

## **Interaktionen von Monozyten und Endothelzellen unter Flußbedingungen**

**Philipp von Hundelshausen**

Aus dem  
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

**Interaktionen von Monozyten und Endothelzellen unter Flußbedingungen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Philipp von Hundelshausen  
aus München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. C. Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Krombach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Engelmann

Prof. Dr. B. Becker

Dekan: Prof. Dr. med Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2003

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2. Grundlagen der Interaktionen von Monozyten mit Endothelzellen</b>	
2.1. Bedeutung für Atherosklerose	10
2.2. Die Zelladhäsionskaskade	11
2.3. Chemokine	14
<b>3. Methoden</b>	
3. 1. Zellkultur	18
3.1.1. Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen	18
3.1.2. Humane mikrovaskuläre Endothelzellen	19
3.1.3. Humane aortale Endothelzellen	19
3.1.4. Endothelzellpassage	19
3.1.5. Mono Mac 6 Zellkultur	20
3.1.6. Isolierung humaner Monozyten	20
3.1.7. Isolierung humaner Thrombozyten	20
3. 2. Adhärenzmessung in der Flußkammer	21
3. 3. Adhärenzmessung aus Mäusen gewonnener ex vivo perfundierter Karotiden	23
3.3.1. Präparation	23
3.3.2. Ex vivo isoliertes, perfundiertes Karotismodell	23
3.3.3. Immunhistochemie in Mauskarotiden	25
3. 4. Durchflußzytometrie	25
3. 5. Immunfluoreszenz	26
3. 6. Statistische Auswertung	26
3. 7. ELISA	26
3.8. Calciummessung in MM6	27
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1. Endothelzellaktivierung mit TNF- $\alpha$ resultiert in erhöhter Oberflächenexpression von GRO- $\alpha$ und erhöhter MCP-1 Sekretion	29
4.2. Expression von CXCR2 und CCR2 auf Monozyten	32
4.3. Unterschiedliche Rollen von CCR2 und CXCR2 in Mono Mac 6 Endothel-Interaktionen unter Flußbedingungen	33
4.4. Unterschiedliche Rollen von CCR2 und CXCR2 in Monozyten Endothel-Interaktionen unter Flußbedingungen	36
4.5. Unterschiedliche Rolle von GRO- $\alpha$ und MCP-1 in Monozyten Endothel-Interaktionen unter Flußbedingungen	38
4.6. Von Thrombozyten sezerniertes RANTES verursacht Monozytenadhäsion	40
4.7. Bindung von RANTES an aktiviertes Endothel	42
4.8. RANTES ist nicht am monozytären Arrest auf adhärennten Plättchen beteiligt	45
4.9. Luminale RANTES Ablagerung in atherosklerotischen und verletzten Arterien	46
4.10. Monozytenakkumulation in apoE $-/-$ Mauskarotiden ist RANTES-Rezeptor	

abhängig	48
<b>5. Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8. Anhang</b>	
8.1. Materialien	64
8.1.1. Chemikalien	65
8.1.2. Lösungen	66
8.1.3. Antikörper und Antagonisten	66
8.1.4. Medikamente	66
8.2. Publikationen	66
8.2.1. Für die Dissertation relevante Veröffentlichungen	66
8.2.2. Sonstige Veröffentlichungen	
8.3. Danksagung	67
8.4. Lebenslauf	68

## **Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis**

BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GRO	growth-related oncogene
HBSS	Hank's balanzierte Salzlösung
HSA	humanes Serumalbumin
HUVEC	humane umbilikale Venenendothelzellen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	monocyte chemotactic protein
MIP	macrophage inflammatory protein
NAP-2	neutrophil-activating peptide-2
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMN	polymorphnukleäre Neutrophile
PTX	Pertussis-Toxin
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen

## Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Die Adhäsionskaskade
- Abb.2: Chemokinklassifikation
- Abb.3: Die Flußkammer
- Abb.4: Modell der ex vivo perfundierten A.carotis
- Abb.5:  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und Desensitization in Mono Mac 6 nach RANTES Applikation
- Abb.6: Durchflußzytometrische Messung von Chemokinen auf TNF- $\alpha$  stimuliertem Endothel
- Abb.7: Detektion von GRO- $\alpha$  auf stimulierten Endothelzellen und MCP-1 in Überständen mittels ELISA
- Abb.8: Detektion von GRO- $\alpha$  auf HMVEC durch Immunfluoreszenz
- Abb.9: Expression von CXCR2 und CCR2 auf Monozyten
- Abb.10: Unterschiedliche Bedeutung von CCR2 und CXCR2 auf Mono Mac 6 Zellen für Interaktionen mit Endothelzellen unter Flußbedingungen
- Abb.11: Unterschiedliche Bedeutung von CCR2 und CXCR2 auf Monozyten für Interaktionen mit Endothelzellen unter Flußbedingungen
- Abb.12: Unterschiedliche Bedeutung von MCP-1 und GRO- $\alpha$  für Interaktionen mit Endothelzellen unter Flußbedingungen
- Abb.13: Adhäsion von Monozyten auf mit Thrombozyten präperfundiertem Endothel unter Flußbedingungen
- Abb.14: RANTES im Überstand aktivierter Thrombozyten
- Abb.15: RANTES Detektion auf Endothelzellen nach Inkubation mit Plättchen
- Abb.16: RANTES Immunfluoreszenz auf Endothel nach Perfusion mit Plättchen
- Abb.17: Monozytenarrest auf stimulierten Plättchen
- Abb.18: Immunhistochemische Detektion von Chemokinen in Mauskarotiden
- Abb.19: Monozytenakkumulation in mit RANTES vorbehandelten Mauskarotiden
- Abb.20: Modell der unterschiedlichen Funktion von MCP-1 und GRO- $\alpha$
- Abb.21: Modell der Immobilisation von aus Thrombozyten stammendem RANTES auf aktiviertem Endothel

## 1. Einleitung

Wechselwirkungen zwischen Monozyten und Endothelzellen spielen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Prozesse, wie beispielsweise Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen oder Atherogenese, eine bedeutende Rolle. Besonders bei letzterer kommt den Monozyten eine herausragende Bedeutung zu, weil ihre Auswanderung aus der Zirkulation durch die Endothelschicht in die Intima als erster Schritt zur Bildung von Schaumzellen notwendig ist und damit den Boden für einen atherosklerotischen Plaque bereitet. In Tiermodellen ist es dabei gelungen zu zeigen, daß Chemokine wie GRO- $\alpha$ , MCP-1 bzw. ihre Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten entscheidend an der Gefäßinfiltration beteiligt sind [1, 2], [3] und ihre Blockierung atherosklerotische Läsionen vermindern kann.

Die Rekrutierung von Monozyten in entzündetes Gewebe erfordert dabei das Zusammenspiel unterschiedlichster Signalmoleküle. Das Rollen, vermittelt durch Selektine, der feste Arrest und die Transmigration, hervorgerufen durch Bindung von Integrinen an ihre Liganden aus der Gruppe der Superimmunglobuline, sind dabei Schritte, die erforderlich sind, dem Monozyten die Auswanderung aus der Zirkulation zu ermöglichen. Eine weitere wichtige Molekülgruppe, die an der Zelladhäsion beteiligt ist, sind Chemokine, von denen bis jetzt über 40 verschiedene entdeckt wurden. Da die meisten von ihnen mehrere Chemokinrezeptoren binden, auf der anderen Seite ein bestimmter Chemokinrezeptor mehrere Chemokine binden kann, ist die Funktion der großen Zahl der Chemokin-Chemokinrezeptor-Kombinationen mit ihrer Redundanz immer noch ein Rätsel. Chemokine erwirken über die Stimulation ihrer Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten eine verstärkte Fähigkeit zur Adhäsion und Transmigration. Eine Möglichkeit, wie Chemokine eine gewisse funktionelle Selektivität erreichen könnten, wäre die unterschiedliche Präsentation und Immobilisation durch Zelloberflächenmoleküle wie Glycosaminoglykane [4], oder Proteoglykane [5], die zusätzlich noch Heparin gebunden haben können [6, 7]. So kann zum Beispiel das Chemokin Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) auf Proteoglykanen des Endothels oder auf Leukozyten immobilisiert werden und dort den Arrest von T-Lymphozyten auslösen. Nach Herztransplantationen tritt ein entzündlicher Prozess auf, der eine diffuse Atherosklerose in den Koronarien im Sinne einer Transplantatvaskulopathie darstellt. Das CC-Chemokin RANTES ist in durch Transplantat-assoziierte-Atherosklerose geschädigten Arterien detektiert worden und ist bei der Rekrutierung von Monozyten in der Transplantatabstoßung beteiligt [8]. RANTES



bindet an entzündlich verändertes mikrovaskuläres Endothel über einen bisher unbekanntem Mechanismus und löst den Arrest von Monozyten unter Flußbedingungen aus [9].

Thrombozyten können Monozyten und Endothelzellen über integrinabhängige Mechanismen miteinander verbinden, hierbei spielen besonders die  $\beta 2$ - und  $\beta 3$ -Integrine über Fibrinogen als gemeinsamem Bindungspartner eine wesentliche Rolle [10-13].

Darüberhinaus beeinflussen bei ihrer Aktivierung frei werdende sekretorische Produkte wie IL-1 $\beta$  oder chemotaktische Stoffe wie RANTES oder PAF [14, 15] [16, 17] vaskuläre und inflammatorische Syndrome [18]. Inwiefern RANTES hier als sekretorisches Produkt von Plättchen, auf Endothelzellen immobilisiert, eine Rolle für die Monozytenrekrutierung spielt, ist Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen.

