YY, Baccam M, Waters SB, Pessin JE, Bishop GA, Koretzky GA. CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells. *J Immunol* 157: 1440-1447, 1996
- Lutgens E, Cleutjens KBJM, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJAP. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7464-7469, 2000
- Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1931-1936, 1997
- Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 96: 396-399, 1997
- Mach F, Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 137 Suppl: S89-S95, 1998
- Mach F, Schönbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 154: 229-238, 1999
- Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 156: 3952-3960, 1996
- Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol* 63: 373-379, 1998
- Mroske C, Plant MH, Franks DJ, Laneuville O. Characterization of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 enzyme expression during differentiation of the megakaryocytic cell line MEG-01. *Exp Hematol* 28: 411-421, 2000
- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* : 3329-3355, 1999
- Paulie S, Koho H, Ben-Aissa H, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis. *Cancer Immunol Immunother* 17: 173-179, 1984
- Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 20: 23-28, 1985

- Peitsch MC, Jongeneel CV. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int Immunol* 5: 233-238, 1993
- Pradier O, Willems F, Abramowicz D, Schandene L, de-Boer M, Thielemans K, Capel P, Goldman M. CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway. *Eur J Immunol* 26: 3048-3054, 1996
- Quinn M, Deering A, Stewart M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation* 99: 2231-2238, 1999
- Ren CL, Morio T, Fu SM, Geha RS. Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2. *J Exp Med* 179: 673-680, 1994
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126, 1999
- Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* 93: 8241-8246, 1996.
- Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15: 2169-2177, 1997
- Ruan Y, Rabizadeh S, Camerini D, Bredesen DE. Expression of CD40 induces neural apoptosis. *J Neurosci Res* 50: 383-390, 1997
- Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 84: 891-896, 2000
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187: 1205-1213, 1998
- Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 81: 448-454, 1997
- Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Atkinson E, Levesque E, Herman M, Graber P, Basset P, Libby P. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med* 189: 843-853, 1999
- Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156: 7-14, 2000
- Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7458-7463, 2000
- Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58: 4-43, 2001

- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17: 221-237, 1992
- Schwarz UR, Kobsar AL, Kocsch M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol* 60: 1399-1407, 2000
- Sempowski GD, Chess PR, Phipps RP. CD40 is a functional activation antigen and B7-independent T cell costimulatory molecule on normal human lung fibroblasts. *J Immunol* 158: 4670-4677, 1997
- Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol* 274: C707-C714, 1998
- Singh J, Garber E, Van-Vlijmen H, Karpusas M, Hsu YM, Zheng Z, Naismith JH, Thomas D. The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. *Protein Sci* 7: 1124-1135, 1998
- Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Müller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 80: 1008-1014, 1998
- Smariga PE, Maynard JR. Platelet effects on tissue factor and fibrinolytic inhibition of cultured human fibroblasts and vascular cells. *Blood* 60: 140-147, 1982
- Suttles J, Milhorn DM, Miller RW, Poe JC, Wahl LM, Stout RD. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274: 5835-5842, 1999
- Tan J, Town T, Saxe M, Paris D, Wu Y, Mullan M. Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10. *J Immunol* 163: 6614-6621, 1999
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346: 561-576, 2000
- Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Covey LR, Lee JJ, Sinning J, Clark EA, Chess L, Lederman S. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J Immunol* 152: 598-608, 1994
- Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med* 182: 1857-1864, 1995
- Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, Baum D, Crow MK, Lederman S, Chess L. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol* 58: 209-216, 1995
- Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber AA, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane A₂ and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. *Circulation* 97: 589-595, 1998

