

"Moesin in Thrombozyten interagiert mit PECAM-1
- Bedeutung für die Atherosklerose und Restenose"

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Kerstin Seifert
aus
Ulm

"Moesin in Thrombozyten interagiert mit PECAM-1
- Bedeutung für die Atherosklerose und Restenose"

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Kerstin Seifert
aus
Ulm

Berichter: Herr Professor
Dr. med. Jürgen vom Dahl

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Mittermayer

Tag der mündlichen Prüfung: 12. August 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die Restenose.....	1
1.1.1. Pathogenese der Restenose.....	1
1.2. Thrombozyten.....	3
1.2.1. Struktureller Aufbau der Thrombozyten.....	3
1.2.2. Aktivierungsmechanismen in Thrombozyten.....	5
1.2.3. Das Thrombozyten-Zytoskelett.....	9
1.3. Die ERM-Familie.....	12
1.3.1. Moesin.....	13
2. ZIELSETZUNG.....	16
3. MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1. Chemikalien.....	17
3.2. Puffer.....	18
3.3. Gewebeproben.....	18
3.4. Geräte.....	19
3.5. Methoden.....	20
3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot... 20	
3.5.2. Immuno-Blot Analyse.....	21
3.5.3. Isolation von Moesin aus humaner Plazenta (modifiziert nach Bretscher et al., 1989).....	21
3.5.4. Kopplung von humanem Moesin an CNBr-aktivierte Sepharose 4B.....	22
3.5.5. Moesin-CNBr-Sepharose 4B Affinitätschromatographie.....	23
3.5.6. Thrombozytenisolation (modifiziert nach Bertagnolli und Beckerle, 1993).....	23
3.5.7. Mini-Schwein Femoralarterien (Paraffinschnitte).....	24
3.5.8. Ratten Karotisarterien (Kryoschnitte).....	24
3.5.9. Zellkultur humaner glatter Muskelzellen aus Umbilikalarterien.....	24
3.5.10. Immunhistologische Färbungen.....	25
3.5.11. Elektronenmikroskopie.....	25
3.5.12. Immunpräzipitation mit an Protein G-Sepharose gekoppeltem PECAM-1 Antikörper.....	25

4. ERGEBNISSE.....	26
4.1. Moesin in Thrombozyten.....	26
4.1.1. Proteine der Größe von ~110-130 kDa binden an isoliertes Moesin im Thrombozytenlysat.....	26
4.1.2. Aminosäuren-Sequenz Vergleich von PECAM-1 mit ICAM-1, -2, -3 und CD43, CD44.....	28
4.1.3. PECAM-1 kolokalisiert mit Moesin in glasaktivierten Thrombozyten.....	29
4.1.4. Moesin ist in thrombinaktivierten Throbozyten mit PECAM-1 assoziiert.....	32
4.1.5. Formation von „Adhäsions-Saugnäpfen“ in glasaktivierten Thrombozyten.....	33
4.2. Reexpression von Moesin in der Neointima und Media in Arterien nach Ballonangioplastie. Moesin als möglicher Marker für die Migration von glatten Muskelzellen <i>in vivo</i>?.....	34
4.2.1. Moesin wird <i>in vivo</i> in der Media/Neointima dilatierter Arterien reexprimiert.....	34
5. DISKUSSION.....	39
5.1. Methoden-Diskussion.....	39
5.2. Therapieansätze zur Vermeidung einer Restenose.....	42
5.3. Ergebnis-Diskussion.....	44
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	49
7. LITERATUR.....	51

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ABP	actin binding protein
ADP	Adenosindiphosphat
ACE	angiotensin converting enzyme
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
COX1	Cyclooxygenase 1
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
DTT	Dithiothreitol
EDRF	endothelial derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-Coenzym-A
ICAM	intracellular adhesion molecule
IE2-84	immediate early gene product 2-84
IGF	insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin-1
IP₃	Insitol 1,4,5-triphosphat
ITIM	immunreceptor tyrosinebased inhibition motif
LIBS	ligand induced binding site
LDL	low density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
NBT	nitroblue tetrazolium
NC	Nitrocellulose
oxLDL	oxidiertes LDL

PAF	platelet activating factor
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAR-1	proteaseactivated receptor-1
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cell adesion molecule-1
PLC-β	Phospholipase C-β
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PKC	Proteinkinase C
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphat
PPIs	Polyphosphoinositide
POD	Peroxidase
PTA	percutaneous transluminal angioplasty
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
PTPH1	protein tyrosine phosphatase PTPH1
PTPMEG	protein tyrosine phosphatase PTPMEG
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Scu-PA	Pro-Urokinase
TGF	transforming growth factor
TGF-β	transforming growth factor-β
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
t-PA	Gewebetyp(tissue)-Plasminogenaktivator
TRITC	tetramethylrhodamine isothiocyanate-dextran
TxA₂	Thromboxan A₂
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VWF	von Willebrand Faktor
vWF-R	von-Willebrand-Faktor-Rezeptor

1. EINLEITUNG

1.1. Die Restenose

Perkutane interventionelle Verfahren, wie die Ballondilatation (PTCA) oder Stentimplantation, sind heute bei bestimmten Indikationen neben der chirurgischen Versorgung Methode der Wahl, um den Blutfluß in atherosklerotisch stenosierte KoronargefäÙen wieder herzustellen. Im Jahr 2001 wurden in Deutschland 180.336 PTCA, meist gefolgt von einer Stentimplantation durchgeföhrt. Die Langzeitergebnisse dieser Methode werden jedoch durch den WiederverschluÙ der behandelten GefäÙe, die Restenose, die in 30 - 50 % der Fälle auftritt, limitiert [1, 2, 3, 4, 5].

1.1.1. Pathogenese der Restenose

Die Ballondilatation eines stenosierte Koronar-GefäÙes resultiert in einem substantiellen GefäÙschaden. So zeigen verschiedene Studien ausgedehnte Intimaschäden, die sich bis in die Media und sogar Adventitia fortsetzen [3, 6, 7, 8, 9]. Ip et al. klassifizieren drei verschiedene Verletzungstypen: Typ I: Endothelalterationen, Typ II: endotheliale Denudation mit superfizieller Intimaschädigung und Typ III: tiefe intimale und mediale Verletzungen [10]. Es muÙ jedoch davon ausgegangen werden, daÙ Verletzungen, die bis in die Adventitia hineinreichen, keine Seltenheit sind.

Die Entstehung einer Restenose wird durch verschiedene Faktoren geföhrt:

1. die Tiefe der Verletzung
2. die GröÙe der deendothelialisierte Bereiche [11, 12]
3. das Volumen des entstehenden Thrombus [13]
4. die Häufigkeit und Schwere von FluÙveränderungen [14]
5. eine residuale Stenose von > 30%
6. einen transstenotischen Gradienten > 15 mmHg [10, 15]

Die Prozesse, die bei der Entstehung einer Restenose ablaufen, lassen sich gut mit der Wundheilung vergleichen. So kann die Restenose als eine überschieÙende Heilungsreaktion betrachtet werden, die in gewissem Grade bei allen Patienten auftritt, jedoch nicht immer zur klinisch signifikanten Stenosierung des GefäÙes föhren muÙ.

Der Heilungsprozeß läuft in drei Phasen ab:

1. Thrombusentstehung und inflammatorische Phase
2. Granulationsphase, Zellproliferation
3. Extrazellulärmatrix-Remodelierung, Bindegewebsproduktion

Die erste Phase, die Stunden bis Tage andauert, beginnt unmittelbar nach dem Eingriff mit der Koagulation von Blut und Fibronectin. Dabei wird eine Extrazellulärmatrix gebildet, die die Bindung von Entzündungszellen sowie biologisch aktiven Substanzen fördert. Gleichzeitig aggregieren Thrombozyten auf der Wundoberfläche. Die aktivierten Plättchen schütten Substanzen aus, welche die lokale Vasokonstriktion und Thrombusformation weiter fördern, sowie Wachstumsfaktoren, die mesenchymale Zellen in der Umgebung des verletzten Gewebes aktivieren. Innerhalb weniger Stunden erscheinen Monozyten und T-Zellen in der Läsion, die dann weitere Wachstumsfaktoren sezernieren.

Die zweite Heilungsphase dauert etwa eine Woche und beginnt mit der lokalen Gewebszellmigration in die dilatierte Läsion. Die Fibronectinmatrix erleichtert das Einwandern der Fibroblasten und glatten Muskelzellen aus dem umliegenden Gewebe und der Endothelzellen von den Wundrändern aus. Alle genannten Zelltypen proliferieren. Die Endothelzellen bedecken die Wundoberfläche. Fibroblasten oder glatte Muskelzellen synthetisieren neue Komponenten der Extrazellulärmatrix, welche die weitere Migration und Proliferation von Zellen unterstützen.

Die dritte Phase dauert über Monate an. Sobald die Wundoberfläche mit einer Zellschicht bedeckt ist, verringert sich die Proliferationsrate der Zellen, und sie beginnen große Mengen an Extrazellulärmatrix (Kollagen, Elastin und verschiedene Proteoglykane) zu produzieren. [9, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20]

Strukturell betrachtet sind folgende Faktoren an der Bildung einer Restenose beteiligt:

1. der elastische Recoil: die Kontraktion der gedehnten elastischen Fasern innerhalb von Minuten nach der Prozedur
2. die Intimahyperplasie innerhalb von Wochen nach dem Eingriff
3. die unvorteilhafte Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix mit dem Versagen einer nach außen gerichteten Erweiterung des Gefäßes

4. eine Schrumpfung des gesamten Gefäßes im Sinne einer Narbenkontraktur durch Kollagen-Crosslinking bis zu drei Monaten nach der PTCA.

1.2. Thrombozyten

Bei der Entstehung atherosklerotischer Gefäße, sowie zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Entstehung einer Gefäßverletzung, z.B. bei der Ballondilatation, findet die Aktivierung von Thrombozyten statt. Diese aktivierten Blutplättchen interagieren mit beschädigtem Endothel, subendothelialen Strukturen, sowie verschiedenen Zelltypen und Plasmabestandteilen. Daher wird der Aktivierung von Thrombozyten eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Atherosklerose und Restenose zugeschrieben.

Thrombozyten sind kleine, 2-4 µm große, diskoidale Zellen ohne Zellkern. Sie werden im Knochenmark durch Zellmembranabschnürungen aus Megakaryozyten gebildet. Ihre Zahl im peripheren Blut beträgt etwa 150 000 bis 300 000 pro µl. Nur zwei Drittel der Blutplättchen zirkulieren. Das letzte Drittel ist als schnell verfügbare Reserve in der Milz gespeichert, wird jedoch fortwährend mit dem zirkulierenden Anteil ausgetauscht. Etwa ein Fünftel der Thrombozyten werden täglich im Knochenmark neugebildet und ins periphere Blut ausgeschwemmt. Der Abbau der Thrombozyten findet nach ca. 7 Tagen im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz statt [20]. Thrombozyten stehen im Zentrum der primären Hämostase und sind an den physiologischen Vorgängen der sekundären Hämostase, Chemotaxis und Entzündungsreaktion [21] und sogar der Abwehr von Mikroorganismen [22] beteiligt. Eine wichtige Rolle spielen sie auch bei den pathophysiologischen Vorgängen der Thrombosierung und der Entstehung von Atherosklerose und Restenose.

1.2.1. Struktureller Aufbau der Thrombozyten

Die Ultrastruktur des Thrombozyten kann funktionell in vier Zonen eingeteilt werden:

1. Zone der Organellen:
dichte Granula, α-Granula, Lysosomen, Glykogenspeicher und Mitochondrien
2. Strukturelle Zone:
Mikrotubuli, Aktin und Myosin
3. Membransysteme:

offenes kanalikuläres System und dichtes tubuläres System

4. Periphere Zone:

Plasmamembran und Glykokalix

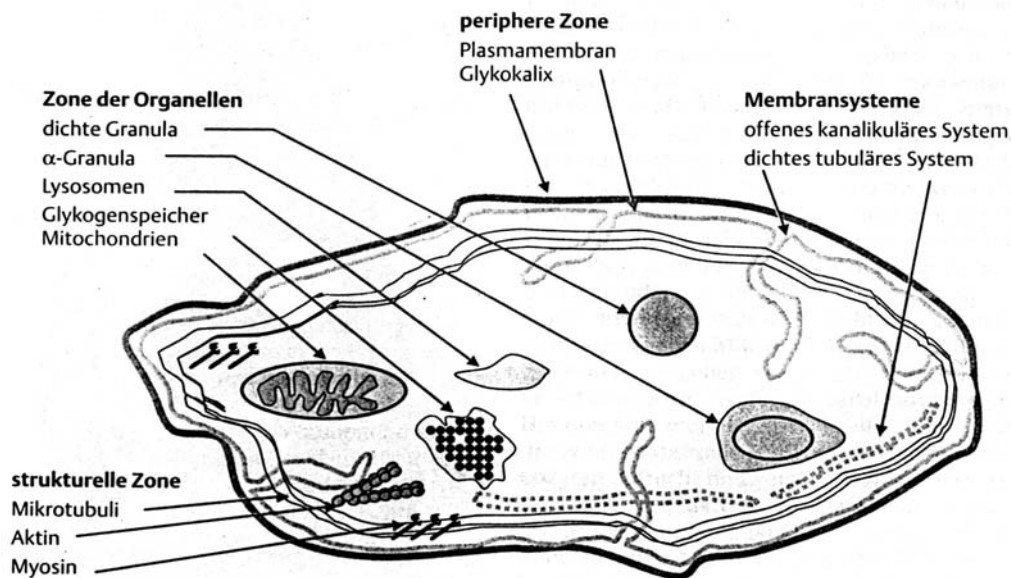


Abb. I: Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender Blutplättchen
(aus: Gawaz, M.: Das Blutplättchen, Georg Thieme Verlag, 1999 [20])

Die Zone der Organellen befindet sich im Zytoplasma. Sie besteht aus den für Thrombozyten typischen Speichergranula (dichte Granula, α -Granula und Lysosomen), den Glykogenspeichern und den Mitochondrien. Die dichten Granula enthalten eine Reihe niedermolekularer Verbindungen, wie ADP, ATP, Ca^{2+} und Serotonin, die den Aggregationsvorgang fördern. Die zahlenmäßig überwiegenden α -Granula enthalten Enzyme, adhäsive Proteine, Wachstumsfaktoren, zytokinähnliche Proteine und Koagulationsfaktoren. In den Lysosomen sind hydrolytische Enzyme gespeichert.

Strukturproteine, wie die submembranös gelegenen Mikrotubuli, Aktin und Myosin, stellen die strukturelle Zone dar. Diese Strukturproteine sowie ihre Verbindung mit der Zellmembran sind für die Form der Thrombozyten verantwortlich.

Die Membransysteme umfassen das offene kanalikuläre System und das dichte tubuläre System. Wie schon im Namen angedeutet, steht das offene kanalikuläre System über

Porenöffnungen in Verbindung mit dem Extrazellulärraum. Es hat die Form eines Netzwerkes aus gewundenen Gängen, die das Plättchenzytoplasma durchziehen und dadurch die Oberfläche der Thrombozytenmembran enorm vergrößern. Über dieses System werden plasmatische Substanzen aufgenommen und Sekretionsprodukte aus den Speichergranula an das Blutplasma abgegeben. Das dichte tubuläre System hat sich aus dem rauhen endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten entwickelt und ist einer der Hauptspeicherorte für freie Kalziumionen (Ca^{2+}). Ca^{2+} spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Thrombozytenmetabolismus und der Plättchenaktivierung.

Die periphere Zone besteht aus der Zytoplasmamembran, einer Phospholipid-Doppelschicht, die extrazellulär von einer Glykokalix bedeckt ist [20]. Diese Glykokalix, die weder bei Erythrozyten noch Leukozyten vorhanden ist, besteht aus in die Plasmamembran eingebetteten Glykolipiden, Glykoproteinen und integralen Proteoglykanen, deren Zuckeranteil in den Extrazellulärraum hineinragt. Zusätzlich sind weitere Glykoproteine und Proteoglykane, die z. T. Bestandteil der Extrazellulärmatrix sind, von außen angelagert [23]. Viele der thrombozytären Membranglykoproteine besitzen die Funktion von Rezeptoren. Sie werden in vier Gruppen eingeteilt:

- | | |
|---|--|
| 1. Integrine: | GPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$), GPIc-IIa ($\alpha_5\beta_1$), GPIc'-IIa ($\alpha_6\beta_1$), GPIIb-IIIa ($\alpha_{2b}\beta_3$), GP_{α_v} -IIIa ($\alpha_v\beta_3$) |
| 2. Leuzinreiche Glykoproteine: | GPIb-V-IX, GPIV (IIIb) |
| 3. Selektine: | P-Selektin |
| 4. Immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren: | intracellular cell adhesion molecule-2 (ICAM-2), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) [24] |

1.2.2. Aktivierungsmechanismen in Thrombozyten

Die physiologische Funktion der Thrombozyten besteht im Abdichten von Gefäßläsionen. Dieser Vorgang wird Hämostase genannt und dem zeitlichen Ablauf nach in drei Stadien unterteilt: die primäre Hämostase, die sekundäre Hämostase und die Fibrinolyse. Die primäre Hämostase umfaßt die vier Stadien der Thrombozytenaktivierung nach Mackie und Neal [25]:

1. Adhäsion der Thrombozyten am Substrat

2. Visköse Metarmorphose mit Ausbildung langer Filo- und Pseudopodien und „pfannkuchenartigem“ Ausbreiten des Cytoplasmas, später Verkleinerung des Zellkörpers und Zentralisation der Organellen und Mikrotubuli
3. Sekretion der Granulainhalte
4. Aggregation der Thrombozyten untereinander und am Substrat und Ausbildung eines primär hämostatischen Thrombus

Dieser Vorgang ist noch reversibel. In der Nachfolge kommt es dann zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, einer Thrombinaktivierung und Fibrinogenbildung. Dadurch entsteht der stabile sekundäre hämostatische Thrombus. Ein Teil dieses Thrombus wird während der Heilungsphase durch Fibrinolyse wieder abgebaut.

Ein erster Kontakt der zirkulierenden Blutplättchen mit der Zellwandläsion wird im Rahmen der primären Hämostase über den von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (vWF-R) GPIb-V-IX, der an in Kollagenfibrillen immobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF) des Subendothels bindet, hergestellt [26]. Durch weitere Bindung der Adhäsions-Rezeptoren GPIa-IIa, GPIc-IIa und GPIc'-IIa an Kollagen, Fibronectin und Laminin wird die Plättchenadhäsion stabilisiert und die Thrombozyten werden, insbesondere durch die Bindung des Kollagen-Rezeptors GPIa-IIa an Kollagen, aktiviert. Dies führt zur Formveränderung der Blutplättchen, die nun Filopodien ausbilden, und aktiviert die Cyclooxygenase 1 (COX1), die aus freigesetzter Arachidonsäure Thromboxan A₂ (TxA₂) bildet. Das TxA₂ verstärkt die Thrombozytenaktivierung und wirkt zusätzlich vasokonstriktiv. Des Weiteren setzen die aktivierten Plättchen den Inhalt ihrer Granula frei (Sekretion), welcher den Aktivierungsvorgang weiter verstärkt, weitere Blutplättchen aus dem Blutstrom rekrutiert und die Aggregation der Thrombozyten anregt. Diese Interaktion noch zirkulierender Thrombozyten mit den bereits adhärenenten Thrombozyten wird über aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren vermittelt. Diese Ca²⁺-abhängige Aktivierung versetzt das GPIIb-IIIa von einem nichtaktivierten niedrigaffinen Funktionszustand, in dem der Rezeptor nur immobilisiertes Fibrinogen binden kann, in einen aktivierten hochaffinen Funktionszustand, der es dem Rezeptor ermöglicht, lösliches plasmatisches Fibrinogen zu binden. Dies wiederum induziert eine weitere Konformationsänderung des Rezeptors und versetzt diesen in einen ligandenbesetzten Funktionszustand, wodurch Mechanismen der Signaltransduktion in Gang gesetzt werden und es zu einer irreversiblen Fibrinogenbindung an GPIIb-IIIa und einer Aggregation von Thrombozyten kommt [20, 27]. Sowohl der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa,

als auch der Vitronectin-Rezeptor $GP\alpha_v$ -IIIa, binden an verschiedene Substrate der Extrazellulärmatrix: GPIIb-IIIa: Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin – $GP\alpha_v$ -IIIa: Vitronectin, Fibrinogen und vWF. Die Funktion des Vitronectin-Rezeptors in Thrombozyten ist jedoch noch weitgehend ungeklärt [24].