Unter Flußbedingungen könnten diese Prozesse besonders zum Tragen kommen, wenn lösliche Chemokine weggewaschen und verdünnt werden, immobilisierte hingegen noch zur Aktivierung präsent sind. Neutrophile Leukozyten werden zum Beispiel durch den in der Membran von aktivierten Plättchen verankerten Lipidmediator PAF, nicht aber durch CXC-Chemokine aktiviert, und adhären, wenn sie unter Flußbedingungen in Kontakt mit einer immobilisierten Plättchenschicht kommen [10]. Jedenfalls sind unter Flußbedingungen weder Ergebnisse zum unterschiedlichen Beitrag verschiedener aus entzündetem Endothel stammender Chemokine wie MCP-1 und GRO- $\alpha$  und ihrer Rezeptoren CCR2 bzw. CXCR2 zur Monozytenadhäsion publiziert worden, noch sind Untersuchungen angestellt worden, die der Frage nachgehen, ob es unter Flußbedingungen eine erkennbare Hierarchie und funktionelle Spezialisierung unter Chemokinen gibt, die Aufschluß über mögliche aufeinanderfolgende Schritte auf den äußerst komplexen Vorgang der Extravasation von Monozyten geben. Das Hauptaugenmerk gilt dabei besonders der Frage nach dem Prozess und dem Modus der Chemokinpräsentation auf verschiedenen Endothelien, aber auch der Frage einer Hierarchie unter Chemokinen, die wichtig für die sequentiellen Vorgänge der Adhäsion und Transmigration sind. Dabei sollen diese verschiedenen Schritte der Adhäsionskaskade von Monozyten unter möglichst physiologischen Bedingungen, d.h. unter Scherfluß untersucht werden.

## **2. Grundlagen der Interaktion von Monozyten mit Endothelzellen**

### **2.1. Bedeutung für Atherosklerose**

Atherosklerose ist die Hauptursache für den Myokardinfarkt, Apoplex und die periphere arterielle Verschlusskrankheit und damit verantwortlich für 50% der Mortalität in den Industrieländern (USA, Europa, Japan) [19] [20].

Im Prozeß der Atherogenese unterscheidet man verschiedene Stadien, wobei das erste Stadium, welches vorwiegend aus lipidreichen Makrophagen [21] und auch einigen T-Lymphozyten in der Intima besteht, der „fatty streak“, noch vollkommen reversibel ist [22].

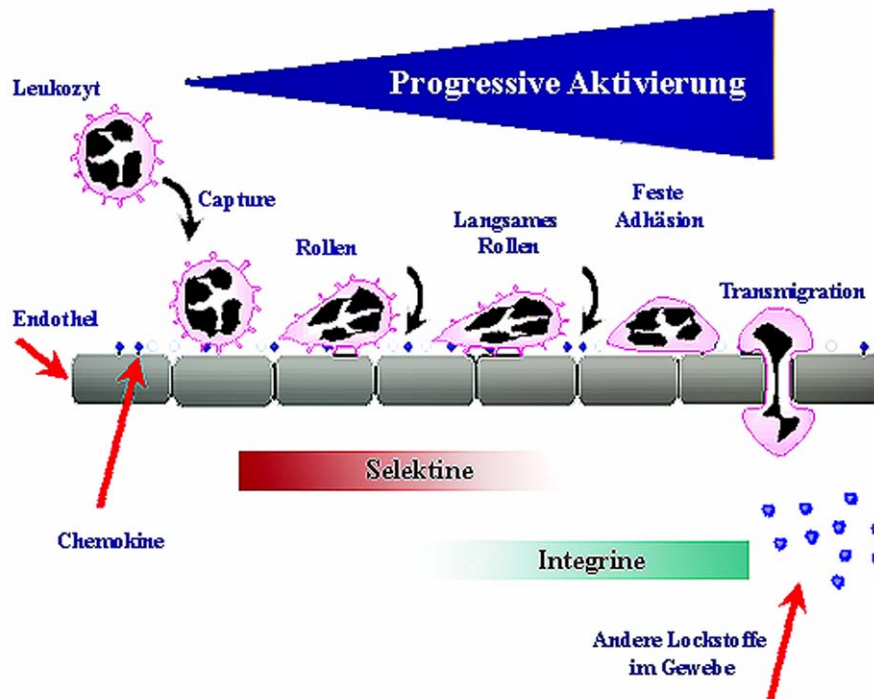
Durch Obduktionen fiel auf, daß bereits die Hälfte aller 10- 14jährigen schon diese erste Manifestation an ihrer Aorta aufweisen (World Health Organisation 1985). Diese erste Läsion schreitet voran, glatte Muskelzellen vermehren sich, die Anzahl der eingewanderten Makrophagen erhöht sich, und schließlich bildet sich ein fibröser Plaque, der sich immer mehr vergrößert und dabei das Lumen zunehmend einengt. Der daraus resultierende verminderte bis aufgehobene Blutfluß ist die Ursache für die oben erwähnten Krankheiten.

Es gibt mehrere Theorien für die Pathogenese der Atherosklerose, die sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen sondern ergänzen. Auf der einen Seite steht Russel Ross mit der „response to injury“ Hypothese, auf der anderen Daniel Steinberg mit der „LDL oxidation“-Theorie [23, 24] [25, 26]. In beiden spielen Monozyten eine zentrale Rolle. Denn Monozyten, die Vorgänger von Gewebsmakrophagen, besitzen verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, Scavenger-Rezeptoren, die eine Aufnahme von modifizierten LDL-Partikeln ermöglichen und dadurch die Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen bewirken, die ein wichtiges pathologisches Merkmal der Atherosklerose sind. Zusätzlich sind sie Quelle verschiedenster Zytokine und Chemokine, die den inflammatorischen Prozeß unterhalten. Letztere sind verantwortlich für die gerichtete Bewegung von Monozyten und Lymphozyten und deshalb auch ein wichtiger Teil bei der Entstehung des „fatty streak“ und der weiteren Immigration inflammatorischer Zellen [2, 27]. Die inzwischen weiter modifizierte „response to injury“ Hypothese geht davon aus, daß eine Verletzung des Endothels im weitesten Sinne die Ursache für die Atherogenese darstellt. Diese Läsionen entstehen aus den grundlegenden Risikofaktoren für Atherosklerose: Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Zigarettenrauch, Diabetes mellitus. Verletzung bedeutet hierbei nicht unbedingt Zerstörung im Sinne von Fehlen der endothelialen Innenbeschichtung, sondern eine Erhöhung der Adhäsivität für Monozyten. Dies ist inzwischen durch verbesserte Gewebspräparation klar geworden, denn das Endothel ist bei den frühen Läsionen morphologisch intakt. Dabei folgen die Monozyten chemotaktischen Lockstoffen, wie es Chemokine, aber auch Substanzen wie oxLDL sein

können [28, 29]. In zunehmendem Maße gewinnen solche Stoffe und ihre Rezeptoren für die Erforschung und Behandlung der Atherogenese an Bedeutung. So wird MCP-1 in atherosklerotischen Läsionen gefunden, nicht aber in intakten Gefäßen [30, 31]. Im Mausmodell beschleunigt das Chemokin MCP-1 die Entstehung von Atherosklerose, wenn es in Leukozyten überexprimiert wird [32]. Im CCR2 knock-out Modell entwickeln Mäuse, denen dieser Rezeptor für MCP-1 fehlt, geringere atherosklerotische Läsionen. Das Chemokin RANTES spielt eine Rolle bei der Transplantat assoziierten Arteriosklerose [8]. Nach der Durchwanderung des Gefäßes differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen, die sich ihrerseits in Schaumzellen umwandeln, sobald sie freies und verestertes Cholesterin und oxidiertes LDL aufgenommen haben. Tierexperimente zeigten, daß sowohl die Proliferation glatter Muskelzellen, die in der Lage sind elastische Fasern, Kollagen und Proteoglykane zu bilden, als auch die Ablagerung von Lipiden und hauptsächlich freiem aber auch verestertem Cholesterin durch Makrophagen in die umgebende Matrix, hauptverantwortlich für die Entstehung fibröser Plaques sind. Diese Plaques bestehen aus einem lipidreichen Kern mit nekrotischem Zelldetritus, der durch eine dichte fibröse Kappe bedeckt ist. Beim Einreißen dieser Kappe gelangt thrombogenes Material des Plaque in Kontakt mit Plättchen und führt zu einem akuten Verschuß des Gefäßes.

## **2.2. Die Zelladhäsionskaskade**

Die unterschiedlichen Leukozytenarten nehmen spezielle Funktionen im Körper wahr. Hierunter fallen das Durchsuchen der Gewebe nach Erregern, die Phagozytose von Erregern, die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren um nur einige zu nennen. Um ihre Aufgaben erfüllen zu können hat sich im Laufe der Evolution ein System herausgebildet, das es ihnen ermöglicht, schnell am Ort einer Entzündung oder Verletzung zu akkumulieren. Dafür ist der Prozess der Adhäsion an das Endothel und der nachfolgende Schritt der Transmigration unabdingbar. Viele unterschiedliche Signalmoleküle sind an diesem mehrstufigen Vorgang beteiligt.