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse

1. Rauch BH, **Hermann A**, Weber AA, Schrör K. Role of CD40 ligand for intracellular signaling in vascular smooth muscle cells. *Platelets* 11: 344-364, 2000
2. Weber AA, **Hermann A**, Rauch B, Schrör K. Differential regulation of platelet CD40L, CD62P and CD63 expression due to different subcellular localization. *J Submicrosc Cytol Pathol* 32: 416, 2000
3. **Hermann A**, Schrör K. CD40L on platelets – a possible role in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333 (Suppl. 2): 72, 2000
4. **Hermann A**, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localisation, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Ann Hematol* 80 (Suppl.): 89, 2001
5. Schrör K, Bretschneider E, Glusa E, **Hermann A**. Unfractionated heparin and low molecular weight heparin inhibit factor Xa- and thrombin-induced ERK-1/2 phosphorylation but not mitogenesis in human vascular smooth muscle cells. *Annals of Hematology* 80 (Suppl.): 220, 2001
6. **Hermann A**, Weber AA, Schrör K. Effects of clopidogrel on platelet adhesion and platelet-dependent mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl.): 442, 2001
7. **Hermann A**, Schrör K. CD40-Ligand (CD40L) aus Thrombozyten: Bedeutung für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ? *Z Kardiol* 90 (Suppl.): 289, 2001
8. **Hermann A**, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. CD40-Ligand in Thrombozyten: Subzelluläre Lokalisation, Regulation der Expression und Hemmung durch Clopidogrel. *Z Kardiol* 90 (Suppl.): 290, 2001
9. **Hermann A**, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localisation, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Thromb Haemost* 86 (Suppl.): OC917, 2001
10. Schrör K, Bretschneider E, **Hermann A**, Glusa E. Effects of unfractionated heparin and low molecular weight heparin on factor Xa- and thrombin-induced ERK-1/2 activation and mitogenesis in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 86 (Suppl.): P2784, 2001

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

1. **Hermann A**, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 12: 74-82, 2001
2. Weber AA, **Hermann A**, Rauch BH, Schrör K. Molecular identity of platelet CD40 ligand (CD40L). *Thromb Haemost* 86: 718, 2001
3. **Hermann A**, Weber AA, Schrör K. Clopidogrel inhibits platelet adhesion and platelet-dependent mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Thromb Res* (im Druck)
4. **Hermann A**, Schrör K, Weber AA. CD40 ligand (CD40L) does not stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* (im Druck)

8 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Viele anregende Gespräche brachten neue Denksätze und Sichtweisen hervor. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dr. Artur-Aron Weber danke ich für die Betreuung der Arbeit. Hilfreich waren die Einarbeitung in Thema und Methodik und zahlreiche anregende Diskussionen und Meinungsaustausche.

Dr. Marina Braun und Dr. Jutta Meyer-Kirchrath danke ich für zahlreiche beratende und unterstützende Gespräche, die einige Probleme lösen konnten.

Dr. Bernhard Rauch danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei einigen Experimenten und für das ein oder andere problemlösende Gespräch.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die Organisation des Institutslebens und die stets hilfsbereite Unterstützung bei Problemen jeglicher Art (insbesondere beim Ausgleich von Glucosedefiziten).

Petra Kuger danke ich für so manche hilfreiche Zusammenarbeit und Gespräche über Methoden, Computer und alle anderen Probleme, die so im täglichen (Labor-) Leben anfallen.

Ein Dank geht auch an Christine Machunsky und Beate Weyrauther für die Unterstützung in der Zellkultur.

Allen Kollegen, die die Zeit mit mir teilten, insbesondere Sigrid Nilus und Boris Przytulski, danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut. Jegliche Hilfe, sei es durch Gespräche, Materialien oder durch aufmunternde Worte haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir stets seelisch und moralisch zur Seite standen, meinem Bruder Henning, mit dem ich so manch fruchtbare aber auch kontroverse Diskussion über den Sinn der naturwissenschaftlichen Forschung geführt habe und meiner Freundin Christiane, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit viel Kraft gegeben und Einfühlungsvermögen entgegengebracht hat.

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den 30. November 2001

10 LEBENSLAUF

Alexander Hermann

Auf der Hoheneiche 23

41363 Jüchen

geboren am 04.03.1973 in Grevenbroich

Schulausbildung

August 1983 - Juni 1992

Besuch des Erasmus-Gymnasiums in Grevenbroich,
Abschluss mit dem Abitur

Studium und Promotion

Oktober 1992 – Dezember 1998

Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf und der
Università degli Studi di Trieste, Triest, Italien
Abschluss mit dem Staatsexamen

Januar 1999

Approbation zum Apotheker

Januar 1999 – Dezember 2001

Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität
in Düsseldorf bei Prof. Dr. K. Schrör
(Thema: Regulation der Expression, subzelluläre
Lokalisation und molekulare Identität von CD40-Ligand
in Thrombozyten. Mögliche Bedeutung für die
Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen)

Düsseldorf, den 30. November 2001