Die Integrin-Rezeptoren haben zu ihren Liganden eine relativ geringe Affinität. Dies ermöglicht den Zellen, Kontakt zum Extrazellulärraum aufzunehmen und ihre Umgebung zu erkunden, ohne irreversibel an der Matrix festzukleben.

Die Funktion der leuzinreichen Glykoproteine ist noch weitgehend ungeklärt.

P-Selektin, der einzige in Thrombozyten vorkommende Selektin-Rezeptor, wird in den α -Granula gespeichert und erst bei Aktivierung freigesetzt und auf der Oberfläche exprimiert. Im Rahmen einer Gefäßwandläsion fördert auf der Plättchenoberfläche exprimiertes P-Selektin durch Bindung an ein auf den Leukozyten exprimiertes Oligosaccharid die Adhäsion von Leukozyten an die Läsion. Da die Affinität des P-Selektins zu seinen Liganden jedoch verhältnismäßig niedrig ist, ist es den Leukozyten möglich, am Endothel entlang auf die Läsion zuzurollen. Zusätzlich induziert P-Selektin inflammatorische Reaktionen in den Leukozyten.

Die Funktion der immunglobulinähnlichen Adhäsionsrezeptoren (cell adesion molecules) in Thrombozyten ist weitgehend unbekannt. PECAM-1 scheint eine Rolle bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel oder an membranständige Glykosaminoglykane in Leukozyten zu spielen [28, 29]. ICAM-2 scheint eine Bedeutung für die thrombozytenvermittelte Inflammation und Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten zu besitzen [20, 23].

Doch auch lösliche Agonisten können über eine weitere Gruppe von Membranrezeptoren Thrombozyten aktivieren. Dies sind der Thrombinrezeptor PAR-1, der Thromboxan-Rezeptor oder der ADP-Rezeptor, die an trimere G-Proteine gekoppelt sind. Alle Rezeptoren dieser Gruppe gehören zu einer großen Familie homologer Proteine, die die Plasmamembran siebenmal durchspannen. Die Bindung von Agonisten an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung von Phospholipase C- β . Diese wiederum hydrolysiert Plasmamembran-Polyphosphoinositide (pPIs), vor allem Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2), so daß

Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol entsteht [30]. IP_3 diffundiert ins Cytosol, bindet an IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle der Membran des endoplasmatischen Retikulums und löst dadurch die Ausschüttung von Ca^{2+} aus. Diacylglycerol hingegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC), eine wichtige Serin/Threonin-Proteinkinase, die verschiedene Proteine phosphoryliert und z. B. den Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa aktiviert. Sowohl Ca^{2+} als auch Diacylglycerol fungieren als „second messenger“. Das sind kleine Signalproteine, die als intrazelluläre Mediatoren die Signalkaskade fortsetzen, indem sie die Wirkungsweise verschiedener intrazellulärer Proteine verändern [23].

Unabhängig davon, über welche Rezeptoren Thrombozyten aktiviert werden, führt jede Aktivierung zu einer Formänderung der Blutplättchen. Sie verlieren ihr diskoides Aussehen um eine sphärische Form anzunehmen und bilden Filopodien und Lamellipodien, die der Thrombozytenadhäsion und -aggregation dienen. Dies erfordert eine Umstrukturierung des Zytoskeletts.

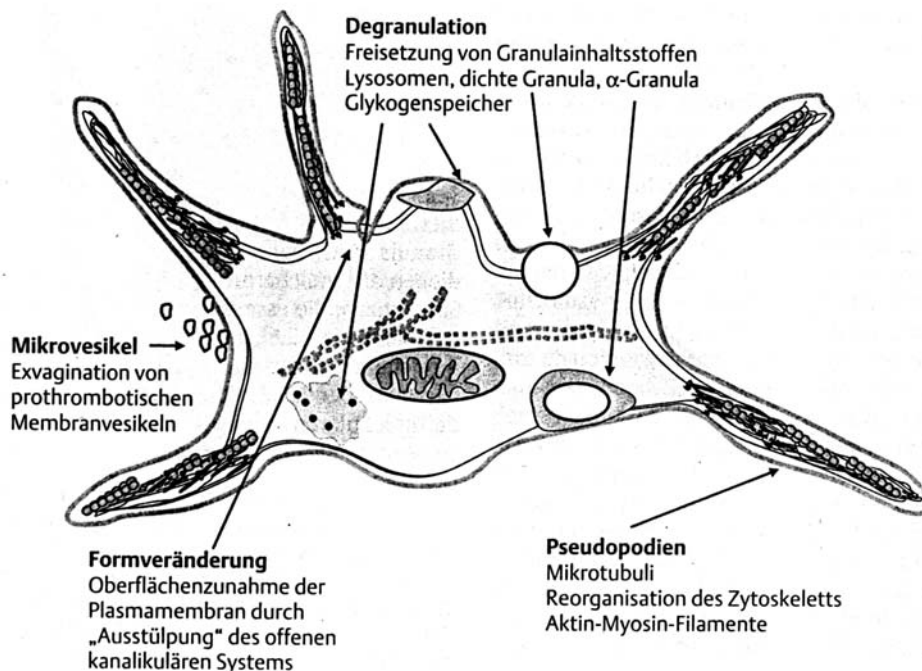


Abb. II: Schematische Darstellung der Ultrastruktur aktivierter Blutplättchen (aus: Gawaz, M.: Das Blutplättchen, Georg Thieme Verlag, 1999 [20])

1.2.2. Das Thrombozyten-Zytoskelett

Ruhende Thrombozyten zirkulieren im Blut als kleine diskoide Strukturen. Bei der Aktivierung verändern sie ihre Form, werden kugelförmig und bilden fingerähnliche Filopodien und breite, dünne Lamellipodien aus. Die Form der Thrombozyten wird durch ein robustes Zytoskelett, das aus Aktin- und Tubulinpolymeren und einem submembranbösen spektrinreichen Netzwerk besteht, stabilisiert. Im nicht aktivierten Thrombozyten finden sich etwa 2000 Aktinfilamente, die durch α -Aktinin zu parallelen Reihen und durch Filamin A (ABP-280) mit dem Membran-Glykoprotein GPIIb α verbunden werden. Das GPIIb α ist ein Bestandteil des von-Willebrand-Faktor-Rezeptor-Komplexes (GPIIb α -V-IX). Mehr als 90% des GPIIb α s ist an Filamin A gebunden, wodurch eine stabile Verbindung zwischen der Thrombozyten-Zytoplasmamembran und den zytoplasmatischen Aktinfilamenten entsteht, die die diskoide Form der ruhenden Thrombozyten erhält [31, 32]. Blutplättchen, denen der vWF-Rezeptor (vWFR) komplett fehlt, wie beim Bernard-Soulier Syndrom, haben eine abnormale Größe, kurze Zirkulationszeit und sind sehr fragil [33, 34]. Dies verursacht schwere Blutungsdiathesen mit verlängerter Blutungszeit.

Die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran wird von einem dichten Netzwerk von Spektrin bedeckt, das eng mit den Glykoproteinen in der Plasmamembran, z.B. GPIIb-IX und GPIIb-IIIa, verbunden ist. Fehlendes oder vermindert vorkommendes GPIIb-IIIa liegt bei der Thrombasthenia Glanzmann vor. Die Blutplättchen dieser Patienten sind nicht in der Lage an Fibrinogen zu binden, so daß es zu einer gestörten Thrombusbildung und verlängerter Blutungszeit kommt [33]. Das Aktin der ruhenden Thrombozyten ist einerseits über die Interaktion mit dem Spektrinnetzwerk, andererseits über Filamin A, das Aktin durch die Poren des Spektrin Netzwerkes hinweg mit dem vWFR verbindet, an die Plasmamembran gebunden [32].

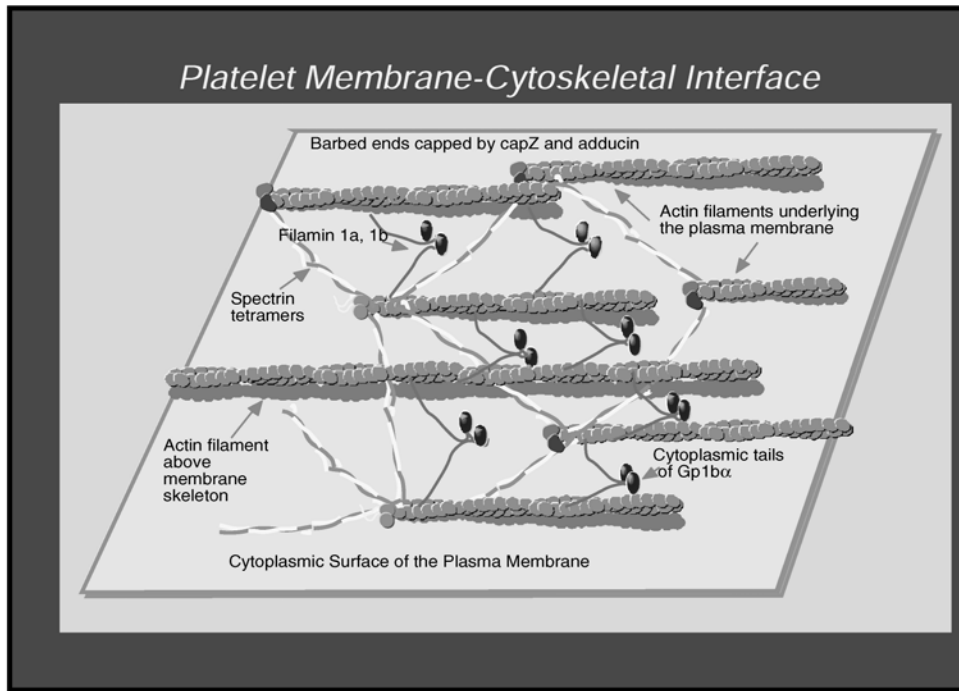


Abb. III: Nach Hartwig, 1992 [32]

Etwa 40 % des in den Thrombozyten vorhandenen Tubulins liegt polymerisiert in einer Spirale direkt unterhalb der Zellmembran vor und umspannt die Plättchen-Peripherie 8 bis 12 mal [35, 36].

Aktinfilamente (F-Aktin, filamentöses Aktin) sind polarisierte Strukturen mit einem langsam polymerisierenden Minusende (pointed end) und einem schnell polymerisierenden Plusende (barbed end), an dem bevorzugt Aktin polymerisiert wird. In nicht aktivierten Thrombozyten sind alle Plusenden durch Capping-Proteine, wie CapZ und Adducin, blockiert, wodurch eine Aktinpolymerisation verhindert wird [31, 32, 37]. Zusätzlich bilden alle Aktin-Monomere (G-Aktin, globuläres Aktin), die nicht in Filamente inkorporiert sind, Komplexe mit Proteinen, die eine Bindung an die Minusenden verhindern, wie Thymosin- β 4 und Profilin. Auch viele Minusenden selbst werden z.B. von Arp2/3-Komplexen oder anderen Proteinen gebunden [38].

Eine rezeptorvermittelte Aktivierung, wie durch den Thrombin-Rezeptor, führt zum „uncapping“, dem Freigeben der Plusenden, und die Aktinpolymerisation kann statt finden. Verschiedene intrazelluläre Mechanismen können den Prozeß der Aktinpolymerisation auslösen. So führt die Aktivierung des Thrombin-Rezeptors PAR zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung von Gelsolin. Das

aktivierte Gelsolin bindet seitlich an Aktinfilamente, spaltet diese und haftet anschließend am neu entstandenen Plusende. Kurz darauf werden Membranphospholipide (PIP_2) synthetisiert, die Gelsolin von Aktinfilamenten freisetzen. Durch diesen Prozeß werden viele kurze Aktinfilamente produziert, die dann neu zu einem Gitterwerk oder langen Aktinfilamenten arrangiert werden können. So können Zellausläufer, wie Filopodien oder Lamellae, entstehen [39].

Das mikrotubuläre Zytoskelett unterliegt ebenfalls Veränderungen. Die Mikrotubulusspirale wird entweder in das Zentrum der Zelle gedrückt oder in einzelne Mikrotubuli umstrukturiert, die vom Zentrum der Zelle in die Peripherie, insbesondere in Filopodien hineinreichen [35].

Die folgende Graphik stellt schematisch unterschiedliche, das Aktinzytoskelett rearrangierende Signalmechanismen dar:

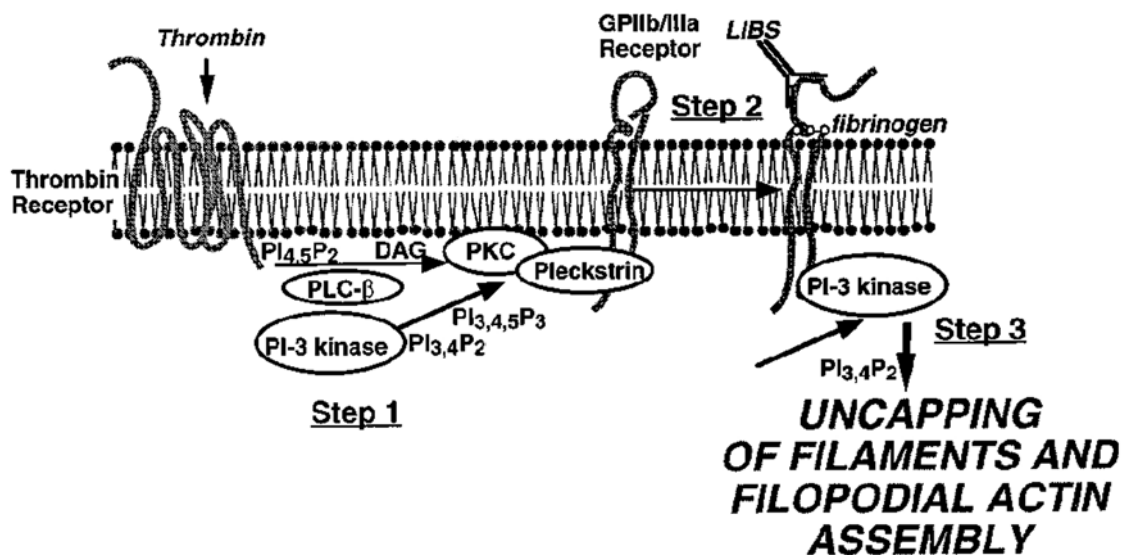


Abb. IV: Nach Hartwig et al., 1996 [39]

Aktinfilamente liegen in verschiedenen zwei- oder dreidimensionalen Strukturen vor, abhängig von der Funktion, die diese Strukturen erfüllen: Filopodien sind hochmobile Strukturen und werden von langen Aktinfilamenten, die parallel zu den Mikrotubuli aus dem Zentrum der Zelle heraus verlaufen, gebildet. In Lamellipodien, die zur Zellbewegung beitragen, liegt ein feines Aktinnetzwerk vor. Eine andere wichtige Struktur, die aus Aktinfilamentbündeln besteht, sind die sogenannten Stressfasern, die die Zelle mit der Extrazellulärmatrix über Integrine fest verbinden. Die Aktinfilamente sind hier in sogenannten „focal adhesion points“ verankert, die Komplexe aus $\beta 1$ -Integrinen, Talin,

Vinculin, α -Actinin, Protein-Kinasen und weiteren noch unbekanntenen Faktoren sind. Diese unterschiedlichen Strukturen werden durch multiple Signale ständig kontrolliert und entsprechend den extrazellulären Anforderungen, die an die Zelle gestellt werden, angepaßt [40, 41].

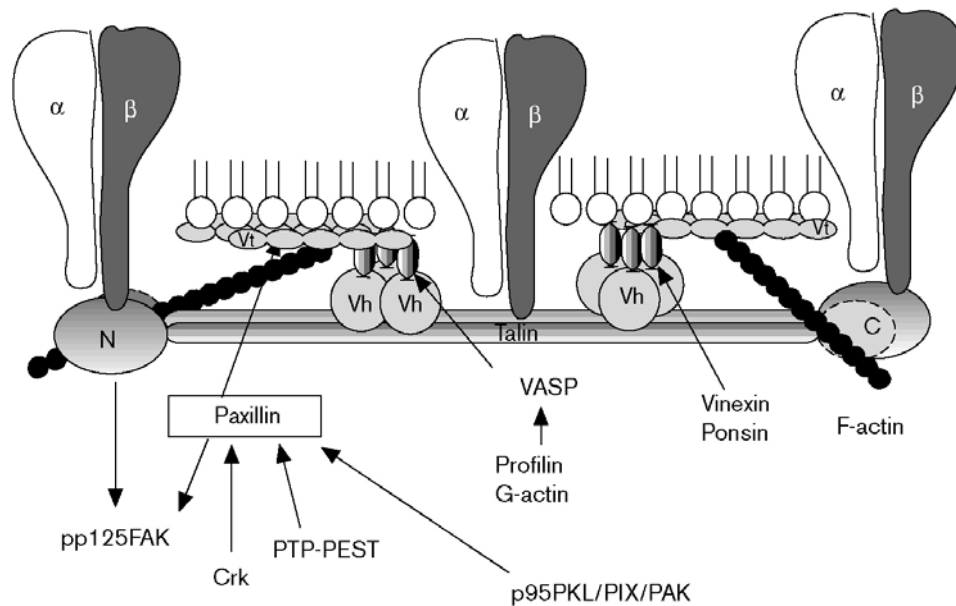


Abb. V: Nach Critchley, 2000 [41]
Molekulare Interaktionen in „focal adhesion points“

Bei den komplexen Vorgängen der Thrombozytenaktivierung und der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts spielen zytoskelettassoziierte Proteine eine wichtige Rolle als Signalübermittler zwischen der „Außenwelt“ und dem Zellinneren. Proteine der ERM-Familie stellen solche Bindeglieder oder Signalübermittler dar.

1.3. Die ERM-Familie

Die ERM-Familie besteht aus hochhomologen intrazellulären Proteinen und gehört zur „Protein 4.1-Superfamilie“. Mitglieder dieser Gruppe sind:

1. das Protein 4.1, zuerst entdeckt im submembranösen Zytoskelett der Erythrozyten, dessen c-terminales Ende an Spectrin und kurze Aktinfilamente und dessen n-terminales Ende an das Membranprotein Glycophorin C bindet.
2. Talin
3. die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) PTPH1 und PTPMEG
4. die „band 4.1 like“ Proteine NBL 1-5

5. die ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin
6. das „moesin-ezrin-radixin-like-protein“ (Merlin)
7. das Protein Brain 4.1

In humanen Thrombozyten ist Moesin als einziges Mitglied der ERM-Familie exprimiert.