**Abb.1:** Die

Zelladhäsionskaskade (modifiziert nach K.Ley in *A Web-Based Research Tool for Functional Genomics of the Microcirculation: The Leukocyte Adhesion Cascade Microcirculation 1999*)

Selektine sind für den ersten Kontakt der entlangströmenden Zelle mit dem Endothel (capturing) und das anschließende Rollen verantwortlich. Besitzen nun das Endothel und der Leukozyt Selektine und deren Liganden, kommt es zu Bindungen, die nicht stabil genug sind, vollständigen Arrest auszulösen. Sie halten aber die Zelle in Kontakt mit der luminalen Oberfläche des Gefäßes, halten und reduzieren die Geschwindigkeit. Es resultiert das „Rollen“, ein physiologischer Vorgang, der allein noch keine leukozytäre Rekrutierung bedingt, da bei Fehlen weiterer Aktivierungsschritte sich die Zelle wieder löst und vom Blutstrom mitgerissen wird. Die drei Mitglieder umfassende Selektinfamilie besitzt eine N-terminale Domäne, die homolog zu  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Lektinen ist [33]. L-Selektin wird auf allen Leukozyten, mit Ausnahme einer kleinen Population von Lymphozyten exprimiert. P-Selektin wird in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert. Wenn diese Zellen durch Mediatoren wie Thrombin aktiviert werden, gelangt P-Selektin an die Oberfläche und kann dort an die Liganden der Monozyten und Neutrophilen binden. PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) ist der bis jetzt am besten charakterisierte Ligand für P-Selektin. Er liegt in Form eines Homodimers vor, die für

die spezifische Erkennung durch P-Selektin auf allen Leukozytenklassen notwendig ist [34]. Können aufgrund einer Mutation weniger funktionstüchtige Liganden für Selektine gebildet werden [35], entsteht ein Krankheitsbild, LAD II (Leukocyte Adhesion Deficiency), bei dem Patienten an häufigen bakteriellen Infektionen leiden, da zur Bekämpfung eines Krankheitsherdes die notwendige leukozytäre Rekrutierung ausbleibt. E-Selektin wird nur auf Endothelzellen exprimiert. Anders als P-Selektin wird es nicht gespeichert, sondern muß durch de novo Synthese als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz wie IL-1, TNF- $\alpha$  oder LPS erst gebildet werden. Wie alle Selektine bindet auch L-Selektin eine sialysierte Kohlenwasserstoff Determinante zwar selektiv, aber mit niedriger Affinität auf Endothelzellen und anderen Leukozyten. Die Funktion der Bindung der Selektine an ihre Liganden besteht darin, Zellen aus dem Blutstrom abzubremsen und in eine auf dem Endothel rollende Bewegung zu überführen. Das Ablösen des Leukozyten geschieht dabei nicht aufgrund der niedrigen Affinität der Selektine zu ihren Liganden, sondern wegen des schnellen Wechsels der Assoziations und Dissoziationskonstante [36]. Unter bestimmten Bedingungen aber, wie z.B. Entzündung, können Mitglieder der Superimmunglobulinfamilie stärker auf der endothelialen Oberfläche exprimiert sein und an Integrine auf der leukozytären Oberfläche binden. Da diese in niedrigaviden und hochaviden Zuständen vorliegen, entscheidet auch die Zahl aktivierter Integrine, die durch Chemokine reguliert wird und das passende Superimmunglobulin, ob es zu einer starken Scherfluß resistenten Bindung an das Endothel kommt.

Die Integrinfamilie umfaßt eine große Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, der größeren  $\alpha$ - und der kleineren  $\beta$ -Untereinheit. Jede Kombination kennzeichnet spezifische Bindungs- und Signaltransduktionscharakteristika. Integrine erfüllen eine Vielfalt unterschiedlichster Aufgaben. Sie sind sowohl an Vorgängen der Zelldifferenzierung als auch an der Apoptose und an der Anheftung des Epithels an extrazellulärer Matrix beteiligt, besonders aber auch am Scherfluß resistenten Arrest von Leukozyten. LAD I Patienten weisen eine Mutation in der  $\beta 2$ -Kette (CD 18) auf, mit der Folge, daß neutrophile Granulozyten nicht transmigrieren können und sich ein LAD II ähnliches Krankheitsbild ergibt.

Wichtig für ihre Funktion als Adhäsionsmoleküle sind Bindungsstellen für die zweiwertigen Kationen  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ . VLA-4, ein Integrin, das auf Monozyten und monozytoiden Zelllinien stark exprimiert ist, bindet einen Liganden auf Endothelzellen VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) und vermittelt auf diese Weise Zellarrest und Transmigration.

Andere Integrine, die für Monozyten eine Rolle für die Adhäsion an Endothelzellen spielen, sind Mac-1 ( $\alpha_M\beta_1$ ) und LFA-1 ( $\alpha_L\beta_1$ ), die beide an ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1) binden.

Die Liganden für Integrine werden auf Endothelzellen exprimiert und sind durch Zytokine induzierbar. Sie gehören zu der Familie der Superimmunglobuline, die als gemeinsames Merkmal das Vorhandensein mindestens einer Immunglobulin-Domäne aufweisen. Die beiden bedeutendsten Integrinliganden sind ICAM-1 für Mac-1 und LFA-1 und VCAM-1 für VLA-4. Hierbei ist zwar die Aktivierung durch Chemokine mit einer anschließenden Konformationsänderung von Integrinen beobachtet worden, doch ist der intrazelluläre Weg vom Chemokinrezeptor zur Konformationsänderung des Integrins trotz intensiver Forschung noch nicht geklärt. Nach dem Arrest der Zelle folgt eine Phase der Formänderung, die sich in einem Umbau des Zytoskeletts bemerkbar macht und zur Abflachung der Zelle und Bildung von Pseudopodien führt. Die Abflachung verringert den Widerstand gegenüber dem Blutstrom, und die Zellausläufer sind Grundvoraussetzung für die nun folgende Phase der Transmigration. Angelockt durch den Gradienten eines Chemokins, steuert der Leukozyt auf die interendothelialen Junktionen zu, bricht die Bindungen auf und zwingt sich durch die entstandene Lücke. Diese letzten Schritte sind auf molekularer Ebene bis heute kaum verstanden. Metalloproteinasen scheinen aber ein wichtiger Teil beim Aufbrechen der Proteinverbindungen zu sein.

### **2.3. Chemokine**

Die Entstehung und unterschiedliche Zusammensetzung entzündlicher Infiltrate bei verschiedenen Krankheitsprozessen ist wichtig für den Beginn und den Verlauf einer Entzündung. Dieser Prozess wird durch Chemokine kontrolliert. Die Anzahl neuentdeckter Mitglieder der Chemokinfamilie ist in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen, mittlerweile werden über 40 gezählt. Da anfangs die Rolle und Zusammengehörigkeit dieser kleinen Proteine unklar blieb, entwickelte sich eine verwirrende Nomenklatur aus Akronymen wie z.B. RANTES (Regulated upon Activation and Normal T-cell Expressed and Secreted), Massenbezeichnung wie z.B. IP-10 (interferon-inducible protein of 10 kd) oder IL-8, aus der Gruppe der Interleukine. Erst nachdem die Eigenschaft von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  und  $\beta$  (MIP-1 $\alpha$  und  $\beta$ ) als Lockstoffe für Leukozyten bekannt wurde [37-39], entdeckte man die gemeinsamen Strukturmerkmale der Chemokine.




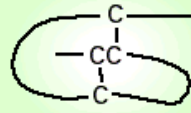

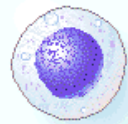
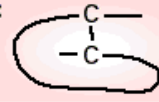
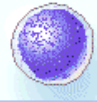

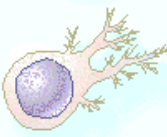

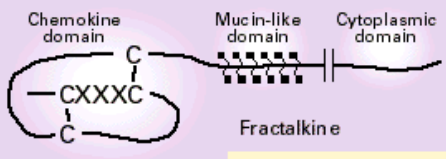
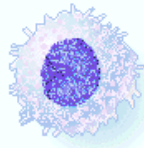
Chemokine	Receptor	Cell Type
<p>Chemokine receptor </p> <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES</p>	CCR1 CCR3	Eosinophil 
<p>MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES</p>	CCR2 CCR3	Basophil 
<p><b>CC</b></p> <p></p> <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK</p>	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
SDF-1	CXCR4	
<p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES MIP-3<math>\beta</math> (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)</p>	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
<p><b>C</b></p> <p></p> <p>PARC, DC-CK1 Lymphotactin</p>	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
<p><b>CXC</b></p> <p></p> <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES MIP-3<math>\alpha</math> (LARC, Exodus-1) MDC, TECK</p>	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Denritic cell 
SDF-1	CXCR4	
<p>Glutamic acid-leucine-arginine</p> <p>Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO-<math>\alpha</math>, -<math>\beta</math>, -<math>\gamma</math>; ENA-78; NAP-2; LIX</p>	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
<p><b>CXXXC</b></p> <p></p> <p>MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES</p>	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abb.2: Chemokinklassifikationsschema nach A. Luster [40]

Chemokine sind eine Gruppe 8-14 kd großer Proteine mit einer 20-70%igen Homologie in ihrer Aminosäuresequenz. Zwei große Familien sind charakterisiert worden, deren Zugehörigkeit anhand der N-terminalen Lage zweier benachbarter Cysteinreste [41] festgelegt wird. Die  $\alpha$ -Chemokine sind dadurch gekennzeichnet, daß ein beliebiger Aminosäurerest die beiden Cysteine von einander trennt und werden somit auch als CXC-Chemokine bezeichnet, während die  $\beta$ -Chemokine keine Trennung zwischen den Cysteinresten aufweisen und CC-Chemokine heißen. Zwei Mitglieder der Chemokinfamilie passen nicht in dieses Schema: Lymphotactin mit nur einem Cysteinrest (C-Chemokin) und Fractalkine (CXXXC), dessen beide Cysteine durch drei Aminosäurereste voneinander getrennt sind [42, 43]. Weiterhin kann man die CXC-Chemokine in zwei Gruppen aufteilen, die sich anhand des Vorkommens der N-terminalen Glutaminsäure-Leucin-Arginin Sequenz (ELR+) unterscheiden. Bis vor kurzem war man noch einhellig der Meinung, daß diejenigen mit dieser Sequenz (z.B. Gro- $\alpha$ , IL-8) nur chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken, diejenigen aber ohne diese Sequenz nur auf Lymphozyten(SDF-1), Basophile, Eosinophile und Monozyten Einfluß nähmen.

Die CC-Chemokine wirken dagegen nicht auf neutrophile Granulozyten sondern auf Monozyten, Lymphozyten, Basophile und Eosinophile mit unterschiedlicher Stärke und Selektivität. Auch hier sind die N-terminalen Aminosäuren entscheidende Komponenten für die biologische Aktivität. Modifiziert man beispielsweise die N-terminalen Aminosäuren des CC-Chemokins RANTES, erhält man einen sehr wirksamen Antagonisten, Met-RANTES [44]. Spaltet man die letzten 7-8 N-terminalen Aminosäurereste ab, erhält man ebenfalls Peptide [45] mit antagonistischen Eigenschaften.

Chemokine binden an Glykosaminoglykane, besonders an Heparin [46], die Polysaccharidkomponente von Proteoglykanen, die auf der Oberfläche von Zellen die Glykokalix bilden, aber auch Bestandteile der Extrazellulärmatrix sind. Beim Vergleich von in vivo und in vitro Versuchen fiel auf, daß die Selektivität, mit der Chemokine bestimmte Leukozyten in bestimmte Gewebe anziehen, in vivo höher ist. Die Vermutung ist, daß bestimmte Bindungsstellen auf dem Endothel Chemokine immobilisieren und die anrollenden Leukozyten aktivieren. So wird beispielsweise MIP-1 $\beta$  vorzugsweise assoziiert mit „high endothelial venules“ in Lymphknoten gefunden, wo es die Transmigration von T-Zellen ermöglicht [5]. RANTES dagegen ist auf mikrovaskulärem Endothel detektiert worden, wo es vornehmlich Monozyten und T-Zellen rekrutiert [9] und hierbei eine Rolle in der Transplantatabstoßung spielt.



Die Bindungspartner der Chemokine, die Chemokinrezeptoren, sind an G-Proteine gekoppelte 7-helikale Transmembranspanner. Sie befinden sich auf der Oberfläche von Leukozyten, aber auch auf anderen Zellarten wie Neuronen, Astrogliazellen oder Endothelzellen und erwirken über diese ihren biologischen Effekt. Obwohl Chemokinrezeptoren verschiedene Chemokine binden, sind sie doch jeweils auf CC- bzw. CXC-Chemokine beschränkt. Das mag an der unterschiedlichen Quartärstruktur liegen [40], denn die Primär- bis Tertiärstrukturen der beiden Familien ähneln sich stark. Bisher sind die Rezeptoren CCR1-CCR10, XCR1 für den Lymphotactinrezeptor, CX3CR1 für Fractalkine und für die CXC-Chemokine die Rezeptoren CXCR1-CXCR5 gefunden worden. Ähnlich wie viele andere Mitglieder G-Protein gekoppelter Rezeptoren löst eine Aktivierung des Rezeptors  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, Aktivierung der Proteinkinase C und Bildung von Inositol-3-Phosphat aus [47]. Da Pertussistoxin viele der signalinduzierten Effekte aufhebt, sind sie wahrscheinlich der Familie der Gi-Proteine zuzuordnen.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1. Humane umbilikale Venenendothelzellen**

Die Isolation von HUVEC wurde nach einem modifizierten Verfahren von Jaffe [124] durchgeführt. Es wurden Nabelschnüre aus der geburtshilflichen Abteilung des Rotkreuzkrankenhauses mit einem Alter von 6 bis 48 h verwendet. Jede Schnur wurde einzeln in sterile 100 ml Becher gegeben und bis zur Präparation im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Vorbereitung der Geräte und des Arbeitsplatzes in der Sterilbank, wurde die Schnur in den Bodenteil einer 15 cm Petrischale gelegt und äußerlich großzügig mit warmem (37°C) Isolationspuffer (phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ , PBS w/o) gespült, anhaftende Blutgerinnsel wurden dabei mit Pinzetten entfernt. Anschließend wurde an beiden Enden ein 1 cm langes Stück abgeschnitten und dabei die Schnur mit der Pinzette so gehalten, daß kein Kontakt zur Präparationsschale oder zur Flüssigkeit bestand. Danach wurde in die obere Öffnung der Nabelschnurvene eine leicht gewinkelte, an der Spitze gerundete Kanüle eingeführt und diese mit zwei bis vier Arterienklemmen so fixiert, daß später beim Befüllen der Schnur keine Flüssigkeit austreten konnte. Die Arterienklemmen wurden auf zwei Edelstahlhaken an einem Säulenständer mit der Kanülenöffnung nach oben so eingehängt, daß sich das Ende der nach unten hängenden Schnur einige Zentimeter über der Petrischale befand. Mit einer 20 ml Spritze wurde die Vene mehrmals mit warmem Isolationspuffer gespült, die Spritze mit warmer 0,1% Chymotrypsinlösung gefüllt, der restliche Puffer verdrängt, das untere Ende der Schnur mit einer weiteren Klemme verschlossen und die Vene mit Chymotrypsinlösung vollgepumpt. Die Nabelschnur mit anhängenden Klemmen und Spritze wurde im Deckel der Petrischale in den Inkubator gelegt. Einige Minuten später erfolgte eine Kontrolle auf Druckverlust und nötigenfalls wurde nach 30 min nachgespritzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Schnur über einem 50 ml Röhrchen mit 2 ml fötalem Kälberserum (FKS) auf dem Halter plaziert und die untere Klemme geöffnet. In den meisten Fällen war ein leichter Druck auf den Spritzen-stempel ausreichend, um das Ende der Schnur zu öffnen und die Flüssigkeit in das Röhrchen laufen zu lassen. Durch Spülen mit Isolationspuffer sollten noch anhaftende Zellen im Inneren der Vene ausgewaschen werden. Nach Zentrifugation für 8 min bei 800 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurde das Zellpellet in 5 ml EGM aufgenommen und in einer kollagenisierten 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bei 37°C für 3-4h inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen zur Entfernung nicht adhärerender Zellen (vor allem Erythrozyten) wurde erneut 5 ml EGM zugegeben. Die Anwesenheit von Fibroblasten läßt sich an ungefärbten Zellen im Mikroskop erkennen. Diese

Zellen sind im Vergleich zu HUVEC langgestreckt, teilweise mit Ausläufern und Verzweigungen versehen. Sie wachsen auf oder über den Endothelzellen, während HUVEC immer nur in einschichtiger Lage wachsen. In keiner Präparation war ein Anteil von mehr als 5% Fremdzellen zu finden. Je nach Ausbeute erreichten die Zellen in den T-25 innerhalb zwei bis sieben Tagen Konfluenz.

### **3.1.2. Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC)**

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen wurden von der Firma Clonetics bezogen und in MCDB 131 mit 10% FKS, 1mg/ml Hydrocortisonacetat, 5mM Dibutyryladenosinmonophosphat, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin, 25 mg/ml Amphotericin B kultiviert. Glasobjektträger oder 35 mm Petrischalen wurden mit 0.5% Gelatine vorbehandelt, um ein problemloses Anhaften zu ermöglichen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, und anhand der Morphologie wurde die Reinheit der Endothelzellkultur bestimmt.

### **3.1.3. Humane aortale Endothelzellen (HAEC)**

Humane aortale Endothelzellen wurden in Passage 2 von Clonetics geliefert. Zellkultur wurde auf die gleiche Art wie mit HUVEC, abgesehen von einem speziellen Medium von Clonetics betrieben.

### **3.1.4. Endothelzellpassage**

Zur Passage wurden die Endothelzellen zweimal mit warmem PBS gespült und anschließend mit warmem Trypsin-EDTA inkubiert. Der Ablösevorgang wurde mikroskopisch kontrolliert, und sofort nach Ablösung der Zellen wurden diese in ein Röhrchen mit FKS überführt, die Flasche mit warmem RPMI-1640 gespült und die restlichen Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführt. Mit RPMI-1640 wurde auf 50 ml aufgefüllt und 8 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 7 ml warmem EGM resuspendiert und in einen T-75 pipettiert, der zuvor für 45 min mit einer 40µg/ml konzentrierten Kollagenlösung bei 37°C vorbehandelt war und nach der Kollageninkubation mit PBS gewaschen wurde. Dies entspricht einer Verteilung von 1:3 und dem Passagestatus P2. Diese Zellen wurden entweder weiter passagiert, oder in RPMI-Freeze Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Höchstalter, der für Versuche verwendeten HUVEC war P4, von HMVEC P6, von HAEC P6.