1.3.1. Moesin

Moesin besteht aus 577 Aminosäuren und hat eine Größe von 78 kDa. Wie alle Proteine aus der Protein 4.1 Superfamilie besteht es aus drei Domänen: einer globulären hydrophoben Domäne am N-Terminus (Aminosäuren (AS) 1-310), die durch eine hydrophile α -Helix mit einer sehr viel kleineren globulären hydrophilen Domäne am C-Terminus (AS 404-577) verbunden ist. Eine transmembranöse Domäne besitzt Moesin nicht. Moesin ist ein hochkonserviertes Protein. Die Homologie zu Radixin beträgt 80 %, die zu Ezrin 72 %. Die Homologie zu Protein 4.1 und Talin ist insgesamt niedriger, am n-terminalen Ende jedoch sogar höher als die zu Radixin und Ezrin.

In vitro bindet Moesin an Heparin und Heparansulfat. In vivo bindet es mit seinem C-terminalen Ende an F-Aktin [42, 43]. Das n-terminale Ende bindet in Fibroblasten oder Leukozyten an ICAM-1, -2, -3, CD43 und CD44 [44, 45, 46]. So entsteht über Moesin und andere Proteine eine Verbindung („crosslink“) zwischen der Zellmembran und dem submembranösen Zytoskelett. Eine solche Verbindung ermöglicht die Änderung der Form von Zellen, z.B. bei ihrer Aktivierung oder Vorgängen wie der Proliferation und Migration.

Für die Bindung von Moesin an seine Bindungspartner ist zunächst die Aktivierung des Proteins erforderlich. Moesin liegt als inaktives Molekül in einer gefalteten Form vor, in der das n-terminale Ende an ein Segment des c-terminalen Endes bindet (AS 404-577) und somit die „aktiven Bindungsstellen“ maskiert. Die kalziumabhängige Phosphorylierung von Moesin am Threonin 558 sowie Phosphoinositide (PIP₂) führen zur Konformationsänderung, so daß das n- und c-terminale Ende freigelegt werden und Moesin an F-Aktin bzw. Rezeptoren binden kann. Abb. VI und VII stellen dieses Modell schematisch dar [47, 48, 49].

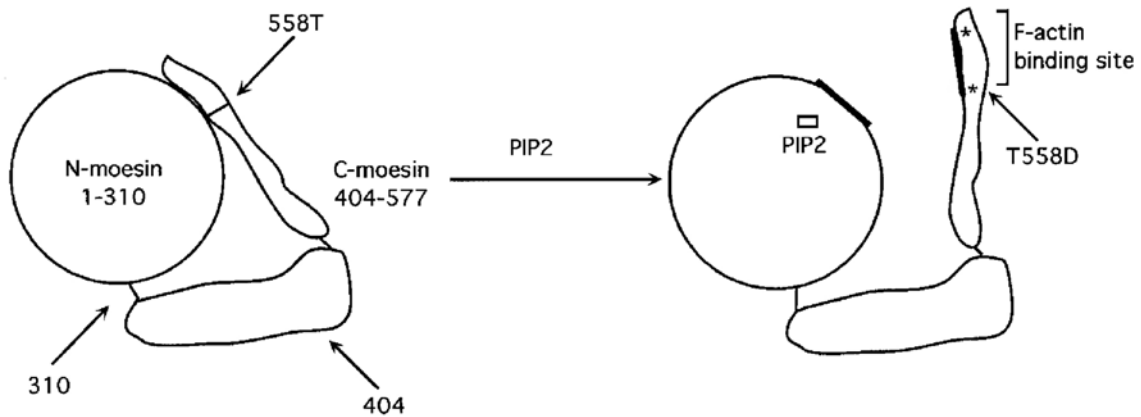


Abb VI: Nach Huang et al., 1999 [48]

Links: Inaktives Moesin, N- und C-Terminus interagieren

Rechts: Durch PIP2 aktiviertes und an Threonin 558 phosphoryliertes Moesin, eine hochaffine Aktin-Bindungsstelle sowie der N- und C-Terminus werden freigegeben

Die Threonin-558-Phosphorylierung von Moesin wird durch die Rho-Kinase und Protein-Kinase C- θ reguliert [50, 51, 52]. In Thrombozyten führt eine Thrombinaktivierung zur Phosphorylierung von Threonin 558. *In vitro* wird die Moesinbindung an F-Aktin durch Polyphosphoinositide (PPI₂) und die Phosphorylierung von Threonin 558 reguliert.

Abbildung VII zeigt schematisch, wie der Mechanismus der Moesin-Aktivierung innerhalb einer Zelle ablaufen könnte: Moesin wird durch den PPI₂-Anstieg und die Phosphorylierung von Threonin 558 „geöffnet“ und wahrscheinlich an die Zellmembran transloziert. Dort interagiert es dann mit F-Aktin, Adhäsionsmolekülen wie CD44 und anderen Proteinen und nimmt an der Formation von Filopodien oder Lamellae teil [49].

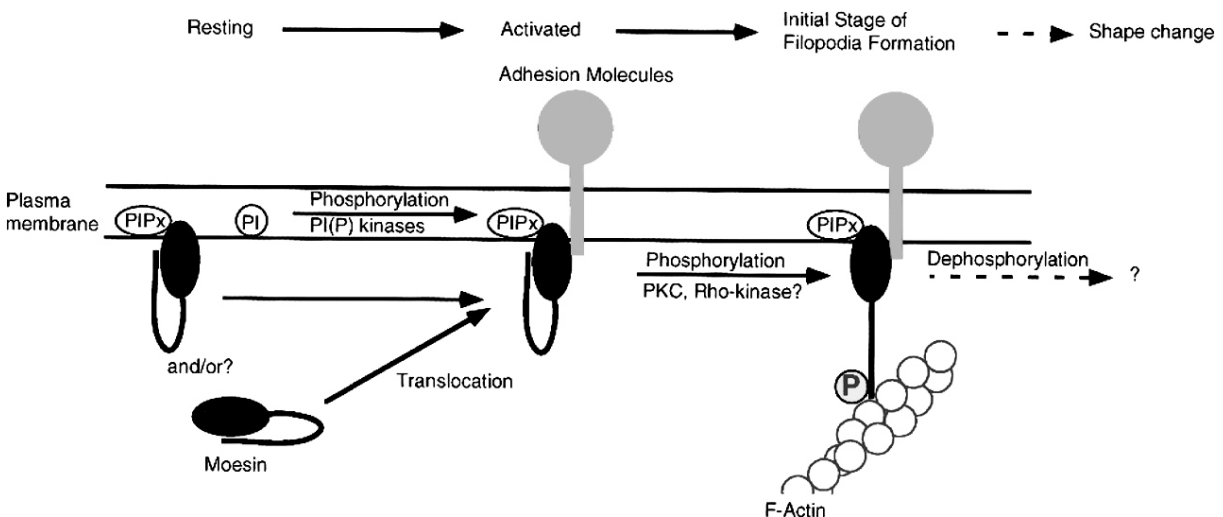


Abb. VII: Nach Nakamura et al., 1999 [49]

In Thrombozyten wird Moesin als einziges Mitglied der ERM-Familie exprimiert . Bisher ist nicht bekannt, an welches Adhäsionsmolekül Moesin in Thrombozyten bindet, denn alle bisher identifizierten Bindungspartner kommen in Blutplättchen nicht vor. Ferner ist unklar, ob Moesin *in vivo* noch weitere Funktionen hat.

2. ZIELSETZUNG

Das Krankheitsbild der Atherosklerose ist gekennzeichnet durch die Läsion des antithrombotisch wirkenden Endothelzellmonolayers. Diese atherosklerotischen Gefäßveränderungen führen zur Aktivierung, Adhäsion und schließlich zur Aggregation von Thrombozyten. Die Stadien der Thrombozytenaktivierung zeichnen sich durch distinkte morphologische Veränderungen aus, die mit einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts einhergehen. Die Regulation der Thrombozytenaktivierung trägt erheblich zur Erhaltung der Hämostase bei. Das Verständnis dieser Vorgänge dient der Vorbeugung von thrombotischen Komplikationen des atherosklerotischen Krankheitsbildes, wie des Herzinfarktes.

Eine weitere Komplikation stellt die Restenose nach intravasculären Manipulationen, wie der PTCA oder einer Stent-Implantation, dar. Die Restenose ist einerseits begleitet von der Einwanderung von Monozyten und demzufolge auch Thrombozyten, aber auch von einer „Reaktivierung“ von glatten Muskelzellen, die erneut die Fähigkeit zur Migration erlangen und fibroblastenähnliche Eigenschaften aufweisen. Die Zellaktivierung und Zellmigration erfordert eine Reorganisation des Zytoskeletts. Dieses wird durch den ständigen Austausch von Informationen zwischen extrazellulären Rezeptoren und intrazellulären Signalen durch zytoskelett-assoziierte Proteine wie Moesin vermittelt. *In vivo* wird Moesin nicht von glatten Muskelzellen exprimiert. Das Wiedererlangen der Migrationseigenschaft kann bedeuten, daß Proteine oder Signale, die hierfür benötigt werden, wieder angeschaltet werden.

Ziele dieser Arbeit waren:

1. der Nachweis eines Moesin-Bindungspartners in humanen Thrombozyten nach Thrombin-Aktivierung.
2. zu untersuchen, ob im Falle der Restenose Moesin in glatten Muskelzellen wieder exprimiert wird

Kenntnisse über diese Mechanismen können zum besseren Verständnis der Thrombozyten-Aktivierung, Regulation und möglicherweise ihrer Rolle sowie der Rolle von Moesin in der Atherosklerose und Restenose dienen. Diese Kenntnisse können eine therapeutische Bedeutung für die Prävention und die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen erlangen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Chemikalien

Bio Rad-Laboratories, Richmond, USA:

Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)

Boehringer Ingelheim:

Serum Albumin vom Rind (BSA)

Boehringer Mannheim:

Nitroblue tetrazolium (NBT), 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)

Dako, Hamburg:

Maus-anti-CD31(PECAM-1)-Antikörper, Maus-anti-CD62 (P-selectin)-Antikörper

Dianova, Hamburg:

Maus-anti-smooth muscle cell actin(SMA)-Antikörper, Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG- und Kaninchen-anti-Huhn-IgG-Antikörper, FITC-konjugierte Kaninchen-anti-Huhn-IgG-Antikörper, TRITC-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper

Gibco, BRL, Eggenstein:

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Immunotech, Hamburg:

Maus-anti-Vinculin-Antikörper

Merck, Darmstadt:

Alle Grundchemikalien, 3-(Triethoxysilyl)-propylamin

Pharmacia/LKB, Freiburg:

Polyacrylamid-Gradientengele (8-25%), Pufferstreifen für die SDS-PAGE, CNBr-aktivierte Sepharose 4B

PIERCE, Rockford, Illinois, USA:

Super Signal®Substrat

Schleicher und Schüll, Dassel:

Nitrocellulose (NC)-Blot-Membran

Serva, Heidelberg:

Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), Dithiothreitol (DTT)

Sigma, München:

Prestained Molecular Weight Marker (26.600 – 180.000 Da), Thrombin, Propidiumjodid

3.2. Puffer

Dulbecco's PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}):

2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2HPO_4 ; 138 mM NaCl; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

Der polyklonale Huhn-anti-Moesin-Antikörper wurde von A. Gamulescu (Medizinische Klinik I der RWTH-Aachen) zur Verfügung gestellt.

3.3. Gewebeproben

Die verwendeten Mini-Schwein-Femoralarterien wurden von Prof. T. Hohlfeld (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Femoralarterie der linken Seite wurde mittels PTA dilatiert, die Gegenseite diente als Kontrolle. Die Tiere wurden 4 Stunden nach der PTA getötet, die Femoralarterien entfernt und in $-20\text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Methanol über 24 h fixiert.

Das Ratten-Carotiden-Gewebe wurde von Dr. Jürgen Fingerle (Pharma Division, Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz; [53]) zur Verfügung gestellt . Es wurde jeweils die linke Arteria carotis einer Ratte mittels PTA dilatiert, die Gegenseite diente als Kontrolle. Die Ratten wurden nach 14 Tagen getötet, die Carotiden entnommen und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Die glatten Muskelzellen für die Zellkultur stammten aus der Media humaner Umbilikalarterien und wurden in der ersten Passage verwendet.

3.4. Geräte

Folgende Zentrifugen wurden benutzt:

Model L5-65 und J-6B der Firma Beckman, Varifuge 3.2 RS der Firma Heraeus.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leitz (DMR-X) (100 x 1,3 Ölimmersionsobjektiv) beurteilt, und auf Kodak T-MAX 400 ASA Film (Eastman Kodak Co, Rochester, NY) fotografiert.

Die Rasterelektronenmikroskopie(REM)-Aufnahmen wurden mit einem DSM 982 Gemini der Firma Zeiss angefertigt.

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen (SDS-PAGE) wurden in dem horizontalen Phast-System der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) und in einer vertikalen Elektrophoresekammer der Firma IdeA (Minneapolis, USA) durchgeführt.

Der Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine von SDS-Gel auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte ebenfalls im Phast-System der Firma Pharmacia und in einem Gerät der Firma Biometra.

Zur Einengung von Proben wurde eine Ultrafiltrationskammer der Firma Amicon mit einem YM10 Diaflo®Ultrafilter verwendet.

Die Thrombozyten-Aggregation wurde in dem Aggregometer der Firma Labor-Apact durchgeführt und als Anstieg der Lichttransmission gemessen.

Die Thrombozytensuspensionen wurden mit dem Sonifier S 250 A der Firma Branson homogenisiert.

Zum Entwässern und Einbetten der Gewebeproben in Paraffin wurden der Einbettautomat Tissue-TEK®VIP und die Gießstation Tissue-TEK®III der Firma Sekura verwendet.

Die Paraffin- und Kryoschnitte wurden mit Geräten der Firma Leica (RM2125 und CM1850) hergestellt.

3.5. Methoden

3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

a) Horizontale SDS-PAGE (PHAST-System der Firma Pharmacia)

Die verwendeten Lösungen für die Silberfärbung setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung 1 (10 min.):

50 mg Coomassie Blue G250 in 30 % Ethanol und 70 % 20 %iger Trichloressigsäure

Lösung 2 (2 x 30 min.):

30 % Ethanol; 10 % Eisessig in H₂O

Lösung 3 (10min):

1 % AgNO₃ in H₂O

Lösung 4 (5-10 min.):

2,5 % Na₂CO₃; 0,2 % Formaldehyd

Lösung 5 (20 min.):

1 % Glycin

Lösung 6 (über Nacht):

20 % Glycerin

Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit dem SDS Probenpuffer nach Laemmli, reduzierende Bedingungen 4 x (0,250 M Tris base; 40 % Glycin; 8 % SDS; 20 % 2-Mercaptoethanol; 0,008 % Bromphenolblau; pH 6,8 [54]), versetzt und anschließend bei 96 °C für 5 min erhitzt und mit Hilfe von 8-25 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA, 14 °C getrennt und anschließend silbergefärbt [55]. Die oben genannten Lösungen für die Silberfärbung wurden in der oben angegebenen Reihenfolge verwendet. Im Anschluß an die Coomassie-Entfärbereaktion (Lsg. 2) wurden die Gele für 1 Stunde gewässert und silbergefärbt.

Anderwärtig wurden die Gele dem Western Blot zugeführt. Die Proteine wurden hierzu auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm; Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) bei 70 °C, 30 min und unter Verwendung eines 500 g Gewichtes geblottet.

b) Vertikale Elektrophorese (Firma IdeA, Minneapolis, USA)

SDS Elektrophorese Puffer (10x): 25 mM Tris base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS, pH 8,6

Die mit Laemmlipuffer versetzten Proteinproben wurden über 8% Polyacrylamid Gele mit Vorschaltung von 4% Polyacrylamid-Sammel-Gelen bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA und einer Spannung von 150 V getrennt. Die getrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotting-Systems der Firma Biometra auf verstärkte Nitrocellulosemembranen bei einer konstanten Stromstärke von 5mA für 30 min, 4 °C geblottet (2,5 mM Tris/Cl; 16 mM Glycin; 20 % Methanol; pH 8,1)

3.5.2 Immuno-Blot Analyse

Um unspezifische Bindungstellen auf den Nitrocellulosemembranen zu blockieren, wurden diese zuerst in Blockier-Puffer (5 % Magermilchpulver in PBS) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 3 % BSA in PBS in der entsprechenden Verdünnung (1 h, RT). Anschließend wurden die Membranen gewaschen (20 mM Tris/Cl; 150 mM NaCl; 0,1 % Nonidet P40; pH 8,0, 3 x 5 min) und mit einem POD-konjugierten Sekundär-Antikörper in 3 % BSA in PBS (1:500) 45 min lang bei RT inkubiert und erneut mit PBS gewaschen (3 x 5 min). Die Detektion erfolgte mit Hilfe folgender Entwicklerlösung: 100 ml 50 mM Tris/Cl; 50 mg DAB; 17 µl H₂O₂ (30 %); pH 7,4 oder unter Anwendung eines verstärkten Chemilumineszenzsystems (Firma Pierce).

3.5.3 Isolation von Moesin aus humaner Plazenta (modifiziert nach Bretscher et al., 1989 [56])

Hydroxyapatit Puffer:

Low Salt: 0,1 M KH₂PO₄; 0,1 M K₂H PO₄; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 7,0

High Salt: 0,8 M KH₂PO₄; 0,8 M K₂H PO₄; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 7,0

Q-Sepharose Puffer:

Low Salt: 20 mM NaCl; 20 mM Bis-Tris-Propan; 1 mM DTT; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 6,7

High Salt: 1 M NaCl; 20 mM Bis-Tris-Propan; 1 mM DTT; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 6,7

Heparin-Sepharose Puffer:

Low Salt: 100 mM NaCl; 20 mM Tris/Cl; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 7,5

High Salt: 1 M NaCl; 20 mM Tris/Cl; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 7,5

Humane Plazenta wurde zunächst bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend unter ständigem Rühren homogenisiert (80 g Plazenta/320 ml 0,15 M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Tris/Cl; 1 mM DTT; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 7,5). Die Suspension wurde für 30 min bei $47000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit 40 % Ammoniumsulfat abgesättigt. Das Präzipitat wurde durch eine erneute Zentrifugation 30 min lang bei $47.000 \times g$ gesammelt, die Ammoniumsulfatsättigung auf 65 % erhöht und erneut zentrifugiert (30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $47.000 \times g$). Der dadurch entstandene Niederschlag wurde resuspendiert (80 g Plazenta/20 ml 20 mM NaCl; 1 mM DTT; 10 mM Imidazol; 0,5 mM Benzamidin; 0,5 mM PMSF; pH 6,7). Eventuell entstandene Präzipitate wurden durch Zentrifugation (30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $47.000 \times g$) entfernt. Der Überstand wurde auf 0,1 M Phosphatpuffer eingestellt und auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen und eluiert. Die Moesin enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und mit Hilfe der Q-Sepharose weiter gereinigt. Moesin enthaltende gepoolte Fraktionen wurden anschließend gegen 10 mM Imidazol-HCL (pH 7,4)-Puffer (1 mM DTT, 20 mM NaCl) dialysiert und anschließend auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen und mit Hilfe der o.g. Puffer eluiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Hilfe von SDS-PAGE (8-25 % Gele) und Silberfärbung verfolgt und bestätigt. Die gepoolten Moesin-enthaltenden Fraktionen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung eingefroren.

3.5.4. Kopplung von humanem Moesin an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Reines Moesin aus Plazenta wurde gegen 0,1 M NaHCO_3 ; 0,5 M NaCl; pH 8,3 0 (Kopplungs-Puffer) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dialysiert. 1 g Sepharose wurde über 15 min in 1 mM HCl gequollen und mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen, in Kopplungs-Puffer resuspendiert und mit humanem Moesin für 2 h bei RT inkubiert. Freie Bindungstellen wurden mit 0,2 M Glycin pH 8 abgesättigt und das ungekoppelte Moesin durch viermaliges abwechselndes Waschen in Acetat-Puffer (0,1 M CO_3COONa ; 0,5 M NaCl; pH 4,0) und Kopplungs-Puffer entfernt.