### **3.1.5. Mono Mac 6 Zellkultur**

Diese freundlicherweise vom Erstbeschreiber Prof.H.W.L. Ziegler-Heitbrock zur Verfügung gestellte Zelllinie wurde in MM6-Medium (RPMI-1640, 10% FKS, 1mM Oxalacetat, 1mM Pyruvat, 1x nichtessentielle Aminosäuren-Lösung, 2x Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin supplementiert. Die Kultur erfolgte in 24er Gewebekulturplatten mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml zu je 2 ml Suspension pro Vertiefung. Mono Mac 6 Zellen adhären während der Kultur leicht am Boden des Kulturgefäßes und müssen bei der Passage mehrfach auf- und abpipettiert werden. Zur Entfernung von LPS ist ein Filtrationsschritt mit einem Gambro 2000 Ultrafilter notwendig.

Die Kultivierung und Inkubation erfolgte in einem Forma Scientific Steri-Cult 200 Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit.

### **3.1.6. Isolierung humaner Monozyten**

Die Monozytenisolierung wurde nach dem Protokoll der Firma Nycodenz ausgeführt, die die Kombination einer Dichtegradientenzentrifugation mit einer hyperosmolaren Lösung zur Monozytenseparation verwendet. Vollblut gesunder 20-40 Jahre alter Spender wurde 9:1 in Citrat- und 9:1 in 6% Dextran-Lösung aufgenommen und sedimentierte für 30 min.

Anschließend wurden jeweils 5-6 ml des so gewonnenen leukozytenreichen Plasmas vorsichtig über 3 ml Monomed 1.067 geschichtet und bei 600g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert.

Die obere plasmafarbene Schicht wurde verworfen und die untere klare mit den Monozyten in der Interphase bis zum Zellpellet in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und mit RPMI-1640 mit 5 mM EDTA und 0,5% BSA aufgefüllt. Die nun folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Mehrere Waschschrte bei 400 g waren erforderlich, um die restlichen Thrombozyten zu entfernen, was mikroskopisch kontrolliert wurde. Die Anzahl der Monozyten wurde bestimmt und für Flußversuche auf  $10^6$ /ml in HH eingestellt. Kurz vor Beginn der Versuche wurde Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> zu einer 1mM Endkonzentration zugeführt. Dieses Verfahren erlaubt eine Aufreinigung der peripheren Blutmonozyten zu etwa 85%, wie mit der durchflußzytometrischen Detektion des Monozytenmarkers CD14 nachgewiesen wurde.

### **3.1.7. Thrombozytenisolierung**

Alle Schritte bei diesem Protokoll wurden bei 37°C aufgrund der Temperaturempfindlichkeit von Thrombozyten unternommen. Zur Isolierung von Blutplättchen wird Vollblut gesunder junger Spender 9:1 mit Plättchenpuffer 1 verdünnt und 15 min bei 180 g zentrifugiert. Die obere Phase, das plättchenreiche Plasma, wird über ein 40% Albuminkissen geschichtet und bei 1200 g 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Zwischenschicht wurde in HH

aufgenommen und mittels Gelfiltration über eine Sepharose 2B beladene Säule vom Albumin getrennt. Die Plättchen wurden für Flußversuche in einer Konzentration von  $10^8$ /ml verwendet.

Thrombozyten wurden zur Aktivierung mit 0,5 U/ml Thrombin behandelt. Zur Immobilisierung auf Objektträgern wurden die Objektträger mit APES (3-aminopropyltriethoxysilane) behandelt. Glasobjektträger wurden für 2 Minuten in eine 4% Aceton APES Lösung getaucht, anschließend mit Aceton gespült und mit Aqua dest. gewaschen und abschließend bei  $100^\circ\text{C}$  getrocknet [48].

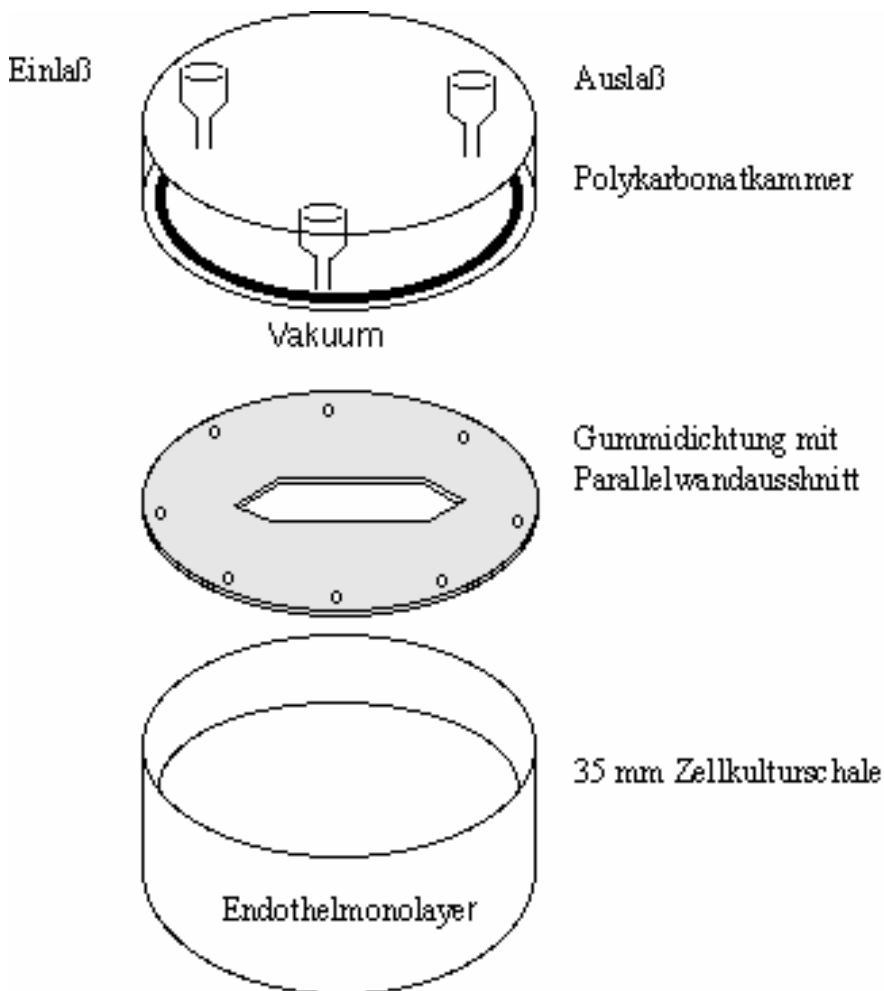
### **3.2. Adhärenzmessung in der Flußkammer**

Endothelzellen wurden in 35-mm Petrischalen kultiviert und erst dann verwendet, wenn vollständige Konfluenz erreicht war. Der einschichtige Zellrasen diente als Boden für die Flußkammer. Das Endothel wurde entweder unbehandelt gelassen oder mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  oder mit 100 U/ml TNF- $\alpha$  für 12h inkubiert. Humane Monozyten oder MM6 Zellen wurden in HH auf Eis gehalten und erst kurz vor Versuchsbeginn wurde  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  zu einer 1mM Endkonzentration zugefügt. Während der Perfusion wurden  $10^6$ /ml Monozyten in einem Wärmeblock bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten. Die Scherrate betrug bei allen Versuchen  $1,5 \text{ dyn/cm}^2$ . Die Petrischalen wurden auf dem Tisch eines invertierten Olympus IMT-2 befestigt und mit einer JVC 3CCD Videokamera und einem SRL900E Videorecorder wurden die Versuche auf Band aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Dabei entspricht ein Monitorfeld  $0,25 \text{ mm}^2$ . Um Chemokinrezeptoren zu blockieren, wurden die Monozyten oder MM6 Zellen mit den blockierenden Antikörpern CXCR2 10H2, CCR2 5A11, IgG2a Isotypkontrolle oder mit den blockierenden Chemokinanaloga 8-73 GRO- $\alpha$  ( $5\mu\text{g/ml}$ ), 9-76 MCP-1( $5\mu\text{g/ml}$ ) oder Met-RANTES ( $1\mu\text{g/ml}$ ) für 30 min auf Eis inkubiert. Endothelzellen wurden mit den monoklonalen neutralisierenden Antikörpern gegen GRO- $\alpha$ , MCP-1, RANTES oder der Isotypkontrolle für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und während der Versuche ständig präsent gehalten. Um eine Aktivierung der Monozyten über ihre Fc-Rezeptoren zu vermeiden, wurden sie für 30 min auf Eis mit 5% Humanserum blockiert.

Enzymatische Spaltung der Heparanproteoglykane wurde mit Heparitinase durchgeführt, wobei Heparitinase Heparitinase III entspricht und synonym gebraucht werden. 0,5 U/ml wurden für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  mit den Endothelzellen inkubiert und anschließend sorgfältig mit PBS gewaschen.

Bei den Versuchen zur Immobilisation von RANTES wurden für 5 min  $10^8$  Thrombozyten/ml mit 0,5 U/ml Thrombin behandelt. Entweder wurde zur Gewinnung der Überstände der Puffer

mit den aktivierten oder nicht aktivierten Plättchen mit  $0,2 \mu\text{m}$  Filtern steril filtriert und mit den Endothelzellen für 20 min inkubiert, oder aber die aktivierten oder nicht aktivierten Thrombozyten mit  $1,5 \text{ dyn/cm}^2$  für 20 min perfundiert. Anschließend wurden Monozyten perfundiert. Die Anzahl fest adhärierter Monozyten oder MM6 Zellen wurde von der 4.-6. Minute in mindestens 5 Feldern ( $0,27\text{mm}^2$ ) gezählt, wobei jedes Feld mindestens für 10s aufgezeichnet wurde. Es wurden nur primäre, direkte Adhäsionen mit dem Endothel gezählt. Sekundäre Interaktionen mit bereits adhärerten Zellen wurden nicht gewertet. Für die kontrollierten Ablösungsexperimente wurde die Scherrate alle 15s verdoppelt, die verbliebenen Zellen ausgezählt und in Prozent initial adhärierter Zellen ausgedrückt. Transmigrierende, oder Zellen, die eine Formänderung vollzogen, wurden nach 5 min Fluß ausgezählt und als Prozent fest adhärenter Zellen beschrieben.