3.5.5. Moesin-CNBr-Sepharose-4B-Affinitätschromatographie

Die mit dem Moesin gekoppelte CNBr-Sepharose 4B wurde mit Wasch-Puffer (0,01 M Tris/Cl; 0,14 M NaCl; 0,025 % NaN₃; pH 8), Tris Puffer (50 mM Tris/Cl; 0,5 M NaCl; 0,1 % Triton X-100; pH 8) und Triethanolamin Puffer (50 mM Triethanolamin; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton X-100; pH 11) aufgenommen und erneut mit Wasch-Puffer gewaschen und äquilibriert. 5 ml frisch isolierter und lysierter Thrombozyten ($5 \times 10^8/l$) wurden auf die Moesin-CNBr Sepharose 4B Säule aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Wasch-Puffer, Tris-Puffer pH 8 und Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM Natrium-Phosphat; 0,5 M NaCl; 0,1 % Triton X-100; pH 6,3) entfernt. An die Moesin-Sepharose gebundene Proteine wurden mit Glycin Puffer (50 mM Glycin/Cl; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton X-100; pH 2,5) eluiert und mit 20 % 1 M Tris/Cl pH 9 neutralisiert. Das Eluat und der Durchlauf wurde mit Hilfe von Überdruckfiltration durch einen Diaflo®Ultrafilter (Porengröße 10 kDa) in einer Dialyse-Kammer der Firma Amicon auf insgesamt 500 µl eingeengt.

3.5.6. Thrombozytenisolation (modifiziert nach Bertagnoli und Beckerle, 1993 [27])

Antikoagulant: 85 mM NaCitrat; 111 mM Dextrose; 71 mM Zitronensäure

Einem gesunden Probanden, der seit mindestens zwei Wochen keine Prostacyclinsynthese-hemmenden Medikamente (z.B. Aspirin®) eingenommen hatte, wurden 20 ml Blut abgenommen und mit 2 ml Antikoagulant vermischt. Dieses Blut wurde bei 160 g für 20 min in einer Heraeus-Zentrifuge zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde abgehoben und bei 730 g für 20 min bei 37 °C zentrifugiert. Der Thrombozyten-Niederschlag wurde mit CGS-Puffer (120 mM NaCl; 13 mM NaCitrat; 30 mM Dextrose; pH 7,0) durch erneutes Zentrifugieren bei 730 g (20 min, 37 °C) unter Zugabe von Prostaglandin-1 (1µg/ml) gewaschen und anschließend in TYRODES-Puffer (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 0,4 mM NaH₂PO₄; 5,5 mM Dextrose; 1,8 mM CaCl; 0,4 mM MgCl₂; pH 7,4) resuspendiert und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Thrombozyten wurden in einem Coultercounter gezählt und auf 5×10^8 Zellen/ml eingestellt. Nachdem die Thrombozyten geruht hatten, wurden sie durch Sonifikation (30 s, 200 W) lysiert und der Affinitätschromatographie, bzw. nicht lysierte Thrombozyten morphologischen Studien

zugeführt. Hierzu wurden ruhende und 10 min Glas-aktivierte Thrombozyten 20 min lang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert.

3.5.7. Mini-Schwein Femoralarterien (Paraffinschnitte)

Das methanol-fixierte Femoralarteriengewebe der Mini-Schweine wurde in einem Einbettautomat der Firma Sekura entwässert (2 x 75 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 3 x 100 % Ethanol, Xylol, Paraffin) und in einer Einbettstation der Firma Sekura in Paraffin eingebettet. Schnitte von 3 μm Dicke, geschnitten mit einem Mikrotom der Firma Leica, wurden auf Objektträger aufgezogen und entparaffiniert [Xylol (10 min), 100 % Ethanol (3 min), 58 ml Methanol + 2ml H_2O_2 (10 min), 96% Ethanol (3 min), 70% Ethanol (3 min) und H_2O (3 min)].

3.5.8. Ratten Karotisarterien (Kryoschnitte)

Gefrierschnitte von 5 μm Dicke, geschnitten mit einem Kryotom der Firma Leica, wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen und für 30 min mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol fixiert. Die Silanbeschichtung von Objektträgern wurde wie folgt durchgeführt: Aceton (5 min), anschließend trocknen (45 min, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$), 10 % Triethoxysilyl in Aceton (5 min), reines Aceton (5 min), 2x 3 min H_2O , über Nacht trocknen ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.5.9. Zellkultur humaner glatter Muskelzellen aus Umbilicalarterien

Glatte Muskelzellen wurden aus der Media humaner Umbilicalarterien durch das Abschaben von Intima und Adventitia und anschließender Zerkleinerung der Media mit einem Skalpell isoliert. Sie wurden in Kulturflaschen der Firma Falcon in DMEM Medium mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin in einem Inkubator (5 % CO_2 , 37°C) kultiviert. Für die Immunhistologischen Färbungen wurden die glatten Muskelzellen in der zweiten Passage auf Glasobjektträgern kultiviert und anschließend für 20 min mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol fixiert.

3.5.10. Immunhistologische Färbungen

In einer feuchten Kammer wurden fixierte Thrombozyten, glatte Muskelzellen oder Gewebeschnitte mit PBS rehydriert und anschließend mit 5 % BSA in PBS für eine Stunde bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 5 % BSA in PBS für 1h bei RT aufgetragen, anschließend wurde mit PBS 30 min lang gewaschen, der sekundäre Antikörper (1:500) aufgetragen, erneut mit PBS gewaschen und mit 1 %igem Glycin in PBS eingedeckelt.

3.5.11. Elektronenmikroskopie

Glasaktivierte Thrombozyten wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Formaldehyd in 0,1 M Cacodylat Puffer pH 7,4 fixiert und in staubarmer Umgebung getrocknet. Die Rasterelektronenmikroskopie(REM)-Aufnahmen wurden mit einem DSM 982 Gemini der Firma Zeiss angefertigt. Um einen guten Kontrast zu erhalten und die Aufladung der Proben zu vermeiden wurden diese mit einer Goldschicht von ca. 3-4 nm bedampft.

3.5.12. Immunpräzipitation mit an Protein G-Sepharose gekoppeltem anti-PECAM-1-Antikörper

Ruhende, thrombinaktivierte (1 U/ml, 3 min, 37 °C) und im APACT Aggregometer aggregierte Thrombozyten (1 U/ml Thrombin, 3 min, 37 °C) wurden mit Hilfe von 3x NP40 Lysis Puffer (3 % Nonidet P-40, 150 mM Tris/HCl, 450 mM NaCl, 3 mM EGTA, 3 mM PMSF, 3 mM Na₃VO₄, 30 µg/ml Leupetin, 30 µg/ml Aprotinin, pH 7,4) in einem Verhältnis 2 :1 lysiert und für 5 min bei 15000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem monoklonalen anti-PECAM-1-Antikörper (DAKO) über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Protein G-Sepharose versetzt. Die Immunkomplexe wurden mit 1 x NP40 Lysis Puffer gewaschen, in 1 x NP40 Lysis Puffer resuspendiert mit Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 96 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Moesin in Thrombozyten

ERM-Proteine binden an CD 44 in Thymozyten und Fibroblasten. Weitere bekannte Bindungspartner sind Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) und ICAM-3 (CD50) [44, 45, 46, 47, 57, 58, 59], bzw. Adapterproteine, wie EBP50 [60, 61]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Bindungspartner von Moesin in Thrombozyten identifiziert.

4.1.1. Proteine der Größe von ungefähr 110-130 kDa binden an isoliertes Moesin im Thrombozytenlysat

Einen ersten Anhaltspunkt für Bindungspartner bot die direkte Immunpräzipitation mit aus humaner Plazenta isoliertem und an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppeltem Moesin. Nach der Bindung des Moesins an die Sepharose wurde ein frisch präpariertes Thrombozytenlysat auf diese Säule aufgetragen und die an die Säule gebundenen Proteine (Eluat) und der Durchlauf mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert.

Abb. 1 A zeigt zunächst verschiedene Schritte der Moesin-Isolierung. In Bahn Nummer 4 liegt reines Moesin mit einer Größe von 78 kDa vor.

Abb. 1 B zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation. Der Durchlauf sowie die an die Säule gebundenen und anschließend eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silbernitratfärbung analysiert. Im Eluat wurden vor allem Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 100-130 kDa analysiert. Diese Proteine liegen im Größenbereich verschiedener Integrine. PECAM-1 z. B. hat eine Größe von 130 kDa und P-selectin eine Größe von 140 kDa. ICAM-2, der einzige bekannte Bindungspartner von Moesin, der auch in Thrombozyten exprimiert wird ist mit einer Größe von 55-65 kDa deutlich kleiner. Auch Aktin, das bekannterweise an Moesin bindet, konnte im Eluat nachgewiesen werden (Abb. 1 B).

Abb. 1 A

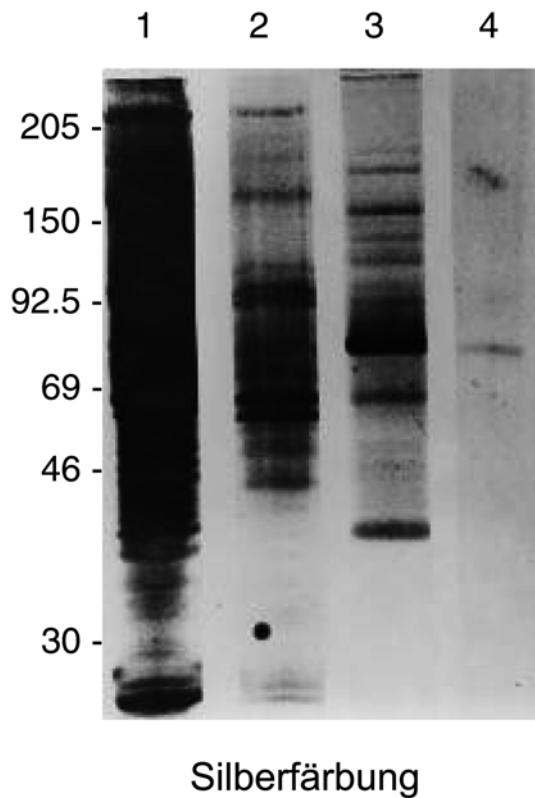


Abb. 1 B

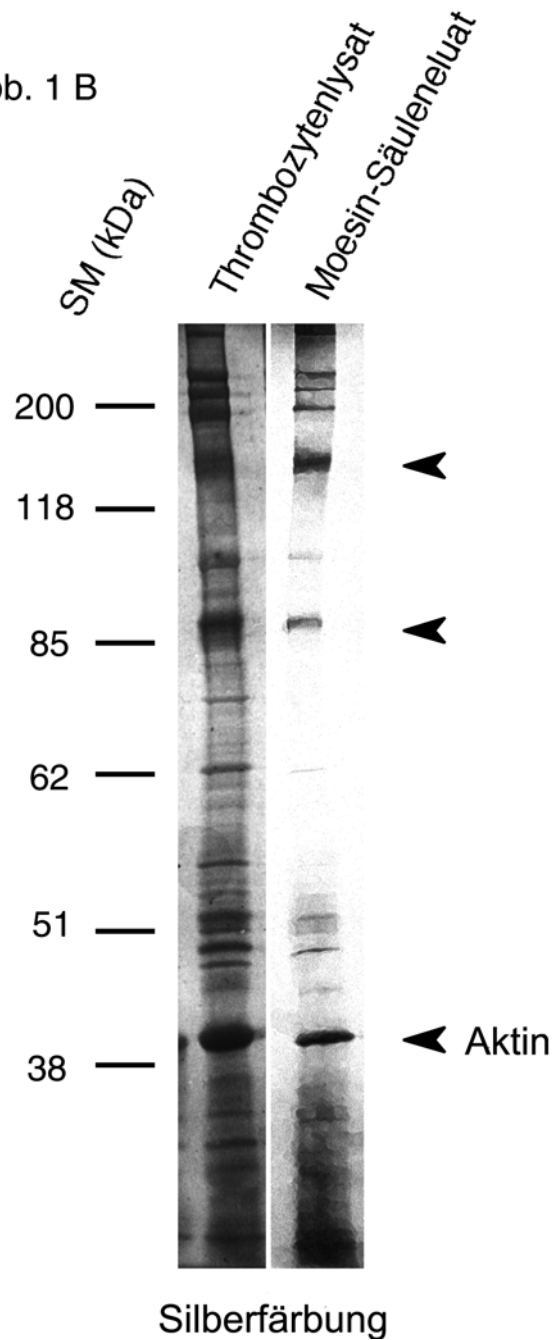


Abb. 1: Isoliertes Moesin bindet Proteine in der Größenordnung von 110-130 kDa aus Thrombozytenlysaten. A) Moesin wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, aus Thrombozytenlysaten isoliert und nach den jeweiligen Chromatographie-Schritten auf ein 8-25%iges Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt. Bahn 1: totales Thrombozytenlysate, Bahn 2: Proteine nach Hydroxyapatit-Chromatographie, Bahn 3: Proteine nach Q-Sepharose-Chromatographie, Bahn 4: reines Moesin nach Heparin-Sepharose-Chromatographie. B) Isoliertes Moesin wurde an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt und Proteine eines totalen Thrombozytenlysates aufgetragen. SDS-PAGE eines totalen Thrombozytenlysates (linke Bahn) und der nach Moesin-Säulen-Chromatographie eluierten Proteine (rechte Bahn). Die entsprechenden Molekulargewichte sind auf der linken Seite der Gele in kDa angegeben (SM – Standardmarker).

4.1.2. Aminosäuren-Sequenz Vergleich von PECAM-1 mit ICAM-1, -2, -3, CD43 und CD44

ERM Proteine interagieren mit integralen Membranproteinen durch eine Konsensussequenz in ihrer zellmembrannahen zytoplasmatischen Domäne, welche positiv geladene Aminosäure-Sequenzen beinhaltet wie Arginin und Lysin [46, 62]. In Abb. 2 wurden die ersten 20 Aminosäuren der zellmembrannahen zytoplasmatischen Domäne von PECAM-1 mit den bekannten Bindungspartnern der ERM Proteine verglichen, z. B. CD43, CD44, ICAM-1, -2, -3. Die Analyse zeigt, daß die zellmembrannahe zytoplasmatische Domäne von PECAM-1 eine positiv geladene Sequenz RKAKAK in den Positionen 599-604 enthält. Diese Domäne zeigt Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz, die an ERM -Proteine bindet.

CD43	(259-278)	RRRQKRR TGALVLS RRGGKRN
CD44	(651-670)	NS RRRCGQKKK LVINSGNGA
ICAM-1	(479-498)	NRQRKIKKY RLQQA QKG TPM
ICAM-2	(228-247)	QHLRQQRM GTYG VRAAWRRL
ICAM-3	(481-500)	REHQ RS GSYHV REESTYLPL
PECAM-1	(594-613)	KCYFLRKAKAK QMPVEMSRP

Abb. 2: Aminosäuresequenzen der zellmembrannahen zytoplasmatischen Domäne von humanem CD43, CD44, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 und PECAM-1. Die Sequenzen sind unter folgenden Zugangsnummern bei SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>) verfügbar: P16150, P16070, P05362, P13598, P32942 und P16284. Positiv geladene Aminosäurereste sind durch Fettschrift markiert.

4.1.3. PECAM-1 kolokalisiert mit Moesin in glasaktivierten Thrombozyten

Glasaktivierte Thrombozyten wurden methanol-fixiert und anschließend mit einem anti-PECAM-1- (Verdünnung 1:500), anti-P-Selectin- (Verdünnung 1:500) oder anti-Moesin- (Verdünnung 1:500) Antikörper gefärbt. Ein Teil der Thrombozyten wurde nach 5 Sekunden mit Hilfe von Methanol fixiert, ein anderer Teil nach etwa 10 Minuten (Abb. 3).

PECAM-1 ist auf der Membranoberfläche von Thrombozyten exprimiert und gehört ebenso wie ICAM-1, -2 und -3 zu den „cell adhesion molecules“. Es wird auf der Oberfläche zirkulierender Blutplättchen, Monozyten, Neutrophiler Granulozyten und einiger T-Zell-Untergruppen, sowie an den interzellulären Verbindungsflächen von Endothelzellen exprimiert [28; 29]. P-selectin (CD62p) wurde als Kontrollprotein verwendet. Es wird erst nach der Aktivierung von Thrombozyten aus Granula an die Zelloberfläche mobilisiert. Es vermittelt das Rollen der Thrombozyten auf Endothelzellen und ist an der thrombozytenvermittelten Bereitstellung von Lymphozyten beteiligt.

Abb. 3 A zeigt frisch und ca. 10 min an Glas adhärierte Thrombozyten in einer Doppelfärbung gegen Moesin und PECAM-1. Bereits in den nur für Sekunden adhärierten Thrombozyten ist Moesin an die Zellperipherie verteilt, ebenso PECAM-1. Nach 10 min haben die Thrombozyten Zellausläufer wie Filopodien und Lamellipodien ausgebildet. Moesin sowie PECAM-1 sind an der Zellmembran sowie besonders in den Filo- und Lamellipodien kolokalisiert, mit einer Anreicherung dieser Proteine in den Spitzen der Filopodien. Eine Anreicherung von Moesin in Filopodienspitzen wurde bereits von Nakamura et al. [42] beschrieben. Das Verteilungsmuster von PECAM-1 entspricht sowohl räumlich als auch zeitlich dem des Moesins.

Abb. 3 B zeigt für 5 Sekunden und ca. 10 min an Glas adhärierte Thrombozyten in einer Doppelfärbung gegen Moesin und P-Selectin. In dieser Färbung ist zu erkennen, daß P-Selectin in den ersten 5 Sekunden noch intrazellulär in Granula gespeichert ist, während Moesin schon an der Zellmembran angereichert ist.