**Abb.3:** Schema der Parallelwandflußkammer

### **3.3. Adhärenzmessung in aus Mäusen gewonnenen ex vivo perfundierten Karotiden**

Apo E knock-out Mäuse (Jackson Laboratories) oder C57BL/6 Mäuse wurden für 5 Wochen mit einer Western-type Diät (21% Fett) gefüttert und im Alter von 8-10 Wochen für Experimente verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe mit TNF- $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml intraperitoneal) behandelt, eine andere Gruppe erhielt eine Gefäßverletzung mit einem Führungsdraht eines Katheters (Becton Dickinson 10 pericardial effusion Katheter), um die Neointimabildung nach Ballonangioplastie nachzuahmen.

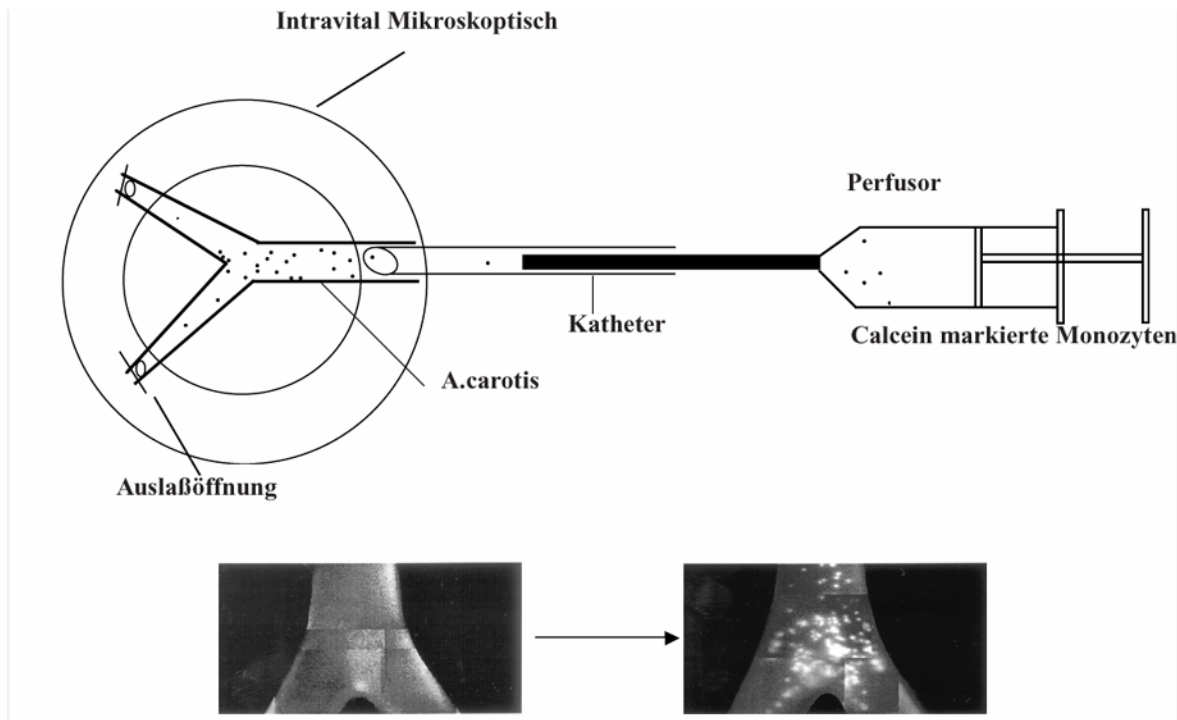
#### **3.3.1. Präparation**

23 bis 40 g schwere apoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (Jackson Laboratories) wurden mit einer intraperitonealen Pentobarbital (30mg/kg, Nembutal, Abott Laboratories) und Atropin (0,1mg/kg, Elkins-Sinn Inc.) Injektion anästhesiert, gefolgt von Ketamin (100mg/kg, Ketalar, Parke-Davis). Die rechte oder linke A. carotis communis wurde distal ligiert und ein Intramedic pericardial effusion 10 Katheter (Becton Dickinson Diagnostics) wurde über eine kleine Inzision eingeführt und in kranialer Richtung soweit vorgeschoben, bis die Katheterspitze proximal der Bifurktion lag. Während der ganzen operativen Prozedur (ca. 1 h) wurde die A. carotis mit Superfusionslösung, einer MOPS gepufferten und heparinisierten physiologischen Salzlösung, über eine Harvardpumpe perfundiert. Nachdem das das Gefäß umhüllende Bindegewebe mit dem N. vagus vorsichtig entfernt wurde, wurden die Enden der Aa. carotis interna und externa ligiert. Um einen ähnlichen Durchflußwiderstand in beiden Ästen zu erzeugen, wurden mit einer 30 gauge dünnen Nadel kleine Löcher in die Interna und Externa gestochen. Unter den verwendeten Perfusionsbedingungen resultierten Drucke zwischen 30 und 60 mmHg. Das Gefäß wurde distal der Ligaturen abgetrennt und auf einen Halter des Intravitalmikroskops gespannt und mit Superfusionslösung umspült.

#### **3.3.2. Ex vivo isoliertes, perfundiertes Karotismodell**

Monozyten oder Mono Mac 6 Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml Calcein für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, gewaschen und in MOPS-Puffer mit 1% HSA in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Mittels Trypanblau Färbung wurde gesichert, daß mehr als 95% der Zellen lebendig waren. Die Karotiden wurden mit oder ohne RANTES (150 ng/ml) 30 Minuten lang präperfundiert. Mono Mac 6 Zellen wurden mit oder ohne 200 ng/ml PTX (über Nacht) behandelt, anschließend calceingefärbt, gewaschen und mit oder ohne Met-RANTES (1  $\mu$ g/ml, 15 Minuten Inkubationszeit) behandelt. Zellsuspensionen wurden mit 10  $\mu$ l/min durch isolierte Karotiden infundiert. Die Perfusion und Adhäsion der fluoreszierenden

monozytischen Zellen wurde mit einem Stroboskop (Strobex; Chadwick-Helmuth) durch ein mit einem SW20 Immersionsobjektiv bestückten Mikroskop sichtbar gemacht, auf Video aufgenommen und nach 1,2,3,4 und 5 Minuten ausgezählt.



**Abb.4:** *Präparation einer isolierten, perfundierten A.carotis. Das Schema zeigt die Platzierung der Arterie auf einem Intravital Mikroskopisch. Das Gefäß wurde kontinuierlich mit einem Harvard-Perfusor durchspült und konstant mit 37°C warmer Superfusionslösung vor dem Austrocknen geschützt. Sowohl in die A. carotis externa, als auch in die A.carotis interna wurden gleichgroße Auslassöffnungen gestochen und am Ende ligiert, um gleichmäßigen Fluß zu ermöglichen. Mittels stroboskopischer Epifluoreszenz Videomikroskopie wurden die Interaktionen der fluoreszenzmarkierten Monozyten bei 20x Vergrößerung auf Band aufgezeichnet.*



Um eventuell entstandene Endothelschäden nachzuweisen, wurde 0,1% Evans'blue Farbstoff in MOPS-Puffer nach Abschluß eines jeden Experiments durch das Gefäß gespült, welcher selektiv Gebiete blau färbt, die Endotheldenudation aufweisen. Häufig konnten diese Schäden an der Stelle der Katheterinsertion nachgewiesen werden, jedoch nicht nahe der Bifurkation.

### **3.3.4. Immunhistochemie**

5 µm dicke Schnitte wurden von den explantierten und in Paraffin eingebetteten Karotiden angefertigt. Nach dem Aufbringen auf einen Objektträger wurden sie mit Xylol deparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Mit 3 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml Methanol wurde für 30 min die endogene Peroxidase blockiert und der Schnitt für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Ein 20 minütiges Kochen der Schnitte in unmasking solution begünstigte die spätere Detektion des Antigens durch den spezifischen Antikörper. Die Objektträger kühlten in der unmasking solution eine Stunde lang ab, bevor sie mit PBS für 5 min gewaschen wurden. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 10 ml Fischhautölgelatine (FSGO) in PBS, 1 ml normalem Pferdeserum (NHS) und 40 Tropfen Avidinlösung für 1h blockiert. Über Nacht inkubierten die Schnitte mit dem Primärantikörper in 3 ml PBS/FSGO, 150µl NHS und 12 Tropfen Biotinlösung bei 4°C. Die optimale Konzentration mit der geringsten unspezifischen Bindung betrug für den pAk (C-19) gegen Maus-RANTES 1,5 µg/ml, für den pAk (R-17) MCP-1 1µg/ml. Nach einem Waschschrift in PBS/FSGO wurde der sekundäre Biotin-konjugierte Antikörper 30 µl in 6 ml PBS/FSGO + 300 µl NHS für 1h inkubiert, anschließend ein weiterer Waschschrift durchgeführt. 30 min inkubierte der an Avidin gekoppelte HRP-Komplex (6 ml PBS ohne FSGO +120 µl A +120 µl B). Ein Waschschrift in reinem PBS folgte und das Chromogen DAB (1 Tablette in 10 ml PBS ohne FSGO + 7,5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) färbte für 5 min und wurde mit destilliertem Wasser gewaschen. 4 min wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Wasser wurde mit dreimaligem Waschen in absolutem Alkohol und zweimaligem Waschen in Xylol entfernt. Die Schnitte wurden mit Cytoseal und einem Deckglas eingedeckt, anschließend einem Durchlichtmikroskop und einem 100x oder 40x Objektiv betrachtet und mit einer Digitalkamera (Kodak) aufgenommen.