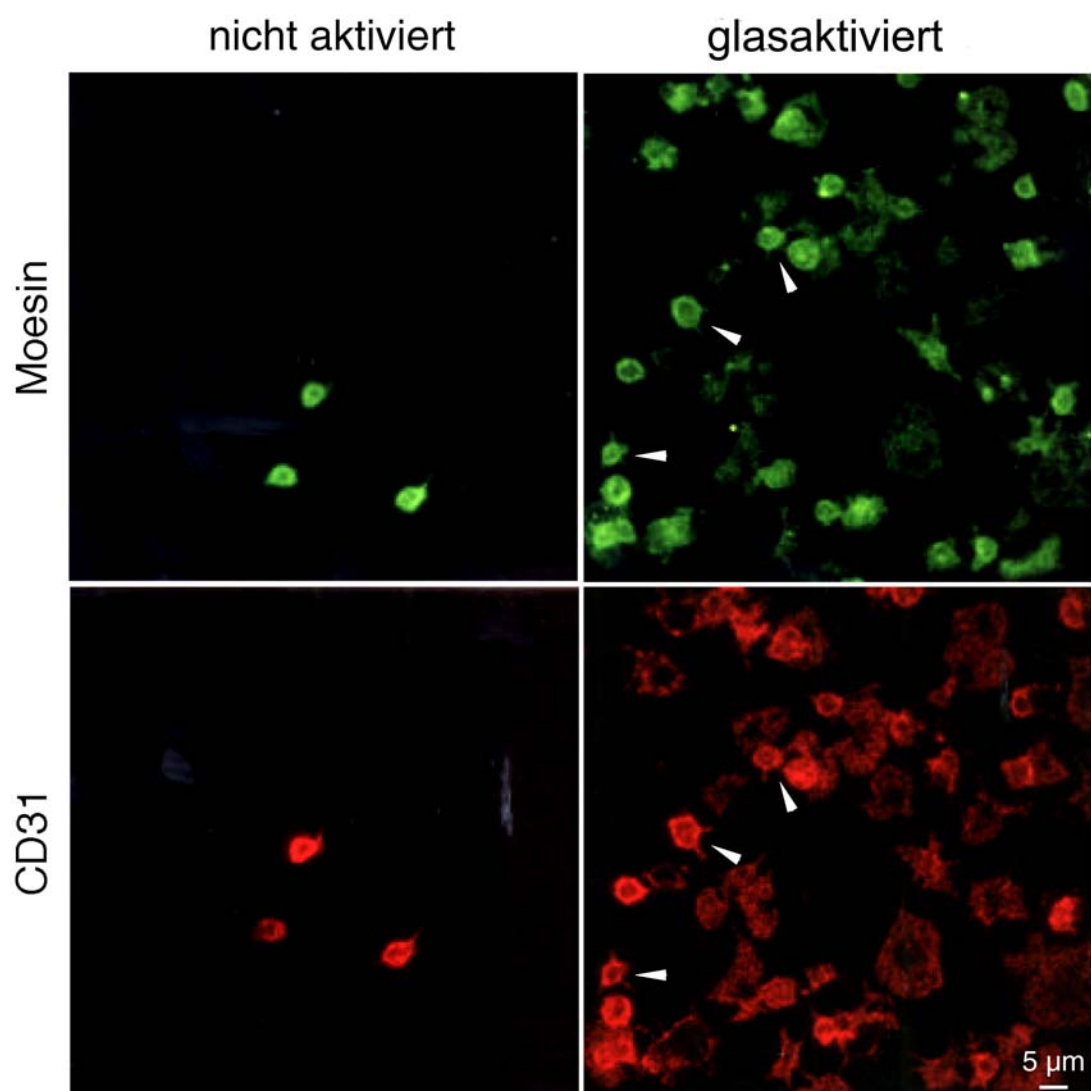


Abb. 3 A: Kolokalisation von Moesin und PECAM-1 in glasaktivierten Thrombozyten. Humane Thrombozyten wurden nach 5 Sekunden (nicht aktiviert) und nach 10 Minuten (glasaktiviert) mit Methanol fixiert und gegen Moesin (grün) und PECAM-1 (rot) doppelgefärbt. Nach 10 Minuten haben die Thrombozyten Zytoplasmaausläufer wie Filopodien und Lamellipodien ausgebildet. Moesin sowie PECAM-1 sind an der Zellmembran und besonders in den Filo- und Lamellipodien kolokalisiert, mit einer Anreicherung dieser Proteine in den Spitzen der Filopodien (siehe Pfeile).

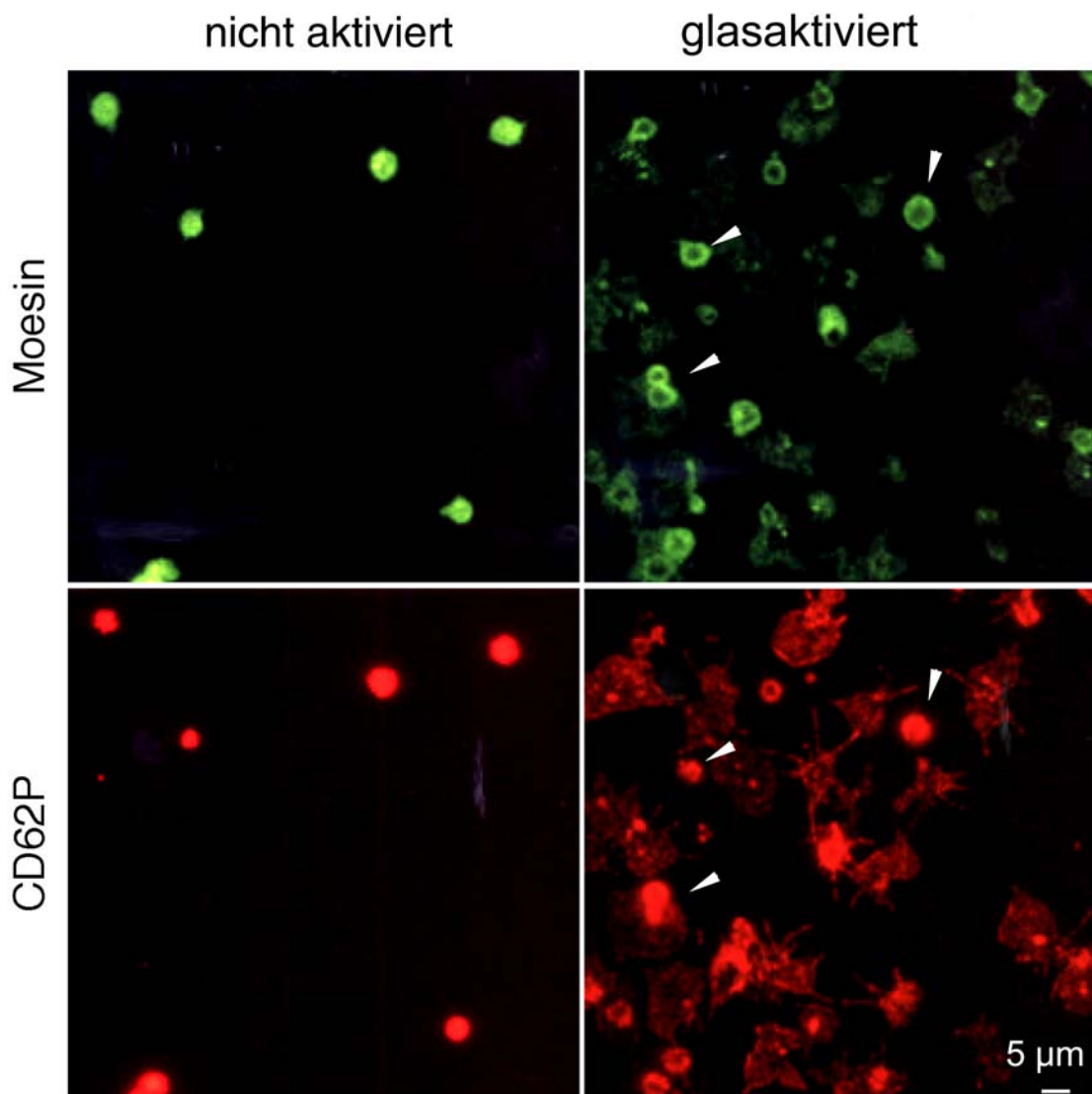


Abb. 3 B: Kolokalisation von Moesin und P-Selectin in glasaktivierten Thrombozyten. Humane Thrombozyten wurden nach 5 Sekunden (nicht aktiviert) und nach 10 Minuten (glasaktiviert) mit Methanol fixiert und gegen Moesin (grün) und P-Selectin (rot) doppelgefärbt. P-Selectin zeigt nach 10 Minuten langer Adhäsion der Thrombozyten ein zu Moesin verschiedenes Färbeverhalten (siehe Pfeile).

4.1.4. Moesin ist in thrombinaktivierten Thrombozyten mit PECAM-1 assoziiert

Um festzustellen, ob PECAM-1 in Thrombozyten mit Moesin assoziiert ist, wurde PECAM-1 aus Lysaten von ruhenden und thrombinaktivierten Thrombozyten immunpräzipitiert. Abb. 4 zeigt, daß Moesin in thrombinaktivierten aber nicht ruhenden Thrombozyten mit PECAM-1 koimmunpräzipitiert. Durch Rühren induzierte Aggregation hatte keinen Einfluß auf die Intensität der Moesin Bande. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Assoziation zwischen Moesin und PECAM-1 unabhängig von der Thrombozytenaggregation ist.

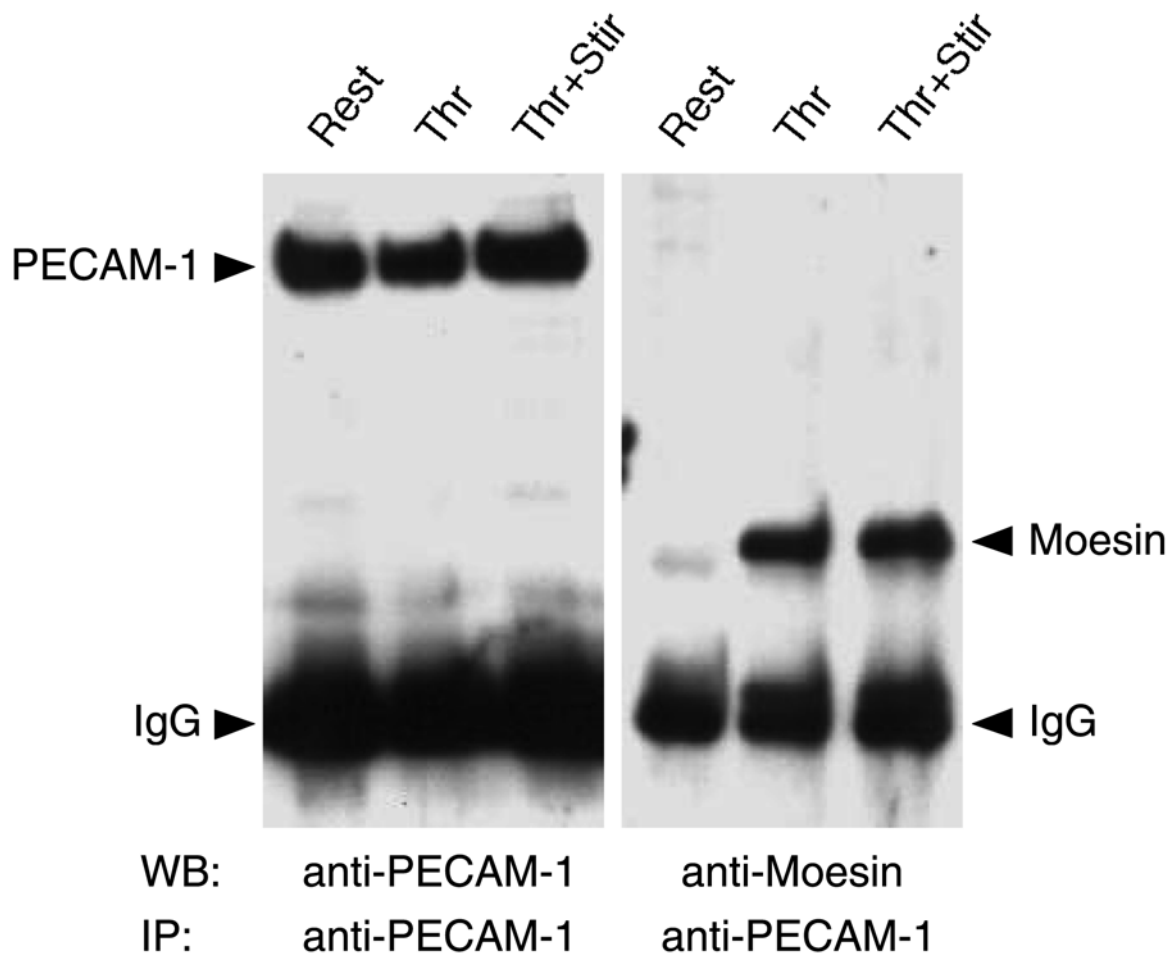


Abb. 4: Assoziation von Moesin und PECAM-1 in thrombinstimulierten Thrombozyten. Isolierte humane Thrombozyten wurden für 3 Minuten bei 37 °C in Lösung mit 1 U/ml Thrombin stimuliert (Thr). Die Aggregation wurde durch zusätzliches Rühren induziert (Thr+Stir). Die Blutplättchen wurden durch Zugabe von einem Nonidet P-40 enthaltendem Puffer lysiert. PECAM-1 wurde immunpräzipitiert und die Immunkomplexe durch die SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine Immobilon-P Membran transferiert und mit anti-PECAM-1 bzw. anti-Moesin Antikörpern geblotet.

4.1.5. Formation von „Adhäsionsknöpfen“ in Glas aktivierten Thrombozyten

Da Moesin und PECAM-1 besonders an den Spitzen der Filopodien kolokalisieren, untersuchten wir die Form glasaktivierter Thrombozyten mittels Rasterelektronenmikroskopie. Die Abb. 5 zeigt Thrombozyten, die 10 min lang an Glas adhäreren. An den Spitzen einiger Filopodien finden sich kleine, flache, rundliche Strukturen (siehe Pfeile).

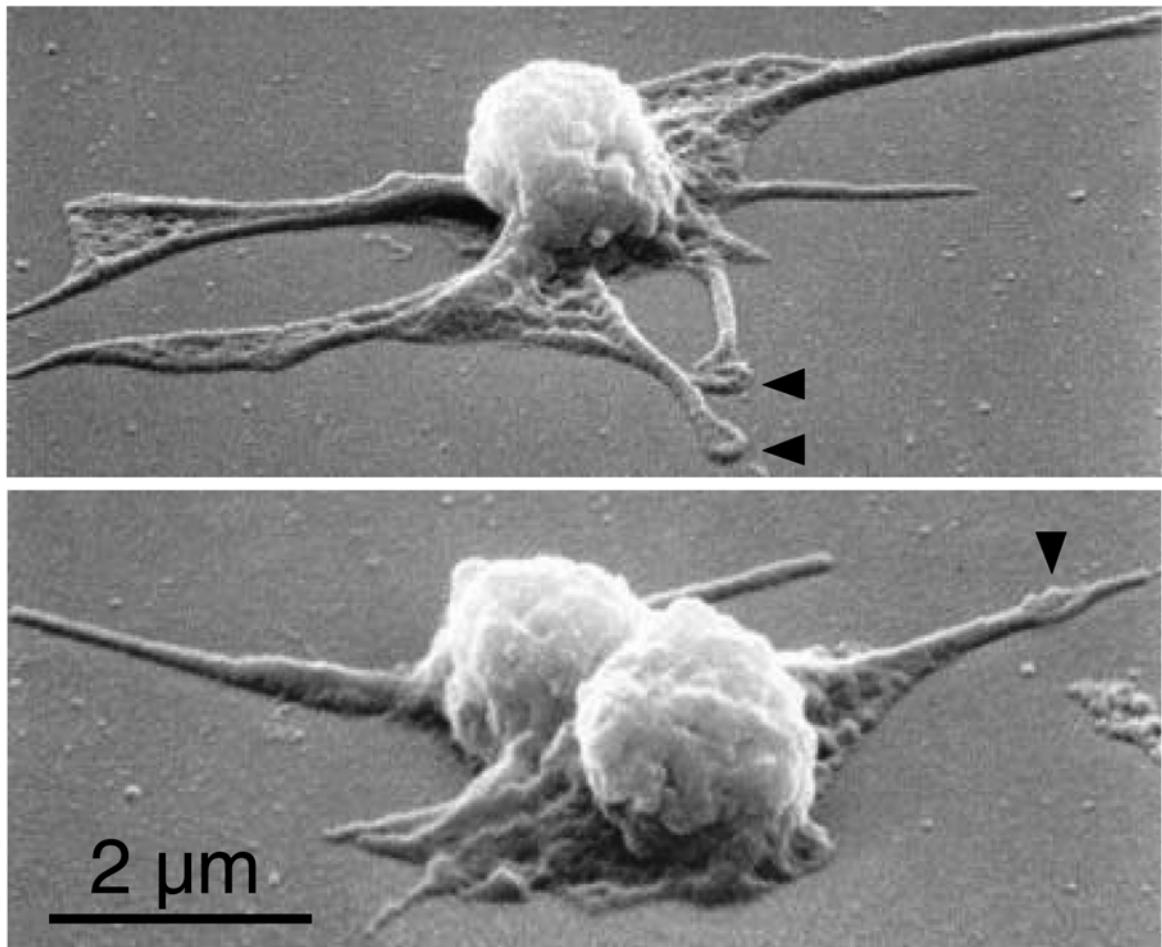


Abb. 5: Formation von „Adhäsionsknöpfen“ in glasstimulierten Thrombozyten. Thrombozyten wurden durch 10 Minuten Sedimentation bei 37 °C auf Glas stimuliert, mit Methanol fixiert, mit Gold bedampft und mit einem Rasterelektronenmikroskop fotografiert.

4.2. Reexpression von Moesin in der Neointima und Media in Arterien nach Ballon-Angioplastie. Moesin als möglicher Marker für die Migration von glatten Muskelzellen *in vivo*?

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Moesin in Myofibroblasten der Restenose nach Ballondilatation der Arterien reexprimiert wird.

Migrierende Zellen der Restenose, wie Myofibroblasten ändern ihre Zellmorphologie vom ruhenden Zelltyp, fixiert in einem Zellverband wie der arteriellen Media, zu einem Phänotyp mit Zellausläufern wie Filopodien und Lamellae. Diese Zellveränderungen gehen einher mit einer Umwandlung des Zytoskeletts. Moesin ist ein zytoskelettassoziiertes Protein, welches das Zytoskelett mit der Zellmembran verbindet. Moesin wird *in vivo* nicht in glatten Muskelzellen exprimiert. Im Sonderfall der Restenose der Arterien nach einer Angioplastie entdifferenzieren glatte Muskelzellen zu einem neuen Phänotyp. Diese Zellen proliferieren und migrieren erneut und haben einen invasiven Charakter.

4.2.1. Moesin wird *in vivo* in der Media und Neointima dilatierter Arterien reexprimiert

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob Moesin im Rahmen der Restenose reexprimiert wird. Dazu wurde das Gewebe aus zwei Tiermodellen immunhistologischen Untersuchungen zugeführt. Es wurde ein Kurzzeit-Schweine-Restenose-Modell verwendet, bei dem dilatiertes Femoralarteriengewebe 2 Stunden nach der PTA entnommen wurde. Zweitens wurde ein Langzeit-Ratten-Restenose-Modell verwendet, bei dem dilatiertes Ratten-Karotiden-Gewebe 14 Tage nach der PTA entnommen wurde. In beiden Modellen wurde ein einzeltiger Ansatz gewählt. Bei diesem Ansatz wird durch die PTA eine Dilatationsläsion innerhalb gesunder Arterien gesetzt.

Abb. 6 zeigt immunhistologische Färbungen des Schweinegewebes unter Verwendung von einem anti-Moesin-Antikörper in der Verdünnung 1:500. Die Kontrollarterie zeigt, wie erwartet, keine Moesinexpression im Bereich der Media. Zwei Stunden nach der PTA zeigen vereinzelte Zellen der Media eine Moesinexpression. Abb. 6 + PTA zeigt die stärkere Vergrößerung der Adventitia einer immunhistologisch gefärbten Schweinearterie nach PTA. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (Stammlösung 1 mg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml) gegengefärbt.