### **3.4. Durchflußzytometrie**

Monozyten bzw. Mono Mac 6 Zellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>6</sup> pro ml in 96er Platten aufgenommen. Monozyten wurden 30 min auf Eis mit 5% Humanserum inkubiert, um die Fc-Rezeptoren abzusättigen. Nach zweimaligem Waschen in RPMI-1640 + 5mM EDTA und 0.5% HSA wurden die monoklonalen Antikörper gegen CCR2 (5A11) und CXCR2 (10H2) 10µg/ml, in HHMC für 30 min auf Eis inkubiert. Weitere zwei Waschritte entfernten

die überschüssigen Antikörper, und der sekundäre FITC markierte anti-Maus IgG reagierte für zusätzliche 30 Minuten mit den Zellen. Nach letztem Waschen wurden 10000 Ereignisse pro Probe in einem FACScan (Becton Dickinson) analysiert.

Thrombozyten wurden wie oben beschrieben isoliert, für 20 Minuten mit 2% PFA fixiert, zweimal gewaschen und mit dem monoklonalen P-Selektin Antikörper (10µg/ml) AK-4 (Pharmingen) oder dem RANTES Antikörper VI-1 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde ein sekundärer FITC markierter, gegen Maus IgG gerichteter Antikörper, verwendet.

### **3.5. Immunfluoreszenz**

HMVEC wurden auf kollagenisierten Objektträgern bis zur Konfluenz wachsen gelassen, mit IL-1β über Nacht stimuliert, um sie dann für Flußversuche zu verwenden. HMVEC wurden wie in den Adhäsionsversuchen einem Fluß aus Thrombin aktivierten oder unbehandelten Plättchen für 20 min bei 37°C ausgesetzt. Nach Abnehmen der Flußkammer wurden die Endothelzellen mit 3,7% Formaldehyd für 20 min fixiert und unspezifische Bindungen 1h bei Raumtemperatur mit 10% hitzeinaktiviertem humanen Serumalbumin in PBS blockiert. Der primäre RANTES Ak VI-1 (5µg/ml) wurde für 1h auf den Endothelzellen inkubiert und zweimal in PBS gewaschen. Der sekundäre FITC-konjugierte Anti-Maus IgG Ak reagierte über Nacht bei 4°C mit den Zellen. Die Zellen wurden mit Moviol eingedeckt und mit einem Leica DMRBE Fluoreszenzmikroskop und einem 100x Ölimmersionsobjektiv betrachtet. Bilder wurden mit einer CCD Kamera und dem Programm Spot (Diagnostics Inc.) aufgenommen.

### **3.6. Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse der Flußexperimente wurden mit dem 2-seitigen nicht parametrischen Mann-Whitney-Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben ausgewertet. Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind in den Grafiken mit Sternen markiert.

### **3.7. ELISA**

96-well Platten (Maxisorb, NUNC) wurden mit dem Antikörper VL-3 (10 µg/ml) in PBS für 12 h bei 4°C inkubiert. Nach einstündigem Blocken mit 1% BSA in PBS wurde die Platte ausgeklopft und 2x mit dem Waschpuffer (0,05%Tween20 in PBS) gewaschen.

Anschließend wurden die Standardreihe und die Proben für 2h mit der Platte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen kam der Detektionsantikörper VL-1 HRP (1 µg/ml) in PBS+0,1% BSA hinzu und es wurde eine Stunde inkubiert. Nach

weiteren Waschschritten reagierte das Substrat ABTS mit dem HRP-konjugierten Antikörper, bis eine deutliche Grünfärbung zu sehen war. Über die Standardreihe ließ sich nun die Konzentration der Proben bestimmen.

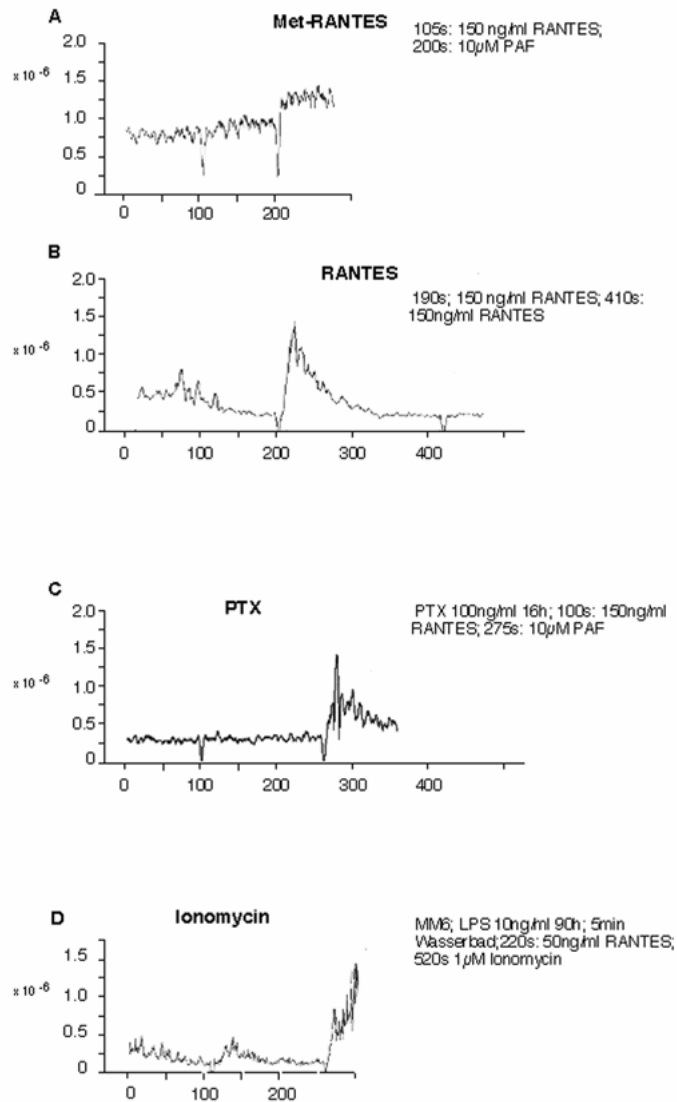
### **3.8. Calciummessung in MM6-Zellen**

Zur Bestimmung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration wurden die MM6-Zellen gepoolt, gezählt und einmal mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalz-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen in serumfreiem MM6-Medium resuspendiert. 0,4 ml der Zellsuspension wurde für den Leerwert zurückbehalten und mit 0,5  $\mu\text{L}$  DMSO versetzt, der restlichen Zellsuspension wurde dann der Fluoreszenzfarbstoff Fura2-AM in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Beladung mit Fura2-AM erfolgte im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 45 Minuten. In dieser Zeit erfolgte der Übertritt des membranpermeablen Fura2-Acetoxymethylesters in die Zellen und die Abspaltung der Estergruppe durch zytosolische Esterasen.

Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Hepes-Puffer in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zur Messung gelagert. Mit der für den Leerwert vorgesehenen Zellsuspension wurde entsprechend verfahren.

Um die Ausscheidung von Fura2-AM aus der Zelle etwas zu verzögern, wurde dem Puffer Probenecid in einer Konzentration von 1mM zugegeben, welches den in der Plasmamembran lokalisierten Anionen-Transporter hemmt, der u.a. auch für die Exkretion von Fura-2 aus dem Cytosol verantwortlich gemacht wird [49, 50].

Zur Bestimmung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in MM6-Zellen wurden jeweils 2,5 ml der Hepes-Puffer-Zellsuspension zusammen mit einem Rührfisch in Quarzküvetten aus optischem Glas verbracht, welche dann in die auf  $37^\circ\text{C}$  temperierte und mit einer Rührvorrichtung ausgestattete Küvettenhalterung des Spektrofluorometers gestellt wurde. Nach einer Equilibrierungs- und Anwärmungsphase von mindestens 5 Minuten wurde mit der Messung begonnen. Die eigentliche Messung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration erfolgte auf einem Küvetten-basierten Zweikanal-Micro-Spectrofluorometer *Deltascan Model 4000* der Firma *Photon Technologies International*.