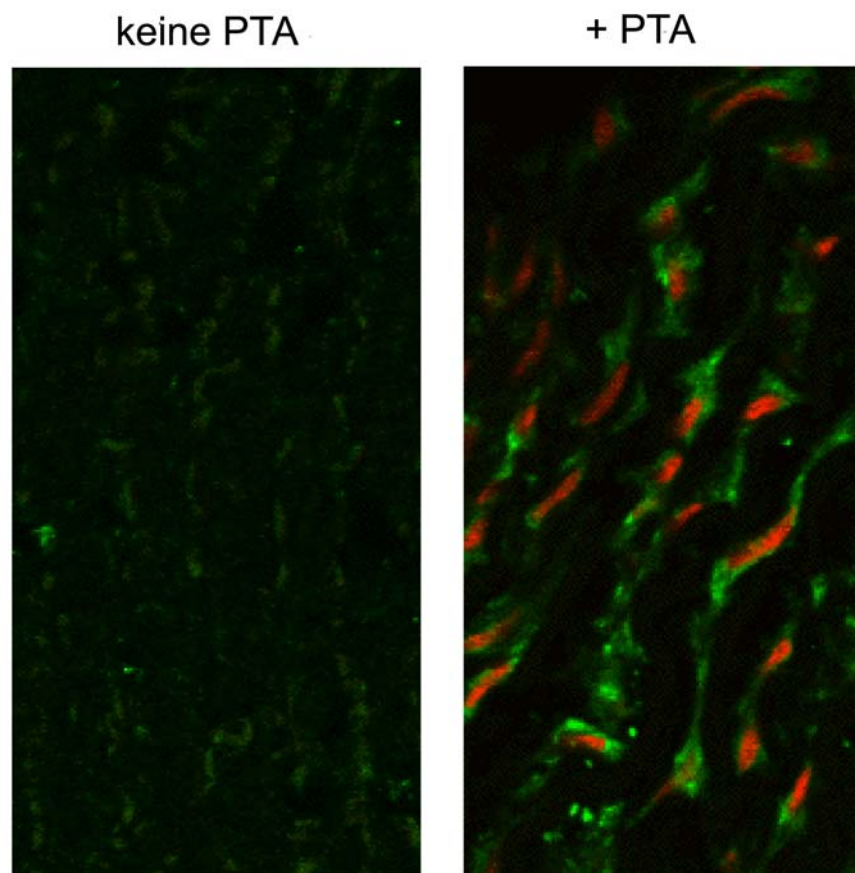


Abb. 6: Moesin wird bereits Stunden nach einer PTA in Zellen der Arterienmedia reexprimiert. Schweinefemoralarterien wurden zwei Stunden nach einer PTA entnommen, mit Paraformaldehyd fixiert und unter Verwendung eines anti-Moesin Antikörpers immunhistologisch gefärbt. Eine Moesinfärbung zeigt sich nur im dilatierten Mediagewebe. Die Kontrollarterie zeigt wie erwartet keine Moesinexpression (keine PTA). Die Zellkerne des Gewebes nach PTA wurden mit Propidiumjodid gegengefärbt (+ PTA).

Abb. 7 zeigt die immunhistologisch gefärbten Rattenkarotidengewebe sowie ein natives Bild der Restenose. Abb. 7 A zeigt die Kontrollarterie, wie erwartet exprimieren nur Endothelzellen Moesin (weißer Pfeil). Abb. 7 B zeigt eine Carotis 14 Tage nach PTA. Hier wölbt sich das restenotische Gewebe ins Gefäßlumen vor, und in der Media sind moesinexprimierende Zellen zu finden. Das Endothelzelllayer ist aufgrund der durch die PTA gesetzten Läsion nicht mehr vorhanden. Abb. 7 C zeigt das native Bild einer Restenose. Moesin konnte somit auch nach längerer postinvasiver Zeit nachgewiesen werden.

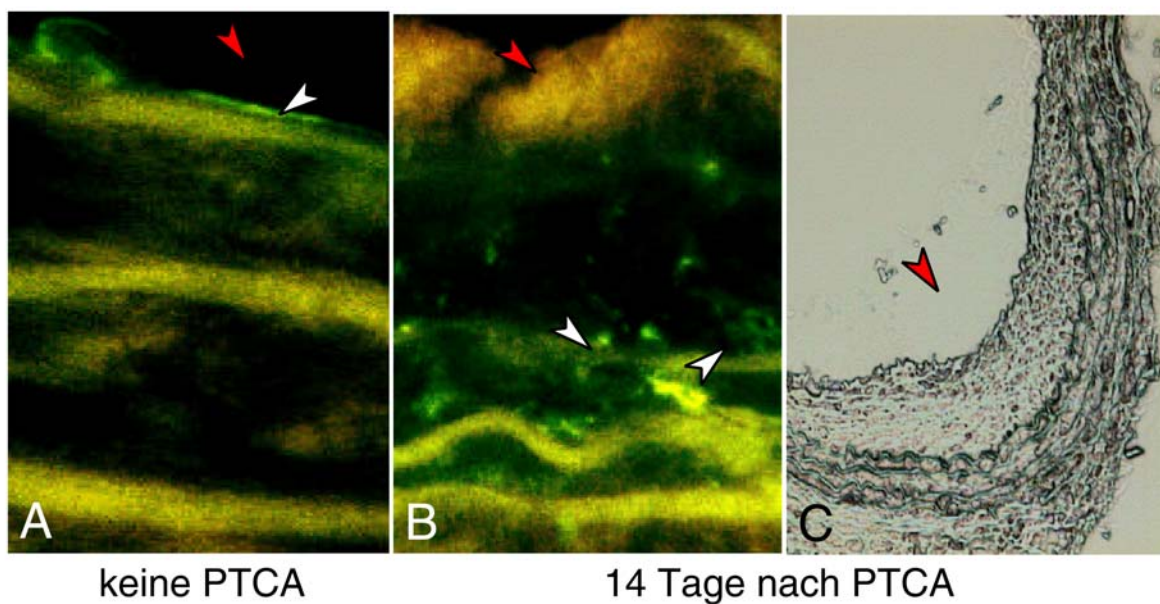


Abb. 7: Moesin wird auch 14 Tage nach einer PTA in der Media-Restenose exprimiert. Rattenkarotidengewebe wurde 14 Tage nach einer PTA entnommen, mit Paraformaldehyd fixiert und mit einem anti-Moesin-Antikörper eine immunhistologische Färbung durchgeführt. A) zeigt die Kontrollarterie. Wie erwartet exprimieren nur Endothelzellen Moesin (weißer Pfeil). B) zeigt eine Karotisarterie 14 Tage nach der PTA. Hier wölbt sich das restenotische Gewebe in das Gefäßlumen vor und in der Media sind moesinexprimierende Zellen zu finden (weiße Pfeile). C) zeigt das native Bild einer Restenose. Die Neointima wölbt sich in das Gefäßlumen vor. Der rote Pfeil deutet die Lumenseite der Arterie an.

Abb. 8 A zeigt die Spezifität des anti-Moesin-Antikörpers (Verdünnung 1:500) in einem glatten Muskelzellsat. Abb. 8 B zeigt immunhistologische Färbungen von Glatten Muskelzellen gegen Moesin (oben) und gegen glattes Muskelzellaktin (smooth muscle cell actin, SMA, Verdünnung 1:200), wo Moesin vor allem in den Zellausläufern angereichert ist. Zum Teil zeigt Moesin auch eine mehr granuläre Verteilung, vor allem im Bereich der „stress fibers“.

Abb. 8 A



Abb. 8 B

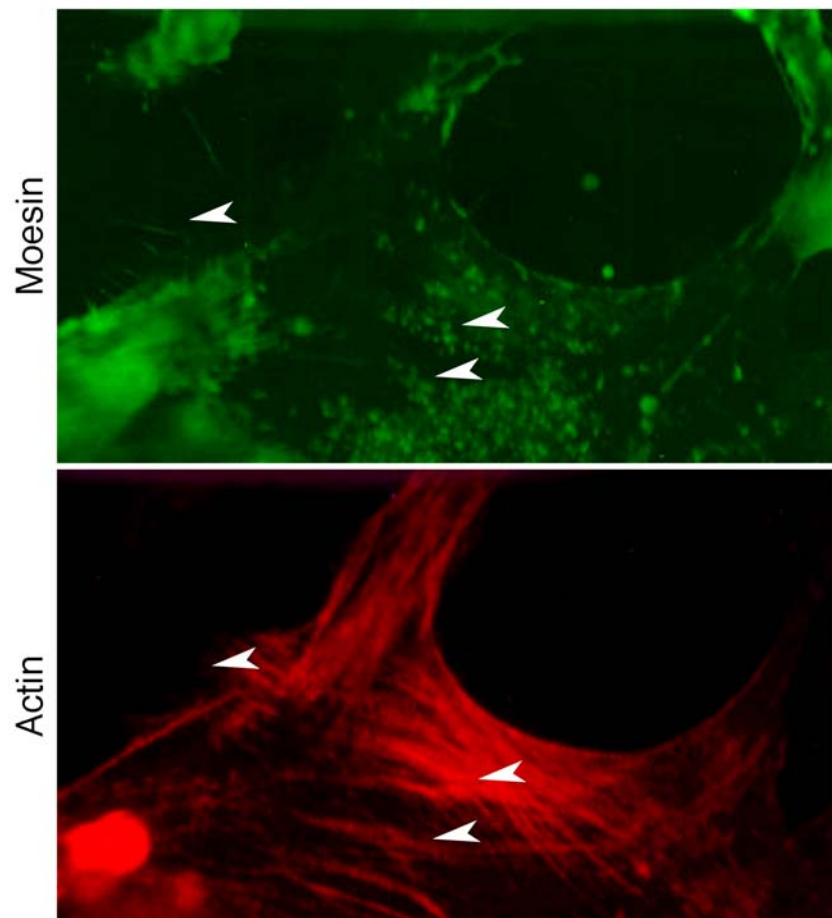


Abb. 8: Moesin ist im Bereich von „stress fibers“ und in Filopodien isolierter glatter Muskelzellen lokalisiert. A) Die Spezifität des anti-Moesin-Antikörpers in einem glatten Muskelzellsat (linke Bahn: h SMC). B) Immunhistologische Doppelfärbungen von isolierten glatten Muskelzellen gegen Moesin (oben) und gegen glattes Muskelzellaktin (SMA, unten). Moesin ist in den Zellausläufern und den sogenannten „stress fibers“ angereichert.

„Stress fibers“ sind spezifizierte Aktinfaserbündel, die mit den sogenannten „focal adhesions“ assoziiert sind. Dies sind spezifizierte Gebilde aus verschiedenen Proteinen in der Zellmembran, die die Zelladhäsion an die Extrazellulärmatrix vermitteln. Abb. 8 C zeigt die immunhistologische Doppelfärbung gegen Moesin (Verdünnung 1:500) und Vinculin (Verdünnung 1:200) in glatten Muskelzellen. Vinculin ist ein Protein das in „focal adhesions“ vorkommt und somit als „Marker“ verwendet wird. Moesin ist auch hier in Zellprotrusionen angereichert. Die Doppelfärbung zeigt, daß Moesin an diese „focal adhesions“ angrenzt.

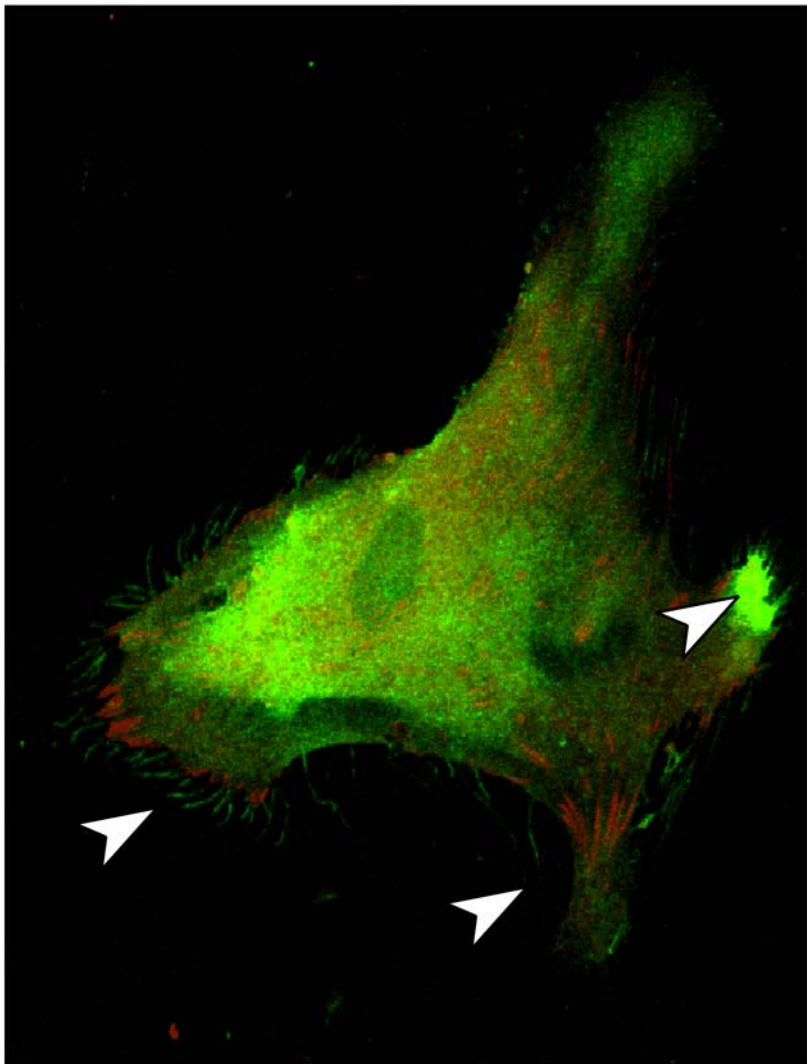


Abb. 8 C: Moesin ist in Filopodien isolierter glatter Muskelzellen und grenzt direkt an „focal adhesion sites“ an. Immunhistologische Doppelfärbung gegen Moesin (grün) und Vinculin (rot) in einer isolierten glatten Muskelzelle. Moesin ist in Zellprotrusionen, vor allem in Filopodien angereichert (siehe Pfeile) und grenzt direkt an „focal adhesion sites“ an.

5. DISKUSSION

5.1. Methoden-Diskussion

Um einen ersten Hinweis auf mögliche Bindungspartner von Moesin in Thrombozyten zu erlangen, isolierten wir Moesin aus humaner Plazenta. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß im Vergleich zur Herstellung rekombinanten Moesins in Bakterien nur relativ geringe Mengen des Proteins erhalten werden. Zusätzlich muß die gesamte Isolation bei 4 °C durchgeführt werden, da Moesin ein relativ instabiles Protein ist, das bei Raumtemperatur rasch degradiert. Allerdings werden manche Polypeptidketten in Prokaryonten nach der Translation auf eine andere Art und Weise modifiziert als in eukaryonten, also auch humanen Zellen. Ein Vorteil der Isolation von Moesin aus humaner Plazenta könnte also sein, daß hierdurch eukaryont modifiziertes Moesin gewonnen wird, welches sich z. B. in seinem Bindungsverhalten von dem rekombinant gewonnenen unterscheiden könnte.

Die Thrombozyten für jeden Versuchsansatz mußten unmittelbar vor dessen Beginn frisch isoliert werden. Die Verwendung von Thrombozyten aus kommerziell hergestellten Thrombozytenkonzentraten lieferte in den Western Blots und Färbungen nur unzufriedenstellende Ergebnisse. Diese Thrombozyten erwiesen sich als zu „gestresst“, waren zum Teil schon vor Beginn der Versuche aktiviert oder zerstört. So wurde für jeden Versuchsansatz gesunden Probanden, die seit mindestens zwei Wochen keine prostacyclinsynthesehemmenden Medikamente eingenommen hatten, jeweils erneut Blut abgenommen und die Thrombozyten isoliert. Diese Thrombozyten konnten nach einer „Ruhephase“ von 30 min bei 37 °C im Inkubator für die Versuche verwendet und ggf. aktiviert werden.

Der entscheidende Schritt bei Bindungsstudien ist das Auswaschen nicht gebundener Proteine aus dem Bindungsmedium, z.B. hier der Sepharose. Ein zu starker Waschpuffer entfernt alle Proteine, ein zu schwacher kann Proteine, die nur unspezifisch gebunden sind, nicht auswaschen. Ein erster Hinweis auf mögliche Bindungspartner lieferten die Ergebnisse aus 4.1.1., die Bindung von Proteinen aus Thrombozytenlysat an isoliertes Moesin. Dies ist jedoch ein recht unspezifisches Verfahren, bei dem es vor allem auf die Bindungsstärke zwischen Moesin und dem potentiellen Bindungspartner ankommt. Spezifisch hingegen ist die Bindung eines Antikörpers an das Protein, gegen das er gerichtet ist, so daß neben den

immunhistochemischen Darstellungen der Kolo-kalisation von Moesin und PECAM-1, letztendlich die Koimmunpräzipitation von Moesin und PECAM-1 den Nachweis einer Interaktion dieser Proteine erbrachte.

Der Moesin-Antikörper, der bei den hier durchgeführten Versuchen zur Anwendung kam, ist ein gegen menschliches Moesin gerichteter Antikörper. Da Moesin jedoch ein hochkonserviertes Protein ist, konnte dieser Antikörper auch bei den immunhistochemischen Färbungen der Ratten- und Schweinearterien verwendet werden. Dies wurde durch einen Vergleich von tierischem und humanem Material im Western-Blot gezeigt.

Als ein Problem bei dem verwendeten Kryogewebe stellte sich der Transport heraus, durch den die Gewebestückchen zum Teil deutlich beschädigt wurden, da eine ausreichende Kühlung nicht immer gewährleistet war. Zudem sind die Gefäße von Ratten und Kaninchen sehr klein, was die Handhabung, z. B. die Herstellung von Kryoschnitten erschwert. Einen deutlichen Vorteil bieten hier die Schweinearterien, die zudem in ihrer Reaktion auf eine Gefäßverletzung, wie durch eine Ballondilatation, humanen Gefäßen ähnlicher sind als die Ratten- oder Kaninchenarterien.

Zur Identifizierung eines Bindungspartners von Moesin in Thrombozyten wurden immunhistochemische Experimente durchgeführt. Diese sind sehr gut geeignet, einzelne Aspekte aus einer Kaskade von Ereignissen, z. B. die Aktivierung von Thrombozyten und in diesem Rahmen die Bindung von Moesin an ein Integrin der Zellmembran, herauszugreifen. Ein solcher Ansatz kann aber nie der Komplexität eines Vorgangs wie einer Zellaktivierung oder der Entstehung einer Restenose nach einer Koronarangioplastie gerecht werden.

Ein nächster Schritt waren die Untersuchungen an den isolierten Thrombozyten und glatten Muskelzellen in der Zellkultur, um die Lokalisation und Umstrukturierung verschiedener Proteine in der Zelle, z. B. während der Aktivierung von Thrombozyten oder der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen darzustellen.

Um die komplexen Vorgänge bei der Restenoseentstehung zu durchleuchten, benutzten wir neben den *in vitro* Modellen Tiermodelle. Solche Tiermodelle existieren z. B. mit Ratten, Kaninchen und Schweinen. Es gibt ein- und zweizeitige Ansätze. Bei den einzeitigen Modellen wird die zu untersuchende Arterie ballondilatiert und die Tiere werden zu

festgesetzten Zeitpunkten getötet (z. B. nach 1 Tag, nach 10 Tagen usw.). Anschließend werden die Gefäße untersucht. Beim zweizeitigen Ansatz versucht man die pathophysiologischen Vorgänge genauer nachzuahmen und zunächst atherosklerotisch veränderte Arterien zu erzeugen. Hierzu wird ein gesundes Gefäß mittels Ballondilatation verletzt. Die Tiere werden dann mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert. Zu einem zweiten Zeitpunkt wird erneut eine Ballondilatation derselben (nun atherosklerotisch veränderten) Arterie durchgeführt. Dann werden auch diese Tiere zu festgesetzten Zeitpunkten getötet und die Gefäße untersucht [9].

Leider wird jedoch auch der zweizeitige Ansatz der Komplexität des Geschehens bei der Entstehung der Atherosklerose und später der Entstehung der Restenose bei weitem nicht gerecht, so daß die an Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse nur sehr begrenzt auf die Verhältnisse beim Menschen übertragbar sind. Dies hat sich auch für die meisten der in 5.2. genannten Substanzen gezeigt. Weitere Störfaktoren für die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen sind die Verwendung von gesunden statt atherosklerotisch veränderten Gefäßen, die unterschiedliche Schwere der Gefäßverletzung, unterschiedliche Heilungsprozesse bei verschiedenen Tierarten, intrinsische Unterschiede des Medikamenten- und Lipoproteinmetabolismus und der Aktivität des fibrinolytischen Systems. Zusätzlich zu berücksichtigen sind die, im Vergleich zu humanem Material, zum Teil massiv abweichende Größe der verwendeten Gefäße sowie in klinischen Versuchen die deutlich geringeren Medikamenten-Dosierungen [4].

Auch in dieser Arbeit wurden neben der Zellkultur ein Ratten- und ein Schweine-Tiermodell verwendet. Das Ratten-Tiermodell ist das einfachste und am besten untersuchte Modell zur Untersuchung der reinen glatten Muskelzellproliferation [4]. Vorgänge wie die Extrazellulärmatrixproduktion oder das allgemeine Schrumpfen der Gefäßadventitia, dem viele Autoren [17, 18, 62, 63] eine große Bedeutung bei der Entstehung der Restenose zumessen, werden von diesem Modell nicht erfaßt. Am einfachsten durchführbar und histologisch mit dem Menschen am besten vergleichbar ist das Tiermodell an Schweinekoronararterien [4], so daß für weitere Untersuchungen eine Weiterentwicklung des hier verwendeten Modells an Schweinefemoralarterien wünschenswert wäre. Letzten Endes können die Ergebnisse aus solchen Modellen aber erst im Rahmen von klinischen Studien an Menschen in ihrer Aussage und Wirksamkeit für den Menschen überprüft werden.

5.2. Therapieansätze zur Vermeidung einer Restenose

Bis dato wurden zahlreiche Substanzen zur Verhinderung der Restenoseentwicklung mit mäßigem Erfolg erprobt. Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über bisher bei systemischer Gabe erprobte Substanzen.

Wirkstoffgruppe	Wirkstoffe	Wirkung
Antithrombotische Substanzen	Acetylsalixylsäure, Coumadin, Sulotroban, Dipyridamol, Ticlopidin, Throboxan A2, Prostacyclin und Analoga, Heparine, Hirudin, c7E3 (monoklonaler Antikörper gegen GP IIb/IIIa)	niedermolekulares Heparin wirkt in vitro antiproliferativ, Hirudin verhindert Thromboseentstehung, Senkung der Inzidenz akuter Gefäßverschlüsse, kein signifikanter Einfluß auf die Restenoseentstehung (bis auf c7E3)
Antiproliferative Substanzen	Colchizin, Trapidil, Tranilast, Angiopeptin	signifikante Senkung der Restenoserate in wenigen Studien mit geringen Patientenzahlen
Antiinflammatorische Wirkstoffe	Kortikosteroide, Cyclosporin A	Kortikosteroide: entzündungshemmend, Inhibition der glatten Muskelzellproliferation, nur in vitro, klinische Studien erfolglos Cyclosporin A: Hemmung der T-Lymphozytenaktivierung, in Ratten Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen und der Produktion von Extrazellulärmatrix, klinische Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen
Zyto-toxische Substanzen	Aktinomycin, Vincristin	Zerstörung proliferierender glatter Muskelzellen, Tierversuch an Ratten erfolgreich

Lipid-senkende Wirkstoffe	HMG-CoA Reduktase Inhibitoren, Omega-3-Fettsäuren	HMG-CoA Reduktase Inhibitoren: verbessern die Endothelfunktion hypercholesterinämischer Patienten, verringern die Thrombozyten- und Erythrozytenaggregation, hemmen im Tierversuch die glatte Muskelzell -Proliferation, keine signifikante Wirkung in klinischen Studien. Omega-3-Fettsäuren: senken die Membran-Arachidonsäure und den Thromboxan A2-Spiegel, hemmen die Thrombozytenaggregation, wirken antiinflammatorisch, hemmen im Tierversuch die Neointimaproliferation
Weitere Wirkstoffe	ACE-Hemmer, Kalzium-Kanal Antagonisten, NO-Donoren, Inhibitoren der Extrazellulär-matrix (Tranilast, beta-D-xylosid), TGF-beta	ACE-Hemmer: Gefäßverletzung führt zu lokaler Angiotensin II-Freisetzung und so zur ACE-Induktion, keine Wirkung in klinischen Studien. Kalzium-Kanal-Antagonisten: es bestehen Anhaltspunkte für die Unterdrückung einer neointimalen Proliferation und Plättchenaggregation Weitere Möglichkeit: indirekte Inhibition der Extrazellulärmatrix-Synthese mit TGF-β

Tab. I: Nach Forrester et al., 1991; Chesebro et al., 1991; Ellis et al., 1991; Batchelor et al., 1998; Topol et al., 1994; Lefkovits und Topol, 1997 [10, 11, 15, 19, 64, 65, 66]

Im letzten Jahrzehnt hat sich die primäre Stentimplantation als Standardbehandlung in der Angioplastie immer mehr durchgesetzt. Zum einen liegt der Vorteil der primären Stentimplantation darin, daß hierdurch ein akuter oder subakuter Gefäßverschluß verhindert werden kann, zum anderen führt die primäre Stentimplantation im Vergleich zur reinen Ballondilatation zu besseren Langzeitergebnissen [67, 68, 69, 70].

Ein erster Ansatz, therapeutisch über die rein mechanischen Wirkungen der Stentimplantation hinauszugehen, war die Verwendung von radioaktiven Stents [71, 72]. Ein inhibitorischer Effekt der Radioaktivität auf die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Bildung einer

Neointima konnte bei diesen Stents nachgewiesen werden. Jedoch kam es gehäuft zur Restenose an den Enden dieser Stents, dem „candy wrapper“ Phänomen [73].

Eine relativ neue Entwicklung besteht darin, therapeutische Substanzen durch beschichtete Stents direkt an den Ort des Geschehens zu bringen. In Frage kommende Substanzen sind folgende:

1. Antineoplastische Substanzen: Paclitaxel (Taxol®), Taxol derivativ (QP-2), Actinomycin D, Vincristin
2. Antithrombotische Substanzen: Hirudin und Iloprost, Heparin
3. Immunsuppressiva: Sirolimus (Rapamycin®), Tranilast, Dexamethason, Tacrolimus (FK 506)
4. Kollagensynthetase-Inhibitoren: Halofuginon, Propylhydroxylase, C-Proteinase-Inhibitor, Metalloproteinase-Inhibitor
5. Angiopeptin V
6. VEGF

Die erfolgversprechendste Substanz ist zur Zeit Rapamycin, eine Substanz, die bisher zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung bei Nierentransplantaten verwendet wird und die die Progression von G1 zu S im Zellzyklus blockiert. Erste klinische Studien [74, 75] wurden mit guten Ergebnissen durchgeführt. Noch nicht abgeschlossen ist eine große Multicenterstudie in den USA, die 1100 Patienten umfassen wird.

Neue therapeutische Ansätze könnten aus dem besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge während der Restenoseentstehung erwachsen.

5.3. Ergebnis-Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Interaktion des ERM-Proteins Moesin mit dem Adhäsions-Molekül PECAM-1 in aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten untersucht. Die Funktion der immunglobulinähnlichen Adhäsionsrezeptoren (cell adesion molecules) in Thrombozyten ist weitgehend unbekannt. PECAM-1 scheint eine Rolle bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel oder an membranständige Glykosaminoglykane in Leukozyten zu spielen [76]. Den ersten Anhaltspunkt für einen

Bindungspartner mit einem Molekulargewicht von 110-130 kDa zeigt die direkte Immunpräzipitation mit Hilfe von an CNBr-Sepharose gebundenem isoliertem Moesin aus dem totalen Thrombozytenlysat (Abb. 1). Die an Moesin gebundenen und anschließend eluierten Proteine hatten ein Molekulargewicht von ungefähr 110-130 kDa, das dem Molekulargewicht verschiedener Integrine entspricht. PECAM-1 hat ein Molekulargewicht von 130 kDa und besitzt des Weiteren ein „Cluster“ von positiv geladenen Aminosäuresequenzen in den Positionen 599-604 (RKAKAK). Dies ähnelt den Konsensus-Sequenzen für ERM-Proteinbindungen, wie sie für CD 43, CD44 und ICAM-2 bereits gefunden und beschrieben wurden (Abb. 2) [46].

Hierauf wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation verschiedener Proteine während der Thrombozytenaktivierung durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, daß PECAM-1 wie auch Moesin nach der Glasaktivierung von Thrombozyten an der Zellperipherie und vor allem in Filopodien lokalisiert ist (Abb. 3). Wir und andere Gruppen konnten in früheren Untersuchungen bereits zeigen, daß Moesin in thrombinaktivierten Thrombozyten in Lösung [77] (und A. Gamulesku, unveröffentlichte Daten) und auch nach Glasaktivierung [42] an die Zellperipherie lokalisiert. Eine weitere Beobachtung stellte die Akkumulation von Moesin in den Spitzen von Filopodien dar, mit denen Zellen einen Kontakt zum Substrat, z.B. der Glasoberfläche, herstellen [42] (und Abb. 3). PECAM-1 kolokalisiert in diesen Filopodien-Spitzen mit Moesin (Abb. 3). Obwohl die Relokalisation von Moesin an die Zellperipherie nach der Aktivierung von Thrombozyten bereits lange bekannt war, war bisher kein Bindungspartner für Moesin in der Zellmembran von Thrombozyten gefunden worden. Unsere Untersuchungen ließen eine Assoziation von Moesin und PECAM-1 vermuten. Diese Assoziation konnte dann mit Hilfe der Moesin-Immunpräzipitation mit PECAM-1 ausschließlich in thrombinaktivierten Plättchen nachgewiesen werden (Abb. 4). Allerdings gelang kein Nachweis der Immunpräzipitation in ruhenden Thrombozyten (Abb. 4). Diese Untersuchungen belegen, daß Moesin erst nach der Aktivierung der Thrombozyten an PECAM-1 bindet und somit eine Rolle während Thrombozytenaktivierung spielt.

Die Interaktion von Moesin und PECAM-1 deutet darauf hin, daß Moesin insbesondere bei der Adhäsion von Thrombozyten von Belang ist. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, daß ERM-Proteine an der Zelladhäsion und der Formation von Filopodien beteiligt sind [59]. Takeuchi et al. konnten zeigen, daß die Störung der Expression von Moesin die Formation von Filopodien in MTD-1A Zellen verhindert und daß ERM-Proteine

für die Zell-Zell und die Zell-Substrat Adhäsion erforderlich sind [78]. Ebenso konnten Serrador et al. demonstrieren, daß Moesin durch die Bindung an das Zytoskelett und Relokalisation von Membran-Adhäsions-Molekülen, wie CD44 und ICAM-3, in sogenannten „Uropods“ polarisierter T-Zellen, die Zell-Zell-Adhäsion der T-Lymphozyten fördert [44, 45]. Des weiteren förderte die Ablation von Ezrin in Filopodienspitzen mit Hilfe der Chromophor-assistierten Laser Inaktivierungs- (CALI) Technik eine reversible Membran-Retraktion in Fibroblasten [79]. Filopodienenden und die hier lokalisierten ERM-Proteine spielen eine bedeutende Rolle während der Zelladhäsion. Die Abbildung 5 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von glasadhärierten Thrombozyten. Die ausgestreckten Zytoplasmaausläufer weisen interessanterweise an ihren Enden flache ausgebreitete Strukturen auf. Ob diese Moesin und PECAM-1 beinhalten, werden immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen müssen.

Welche Mechanismen die Interaktion zwischen Moesin und PECAM-1 regulieren ist bisher nicht bekannt. PECAM-1 besitzt ein sogenanntes „immunreceptor tyrosinebased inhibition motif“ (ITIM), welches während der Plättchenaggregation hoch phosphoryliert ist. Die enorme Phosphorylierung weist auf eine Beteiligung von PECAM-1 während intrazellulärer Signaltransduktionvorgänge hin. Die Phosphorylation von PECAM-1 an Tyrosin 663 und 686 führt zur Bindung und Aktivierung der SH2-Domänen enthaltenden Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 [80, 81, 82, 83].

Die hier gezeigten Daten zeigen, daß die Assoziation von Moesin mit PECAM-1 unabhängig von einer Thrombozytenaggregation ist (Abb. 4). Dies bedeutet, daß die Phosphorylierung von PECAM-1, die erst während der Plättchenaggregation stattfindet, für eine Assoziation mit Moesin nicht notwendig ist. Moesin wird während der Thrombin-Aktivierung von Thrombozyten rapide an Threonin 558 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ermöglicht erst die Bindung von Moesin an Aktinfilamente [49]. Moesin assoziiert ausschließlich mit dem Aktinzytoskelett aktivierter Thrombozyten [84, 49]. Dies ist auch für PECAM-1 beschrieben [85].

In aktivierten Thrombozyten bindet Moesin auch an Polyphosphoinositide (PtdIns(4,5)P₂), deren Synthese abhängig ist von der kleinen GTPase Rac [86]. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der kleinen GTPasen Rac und Rho durch GTP γ S zu einer Lokalisation von Moesin in „focal adhesion sites“ in permeabilisierten Fibroblasten führt, ein Mechanismus,

für den wahrscheinlich die Produktion von PtdIns (4,5)P₂ benötigt wird [40]. Des weiteren stabilisiert PtdIns(4,5)P₂ die Assoziation von ERM-Proteinen mit CD44 [57] und ICAM-1 und -2 [87] in transfizierten Zellen. Diese Daten lassen vermuten, daß die Interaktion von Moesin mit PECAM-1 in Thrombozyten durch die Phosphorylierung von Moesin und die Bindung an PtdIns (4,5)P₂ reguliert wird.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß Moesin während der Thrombozytenaktivierung mit dem Adhäsionsmolekül PECAM-1 assoziiert ist und lassen vermuten, daß Moesin eine Verbindung zwischen PECAM-1 mit dem Aktinzytoskelett herstellt. Diese Interaktion spielt möglicherweise bei der Formation von Adhäsionskomplexen („focal adhesion points“), die dann zur Zellformveränderung und damit zur Aktivierung von Thrombozyten führen, eine Rolle. Ob diese Assoziation auch während des Zell-Zell Kontaktes zwischen Thrombozyten und Monozyten eine Rolle spielt, könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten könnte von Bedeutung sein, wenn es zur Einwanderung dieser Monozyten-Thrombozyten-Konglomerate in atherosklerotische Gebiete kommt oder auch im Falle der Restenose.

Die in 5.1 demonstrierten Daten deuten auf die Bedeutung von Moesin innerhalb der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten hin. Zellen, wie glatte Muskelzellen der Arterien-Media, die in einem festen Zellverbund sind, exprimieren kein Moesin. In der Zellkultur hingegen weisen sie wieder Moesin auf. Es ist zu vermuten, daß Zellen, die zu migrieren beginnen oder aus ihrem Zellverband herausgenommen werden, neue oder heruntergeschaltete Mechanismen in Gang setzen müssen, um sich fortbewegen und neue Zell-Zell Kontakte knüpfen zu können. Die Migration von Zellen verlangt eine Änderung der Zellform, die mit der Rearrangierung des Aktinzytoskeletts einhergeht. Eine andere wichtige Rolle bei der Migration von Zellen spielt die Adhäsion und Kontaktaufnahme mit der Extrazellulärmatrix. Ein ständiger Austausch von Informationen zwischen der Zelloberfläche und dem Zytoplasma muß gewährleistet sein, um einen sinnvollen neuen Zellverband zu bilden und die Zellmigration zu kontrollieren. Proteine wie Moesin spielen dabei eine Mittlerfunktion zwischen Oberflächenmolekülen, also dem Extrazellulärraum, und dem Zytoskelett der Zelle.

Alle migrierenden Zellen weisen drei Grundstrukturen von polymerisiertem Aktin auf: „stress fibers“, Lamellipodien und Filopodien. Diese polymerisierten Strukturen spielen eine

wichtige Rolle bei der Zellfortbewegung und werden unter anderem durch die Familie der Rho-GTPasen reguliert [88]. Die Formation von Filopodien und die Adhäsion von Zellen an Substrat oder andere Zellen sind Voraussetzungen der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen im Rahmen der Restenose. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und anhand der Untersuchungen anderer Gruppen ist eine Rolle von Moesin bei der Zellmigration und -adhäsion wahrscheinlich. Hier wurde untersucht, ob Moesin in den Zellen der Media nach PTA reexprimiert wird und zu welchen Zeitpunkten dieses stattfindet.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß Moesin bereits Stunden nach der PTA in den glatten Muskelzellen der Schweine-Femoralarterien neu exprimiert wird und nach 14 Tagen in den Ratten-Carotiden noch immer nachweisbar ist. Moesin wird somit in Zellen der Media reexprimiert. Diese Ergebnisse müssen in weiteren umfangreicheren Untersuchungen bestätigt werden. In glatten Muskelzellen, die sich in Zellkultur befinden, ist Moesin mit den „stress fibers“ kolokalisiert und findet sich am Rande der „focal adhesions“ (Abb. 8). Ob dieses tatsächlich auch im Falle der Restenose und somit *in vivo* stattfindet, ist noch unklar und könnte ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ein weiterer wichtiger Schritt zum Verständnis der Restenose wäre z.B. die Detektion eines Oberflächenmarkers, der in glatten Muskelzellen an Moesin bindet. Solche Untersuchungen tragen zum weiteren Verständnis der grundlegenden Vorgänge von Zellmigration und der Restenoseentstehung bei und können die Basis für neue Therapie-Ansätze sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Moesin ist ein Mitglied der Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Protein-Familie, die in Zellausläufern wie Filopodien lokalisiert ist. Die Mitglieder dieser Familie stellen Verbindungen zwischen dem Aktinzytoskelett und der Plasmamembran dar und spielen eine Rolle im Austausch von Signalen zwischen der Extrazellulärmatrix, der Zelloberfläche und dem Zytoplasma. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) ein Membran-Bindungs-Partner für Moesin in humanen Thrombozyten ist.

Die zellmembrannahe zytoplasmatische Domäne von PECAM-1 enthält ein Cluster von positiv geladenen Aminosäure-Residuen, die den für CD44 und ICAM-1 beschriebenen Konsensus Sequenzen für ERM-Protein-Bindungen ähnlich sind.

PECAM-1 kolokalisiert mit Moesin in der Zellperipherie und in den Filopodien von glasaktivierten humanen Thrombozyten. Interessanterweise kolokalisiert PECAM-1 mit Moesin an den Spitzen der Filopodien, wie vorher schon für Moesin beschrieben. Die Rasterelektronenmikroskopie stellt die Filopodien-Spitzen als kleine flache Strukturen dar, die wahrscheinlich der Zelladhäsion dienen.

Des weiteren konnte die Interaktion von Moesin mit PECAM-1 mit Hilfe der Immunpräzipitation in thrombinaktivierten Thrombozyten bestätigt werden. In ruhenden Thrombozyten findet diese Interaktion nicht statt.

Diese Untersuchungen deuten auf eine mögliche Rolle von Moesin während der Adhäsion von Thrombozyten hin, indem es PECAM-1 mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet.

Migrierende Zellen, wie glatte Muskelzellen und Fibroblasten der arteriellen Media im Falle der Restenose nach PTA, benutzen den Mechanismus der Adhäsion um neue Zell-Zell- und Zell-Matrix Kontakte zu bilden. Zellmigration ist ein komplexer Vorgang, begleitet von Änderungen der Zellmorphologie, einhergehend mit Rearrangierungen des Zytoskeletts, kontrollierter Zell-Matrix Interaktion und Änderungen der Gentranskription. Proteine wie Moesin dienen dem Austausch von Signalen zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zytoplasma. Glatte Muskelzellen exprimieren kein Moesin *in vivo*. Im Rahmen des zweiten

Teils der Arbeit wurde untersucht, ob im Falle der arteriellen Mediastenose migrierende glatte Muskelzellen Moesin reexprimieren.

Moesin konnte bereits Stunden nach erfolgter PTA im porcinen Carotismediagewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis von Moesin im Carotisgewebe von Ratten gelang noch 14 Tage nach PTA. Moesin wird also in dilatiertem Mediagewebe reexprimiert und kann somit als früher Marker der Restenoseinduktion fungieren.

Welche Funktion das wieder exprimierte Moesin in diesen Zellen ausübt, ist zur Zeit noch nicht endgültig geklärt. Es ist wichtig, Oberflächenproteine zu identifizieren, die mit dem Moesin in diesen Zellen interagieren, um die Funktion der Reexpression besser zu verstehen. Diese Erkenntnisse können dann von erheblicher Bedeutung für das Verständnis der Zellmigration und auch der Restenose sein und unter Umständen eine klinisch-therapeutische Bedeutung erreichen.

7. LITERATUR

- [1] Nobuyoshi M., Kimura T., Nosaka H., Mioka S., Ueno K., Yokoi H., Hamasaki N., Horinchi H., Ohishi H.: “Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients.”
Journal of the American College of Cardiology 12:616-23, 1988
- [2] Liu M.W., Roubin G.S., King S.B.: “Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinants and role of intima hyperplasia. Point of view”
Circulation 79:1374-87, 1989
- [3] Waller B.F.: “Morphologic correlates of coronary angiographic patterns at the site of coronary angioplasty”
Clinical Cardiology 11:817-22, 1988
- [4] Muller D.W.M., Ellis S.G., Topol E.J.: “Experimental models of coronary artery restenosis”
Journal of the American College of Cardiology 19:418-32, 1992
- [5] Califf R.M.: „Restenosis: The cost to society”
American Heart Journal 130:680-84, 1995
- [6] Gravanis M.B., Roubin G.S.: “Histopathologic phenomena at the site of coronary angioplasty”
Human Pathology 20:477-85, 1989
- [7] Saner H.E., Gobel F.L., Salmonowitz E., Erlie D.A., Edwards J.E.: “The disease-free wall in coronary atherosclerosis: its relation to degree of obstruction”
Journal of the American College of Cardiology 6:1096-9, 1985
- [8] Potkin B.N., Roberts W.C.: “Effects of coronary angioplasty on atherosclerotic plaques and relation of plaque composition and arterial size to outcome”
American Journal of Cardiology 62:41-50, 1988

- [9] Wilensky R.L., March K.L., Gradus-Pozlo I., Sandusky G., Fineberg N., Hathaway D.R.: “Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit”
Circulation 92(10):2995-3005, 1995
- [10] Ip J.H., Fuster V., Israel D., Badimon L., Badimon J., Chesebro J.H.: “The role of Platelets, Thrombin and Hyperplasia in Restenosis After Coronary Angioplasty”
Journal of the American College of Cardiology 17(6):77B-88B, 1991
- [11] Forrester J.S., Fishbein M., Helfant R., Fagin J.: “ A Paradigm for Restenosis Based on Cell Biology: Clues for the Development of New Preventive Therapies”
Journal of the American College of Cardiology 17(3):758-69, 1991
- [12] Bauters C.H., Isner J.M.: ”The Biology of Restenosis”
Progress in Cardiovascular Diseases 40(2):107-116, 1997
- [13] Schwartz R.S., Holmes D.R., Topol E.J.: “The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms”
Journal of the American College of Cardiology 20:1284-93, 1992
- [14] Willerson J.T., Sheng-Kun Y., McNatt J., Benedict C.R., Anderson H.V., Golino P., Murphree S.S., Muja L.M.: “ Frequency and severity of cyclic flow alternations and platelet aggregation predict the severity of neointimal proliferation following experimental coronary stenosis and endothelial injury”
Proceedings of the National Academy of Science 88:10624-10628, 1991
- [15] Chesebro J.H., Badimon L., Fuster V.: “Importance of Antithrombin Therapy During Coronary Angioplasty”
Journal of the American College of Cardiology 17(6):96B-100B, 1991
- [16] Casscells W.: “Migration of Smooth Muscle and Endothelial Cells – Critical Events in Restenosis”
Circulation 86(3):723-29, 1992

- [17] Libby P., Tanaka H.: "The Molecular Bases of Restenosis"
Progress in Cardiovascular Diseases 40(2):97-106, 1997
- [18] Faxon D.P., Coats W., Currier J.: "Remodeling of the Coronary Artery After Vascular Injury"
Progress in Cardiovascular Diseases 40(2):129-40, 1997
- [19] Batchelor W.B., Robinson R., Strauss B.H.: "The Extracellular Matrix in Balloon Arterial Injury: A Novel Target for Restenosis Prevention"
Progress in Cardiovascular Diseases 41(1):35-49, 1998
- [20] Gawaz M.: „Das Blutplättchen – Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung“
Georg Thieme Verlag, 1999
- [21] Klinger M.H.F.: "Platelets and inflammation"
Anatomy and Embryology 196:1-11, 1997
- [22] Yeaman M.R.: "The role of platelets in antimicrobial host defense"
Clinical Infectious Diseases 25:951-70, 1997
- [23] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: „Molekularbiologie der Zelle“
VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995
- [24] Le Breton H., Plow E. F., Topol E. J. : "Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization"
Journal of the American College of Cardiology 28(7):1643-51, 1996
- [25] Pittilo R.M, Machin S.J.: "Platelet – Vessel wall interactions"
Springer Verlag, 1987
- [26] Hawiger J.: "Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction"
Thrombosis and Hemostasis 74:369-72, 1995

- [27] Bertagnolli M.E., Beckerle M.C.: "Evidence for selective association of a subpopulation of GPIIb/IIIa with the actin cytoskeletons of thrombin-activated platelets"
Journal of Cell Biology 121 (6):1329-1342, 1993
- [28] Newman P.J., Berndt M.C., Gorski J., White G.C., Lyman S., Paddock C., Muller W.A.: "PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily"
Science 247(4947):1219-22, 1990
- [29] Albelda S.M., Muller W.A., Buck C.A., Newman P.J.: "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule"
Journal of Cell Biology 114(5):1059-68, 1991
- [30] Falet H., Barkalow K.L., Pivniouk V., Barnes M.J., Geha R.S., Hartwig J.H.: "Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase and gelsolin in the platelet shape changes initiated by the collagen receptor GPVI/FcR γ -chain complex"
Blood 96(12):3786-92, 2000
- [31] Hartwig J.H.: "The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments"
Journal of Cell Biology 112(3):407-25, 1991
- [32] Hartwig J.H.: "Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation"
Journal of Cell Biology 118(6):1421-42, 1992
- [33] Clemetson K.J., Clemetson J.M.: "Molecular abnormalities in Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and platelet-type von Willebrand's disease"
Current Opinion in Hematology 1(5):388-93, 1994
- [34] Hayashi T., Suzuki K.: "Molecular pathogenesis of Bernard-Soulier syndrome"
Seminars in Thrombosis & Hemostasis 26(1):53-9, 2000
- [35] White J.G.: "Arrangements of Actin Filaments in the Cytoskeleton of Human Platelets"
American Journal of Pathology 117:207-217, 1984

- [36] Kenney D., Linck R.: "The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band"
Journal of Cell Science 78:1-22, 1985
- [37] Barkalow K., Witke W., Kwiatkowski D., Hartwig J.: "Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein"
Journal of Cell Biology 134:389-399,1996
- [38] Fox J.E.B.: "The platelet cytoskeleton"
Thrombosis and Hemostasis 70(6), 884-893, 1993
- [39] Hartwig J., Kung S., Kovacsovic T., et al.: "D3 Phosphoinositides and Outside-In Integrin Signaling by GPIIb/IIIa Mediate Platelet Actin Assembly and Filopodial Extension Induced by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate"
Journal of Biological Chemistry 271:32986-32993, 1996
- [40] Mackay D.J.G., Esch F., Furthmayr H., Hall A.: "Rho- and Rac-dependent Assembly of Focal Adhesion Complexes and Actin Filaments in Permeabilized Fibroblasts: An Essential Role for Ezrin/Radixin/Moesin Proteins"
Journal of Cell Biology 138(4):927-938, 1997
- [41] Critchley D.R.: " Focal adhesions – the cytoskeletal connection"
Current Opinion in Cell Biology 12:133-139, 2000
- [42] Nakamura F., Amieva M.R., Furthmayr H. : "Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets"
Journal of Biological Chemistry 270(52):31377-85, 1995
- [43] Nakamura F., Amieva M.R., Hirota CH., Mizuno Y., Furthmayr H.: "Phosphorylation of Threonine 558 of Moesin Detected by Site-Specific Antibodies an RAW264.7 Macrophages"
Biochemical and Biophysical Research Communications 226:650-656, 1996
- [44] Serrador J.M., Alonso-Lebrero J.L., del Pozo M.A., Furthmayr H., Schwartz-Albiez R., Calvo J., Lozano F., Sánchez-Madrid F.: "Moesin interacts with the cytoplasmic region of

intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization“

Journal of Cell Biology 138 (6):1409-1423, 1997

[45] Serrador J.M., Nieto M., Alonso-Lebrero J.L., del Pozo M.A., Calvo J., Furthmayr H., Schwartz-Albiez R., Lozano F., Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Mateos P., Sanchez-Madrid F.: “CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts”

Blood 91(12):4632-44, 1998

[46] Yonemura S., Hirao M., Doi Y., Takahashi N., Kondo T., Tsukita S.: “Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2”

Journal of Cell Biology 141(4):885-95, 1998

[47] Tsukita S., Oishi K., Sato N., Sagara J., Kawai A., Tsukita S.: “ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons”

Journal of Cell Biology 126(2):391-401, 1994

[48] Huang L., Wong T.Y.W., Lin R.C.C., Furthmayr H.: “Replacement of Threonine 558, a Critical Site of Phosphorylation of Moesin *in Vivo*, with Aspartate Activates F-actin Binding of Moesin”

Journal of Biological Chemistry 274(18):12803-12810, 1999

[49] Nakamura F., Huang L., Pestonjamas K., Luna E.J., Furthmayr H.: “Regulation of F-Actin Binding to Platelet Moesin *In Vitro* by Both Phosphorylation of Threonine 558 and Polyphosphatidylinositides”

Molecular Biology of the Cell 10:2669-2685, 1999

[50] Oshiro N., Fukata Y., Kaibuchi K.: “Phosphorylation of Moesin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase) Plays a Crucial Role in the Formation of Microilli-like Structures”

Journal of Biological Chemistry 273(52):34663-34666, 1998

- [51] Matsui T., Maeda M., Doi Y., Yonemura S., Amano M., Kaibuchi K., Tsukita S., Tsukita S.: "Rho Kinase Phosphorylates COOH-terminal Threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins and Regulates Their Head-to-Tail Association"
Journal of Cell Biology 140(3):647-657, 1998
- [52] Simons P.C., Pietromonaco S.F., Reczek D., Bretscher A., Elias L.: "C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton"
Biochemical & Biophysical Research Communications 30;253(3):561-5, 1998
- [53] Fingerle J., Muller R.M., Kuhn H., Pech M., Baumgartner H.R.: "Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril. A study in balloon catheter-injured rat carotid arteries"
Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology Vol. 15, 1995
- [54] Laemmli U.K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"
Nature 227:680-685, 1970
- [55] Heukeshoven J., Dernick R.: "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels"
Electrophoresis 9(1):28-32, 1988
- [56] Bretscher, A.: "Rapid phosphorylation and reorganisation of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor"
Journal of Cell Biology 108: 921-30, 1989
- [57] Hirao M., Sato N., Kondo T., Yonemura S., Monden M., Sasaki T., Takai Y., Tsukita S., Tsukita S.: "Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway"
Journal of Cell Biology 135(1):37-51, 1996

- [58] Helander T.S., Carpen O., Turunen O., Kovanen P.E., Vaheri a., Timonen T.: "ICAM-2 redistributed ezrin as a target for killer cells"
Nature 382(6588):265-8, 1996
- [59] Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S.: "Direct Involvement of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-binding Membrane Proteins in the Orgaization of Microvilli in Collaboration with Activated ERM Proteins"
Journal of Cell Biology 145(7): 1497-1509, 1999
- [60] Reczek D., Berryman M., Bretscher A.: "Identification of EBP50: a PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family"
Journal of Cell Biology 139(1):169-79, 1997
- [61] Reczek D., Bretscher A.: "The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule"
Journal of Biological Chemistry 273(29):18452-58, 1998
- [62] Legg J.W. and Isacke C.M.: "Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44"
Current Biology 8:705-708, 1998
- [63] Mintz G.S., Popma J.J., Pichard A.D., Kent K.M., Satler L.F., Wong S.CH., Hong M.K., Kovach J.A., Leon M.B.: "Arterial Remodeling After Coronary Angioplasty – A Serial Intravascular Ultrasound Study"
Circulation 94(1):35-43, 1996
- [64] Ellis S.G., Bates E.R., Schaible T., Weisman H.F., Pitt B., Topol E.J. : "Prospects for the Use of Antagonists to the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor to Prevent Postangioplasty Restenosis and Thrombosis"
Journal of the American College of Cardiology 17(6):89B-95B, 1991
- [65] Topol E.J., Califf R.M., Weiman H.F., Ellis S.G., Tscheng J.E., Worley S., Ivanhoe R., George B.S., Fintel D., Weston M.: "Randomized trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months"

Lancet 343:881-6, 1994

[66] Lefkovits J., Topol E.J.: “Pharmacological Approaches for the Prevention of Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention”

Progress in Cardiovascular Diseases 40(2):141-58, 1997

[67] Serruys P.W., de Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P., et al.: “A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group”

New England Journal of Medicine 331(8): 489-95, 1994

[68] Fischman D.L., Leon M.B., Baim D.S., Schatz R.A., Savage M.P., Penn I., Detre K., Veltri L., Ricci D., Nobuyoshi M., et al.: “A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators”

New England Journal of Medicine 331(8): 496-501, 1994

[66] Kimmel S.E., Localio A.R., Brensinger C., Miles C., Hirshfeld J., Haber H.L., Strom B.L.: “Effects of coronary stents on cardiovascular outcomes in broad-based clinical practice”
Archives of Internal Medicine 160(17): 2593-9, 2000

[70] Angelini P., Vaughn W.K., Zaqqa M., Wilson J.M., Fish R.D.: “Impact of the “stent-when-feasible” policy on in-hospital and 6-month success and complication rates after coronary angioplasty: single-center experience with 17,956 revascularization procedures (1993-1997)”

Texas Heart Institution Journal 27(4): 337-45, 2000

[71] Fischell T.A., Hehrlein C.: “The radioisotope stent for the prevention of restenosis”
Herz 23(6): 373-9, 1998

[72] Carter A.J., Fischell T.A.: “Current status of radioactive stents for the prevention of in-stent restenosis”

International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 41(1): 127-33, 1998

[73] Albiero R., Nishida T., Adamian M., Amato A., Vaghetti M., Corvaja N., Di Mario C., Colombo A.: “Edge restenosis after implantation of high activity (32)P radioactive beta-emitting stents“

Circulation 101(21): 2454-7, 2000

[74] Sousa J.E., Costa M.A., Abizaid A.C., Rensing B.J., Abizaid A.S., Tantajura L.F., Kozuma K., Van Langenhove G., Sousa A.G., Falotico R., Jaeger J., Popma J.J., Serruys P.W.: “Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up”

Circulation 104(17): 2007-11, 2001

[75] Morice M.C., Serruys P.W., Sousa J.E., Fajadet J., Ban Hayashi E., Perin M., Colombo A., Schuler G., Barragan P., Guagliumi G., Molnar F., Falotico R.: “A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization“

New England Journal of Medicine 346(23): 1773-80, 2002

[76] Newman P.J.: “The biology of PECAM-1”

Journal of Clinical Investigation 100(11 Suppl):S25-9, 1997

[77] Shcherbina A., Kenney D.M., Bretscher A. and Remold-O'Donnell E.: “Dynamic association of moesin with membrane cytoskeleton of thrombin-activated platelets”

Blood 93:2128-2129, 1999

[78] Takeuchi K., Sato N., Kasahara H., Funayama N., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S.: “ Perturbation of Cell Adhesion and Microvilli Formation by Antisense Oligonucleotides to ERM Family Members”

The Journal of Cell Biology 125(6):1371-1384, 1994

[79] Lamb R.F., Ozanne B.W., Roy C., McGarry L., Stipp C., Mangeat P., Jay D.G.: “Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts”

Current Biology 7:682-688, 1997

[80] Jackson D.E., Ward C.M., Wang R., Newman P.J.: "The protein tyrosine phosphatase SHP-2 binds PECAM-1 and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation: evidence for a mechanistic link between PECAM-1 and integrin-mediated cellular signaling" *Journal of Biological Chemistry* 272:6986-6993, 1997

[81] Jackson D.E., Kupcho K.R., Newman P.J.: "Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, SHP-2" *Journal of Biological Chemistry* 272:24868-24875, 1997

[82] Hua C.T., Gamble J.R., Vadas M.A., Jackson D.E.: "Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-like binding motifs and substrates" *Journal of Biological Chemistry* 273(43):28332-40, 1998

[83] Cicmil M., Thomas J.M., Sage T., Barry F.A., Leduc M., Bon C., Gibbins J.M.: "Collagen, convulxin, and thrombin stimulate aggregation-independent tyrosine phosphorylation of CD31 in platelets" *Journal of Biological Chemistry* 275:27339-27347, 2000

[84] Shcherbina A., Bretscher A., Kenney D.M. and Remold-O'Donnell E.: "Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain" *FEBS Letters* 443:31-36, 1999

[85] Newman P.J., Hillery C.A., Albrecht R., Parise L.V., Berndt M.C., Mazurov A.V., Dunlop L.C., Zhang J., Rittenhouse S.E.: "Activation-dependent changes in human platelet PECAM-1: phosphorylation, cytoskeletal association, and surface membrane redistribution" *Journal of Cell Biology* 119(1):239-46, 1992

[86] Hartwig J.H., Bokoch G.M., Carpenter C.L., Janmey P.A., Taylor L.A., Toker A. and Stossel T.P.: "Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets"

Cell 82:643-653, 1995

[87] Heiska L., Alfthan K., Grönholm M., Vilja P., Vaheri A., Carpén O.: "Association of ezrin with intercellular molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2)"

Journal of Biological Chemistry 273:21893-21900, 1998

[88] Nobes C.D., Hall A.: "Rho, Rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia"

Cell 81:53-62, 1995

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. J. vom Dahl danke ich für die Überlassung des Themas sowie die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Greiling und Herrn Prof. Dr. med. Gressner vom Institut für Klinische Chemie der RWTH Aachen danke ich für die zur Verfügungstellung von Arbeitsmöglichkeiten, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Ch. Mittermayer vom Institut für Pathologie der RWTH Aachen danke ich ebenfalls für die zur Verfügungstellung von Arbeitsmöglichkeiten.

Frau Henrike Seifert danke ich für die Mitarbeit bei den immunhistologischen Färbungen und der Zellkultur.

Herrn Dipl. phys. A. Roelofs danke ich für die Mitarbeit bei den elektronenmikroskopischen Bildern.

Herrn Dr. med. H. Seifert danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Dr. med. K. Hoffmeister danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Entstehung dieser Arbeit.

CURRICULUM VITAE

Name: Kerstin Seifert
Geburtsdatum: 19.09.1972
Geburtsort: Ulm

Schulbildung:

1992: Abitur am Johanna-Sebus Gymnasium in Kleve

Studium:

1992-1999: Medizinstudium an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

Berufstätigkeit:

8/2000-01/2002: Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Klinik II des Krankenhauses Köln Merheim

seit 2/2002: Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik II des Krankenhauses Köln Merheim

Leiter der Klinik: Prof. Dr. med. W. Krone