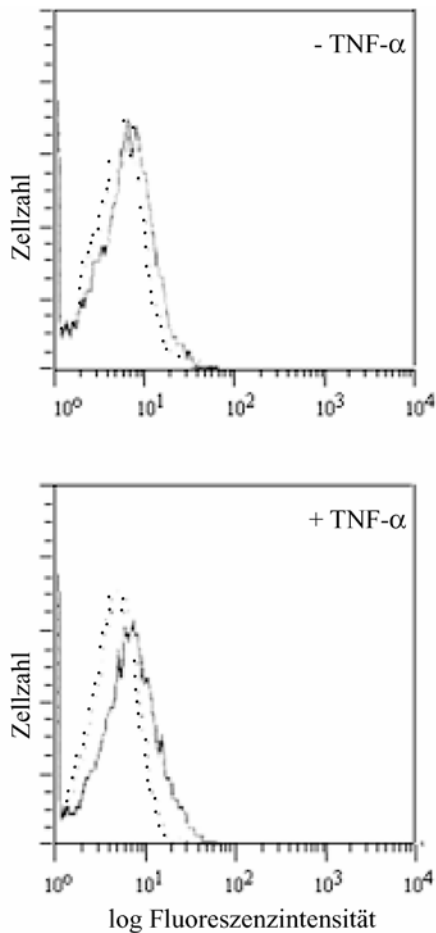


**Abb.5:** Messung von Calcium-Influx in mit LPS vorbehandelte Mono Mac 6 Zellen. Mit Met-RANTES vorbehandelte Zellen reagieren bei Zugabe von RANTES mit keinem Calcium-einstrom. PAF jedoch wird nicht durch Met-RANTES antagonisiert (A). RANTES alleine löst einen starken Calciumeinstrom aus (B), der mit PTX blockiert werden kann (C). Wiederum läßt PAF sich nicht antagonisieren. Ionomycin bewirkt maximalen Calciumeinstrom (D).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Endothelzellaktivierung mit TNF- $\alpha$ resultiert in erhöhter Oberflächenexpression von GRO- $\alpha$ und erhöhter MCP-1 Sekretion

Endothelzellaktivierung mit TNF- $\alpha$  resultiert in einer Hochregulierung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen aufgrund von de novo Gentranskription [51-53]. Verschiedene Chemokine binden an die Glykosaminoglykan Komponente von Proteoglykanen auf der Oberfläche von Leukozyten oder Endothelzellen, wo sie die biologische Wirkung verstärken [4, 54, 55]. Um die Oberflächenexpression von MCP-1 und GRO- $\alpha$  zu studieren, wurden HUVEC mittels Durchflußzytometrie analysiert, wobei monoklonale Antikörper gegen GRO- $\alpha$  und MCP-1 verwendet wurden. Für GRO- $\alpha$  wurden auf unstimulierten HUVEC niedrige Expressionslevel gemessen, die aber nach 12 stündiger Inkubation mit 100 U/ml TNF- $\alpha$  von  $13 \pm 3$  Kanälen auf  $29 \pm 11$  Kanäle mittlerer Fluoreszenzintensität stiegen (Abb.6). Im Gegensatz dazu war MCP-1 weder auf unstimulierten noch auf mit TNF- $\alpha$  stimulierten HUVEC nachweisbar. Die verstärkte Assoziation von GRO- $\alpha$  mit aktivierten HUVEC wurde noch durch einen Zelloberflächen-ELISA bestätigt; abermals war MCP-1 nicht detektierbar. Wurden die Endothelzellen vor der Antikörperinkubation mit Heparitinase behandelt, konnte auch GRO- $\alpha$  nicht mehr auf der Zelloberfläche gemessen werden. Dies weist auf eine Immobilisation durch Glykosaminoglykane hin (Abb. 7A). MCP-1 mußte folglich im Überstand zu finden sein, wohingegen das immobilisierte GRO- $\alpha$  weniger dort zu finden sein sollte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Überstände aktivierter HUVEC gesammelt, und die Konzentration an löslichem MCP-1 und GRO- $\alpha$  mittels Sandwich ELISA bestimmt.

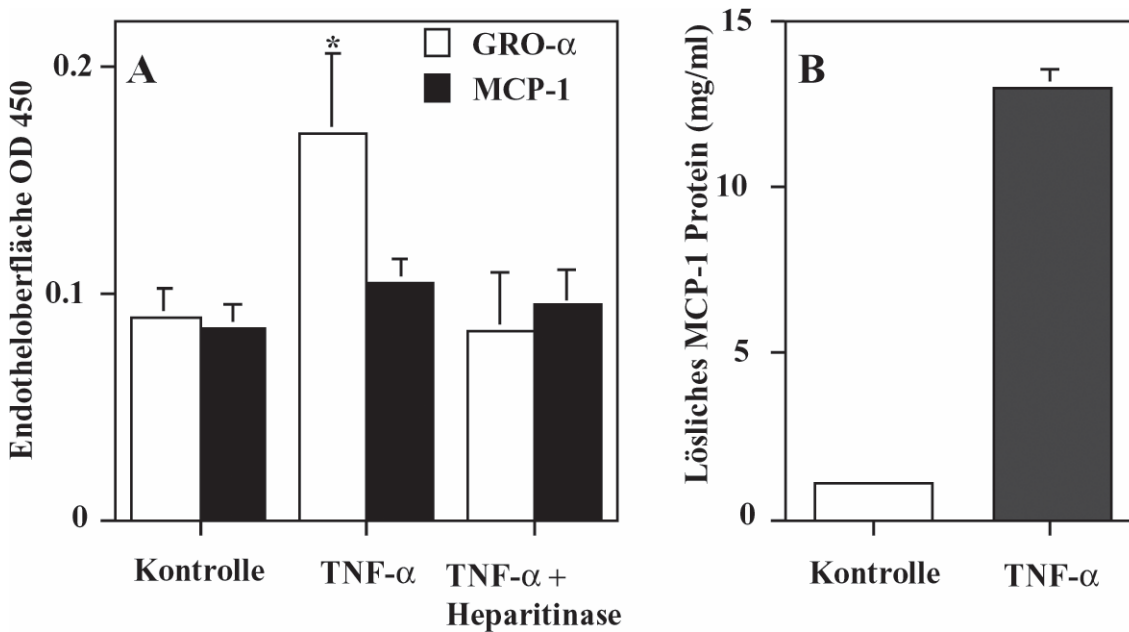


**Abb.6:** *TNF reguliert die Oberflächenexpression von GRO- $\alpha$  auf Endothelzellen hoch. Ruhende oder mit TNF aktivierte HUVEC wurden mit Antikörpern gegen GRO- $\alpha$  (durchgezogene Linie) oder mit Isotypkontrollantikörper (gepunktete Linie) gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Die Histogramme sind repräsentativ aus drei unabhängigen Experimenten.*

Darin erreichte MCP-1 eine durchschnittliche Konzentration von 13 ng/ml, GRO- $\alpha$  hingegen nur ca. 1,5 ng/ml (Abb.7B).

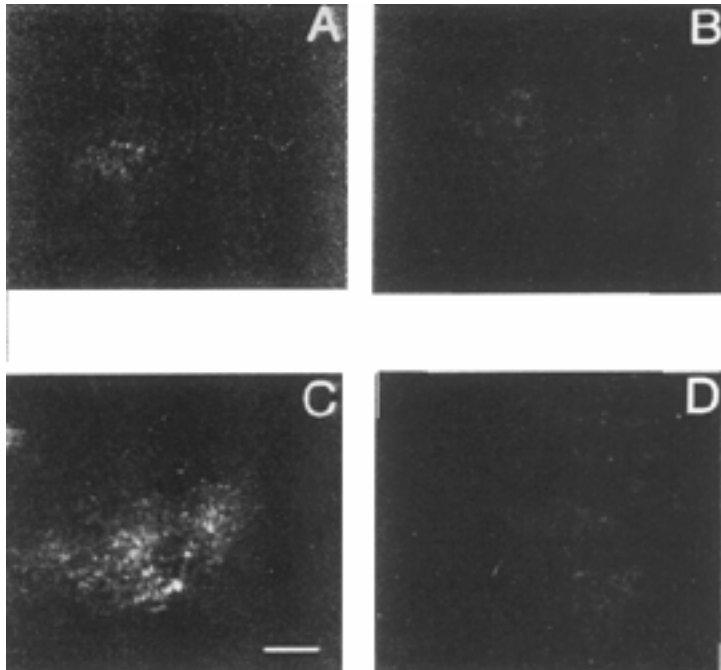
Um GRO- $\alpha$  Immobilisation auf aktiviertem Endothel nachzuweisen und sichtbar zu machen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von auf beschichteten Glasobjektträgern aufgewachsenen HUVEC durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein mAK gegen Integrin- $\beta$ 2 Ketten verwendet, der einen kaum erkennbaren Hintergrund anfärbte. Wurde unbehandeltes Endothel mit mAK gegen GRO- $\alpha$  oder MCP-1 inkubiert, resultierte ein kaum höheres Signal (Abb8A, B). Ein deutliches granuläres Immunfluoreszenzmuster dagegen ergab sich mit dem GRO- $\alpha$  mAK auf mit TNF- $\alpha$  behandelten HUVEC. Mit der Vorstellung, daß GRO- $\alpha$  ähnlich wie IL-8 (10) und andere Chemokine (20) spezifisch an bestimmte Heparanproteoglykane bindet, entfernte die Zugabe von Heparitinase mögliche

Bindungsstellen. Eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung gegen GRO- $\alpha$  zeigte immensen Intensitätsunterschied zur Färbung ohne enzymatische Vorbehandlung (Abb.8D). Wie schon zuvor in den Versuchen mit dem ELISA war auch hier kein Intensitätszuwachs mit dem MCP-1 mAk zu erkennen (Abb.8B).



**Abb.7:** *TNF- $\alpha$  induziert Endothelzelloberflächenexpression von GRO- $\alpha$ , aber nicht von MCP-1 und Sekretion von löslichem GRO- $\alpha$  und MCP-1. HUVEC wurden unbehandelt gelassen oder mit TNF- $\alpha$  oder Heparitinase inkubiert. Überstände wurden sterilfiltriert, Zellen sorgfältig gewaschen. Mit einem ELISA wurde die Assoziation von GRO- $\alpha$  und MCP-1 mit der Endothelzelloberfläche bestimmt (A) und in gelöster Form im Überstand quantifiziert (B). Die Daten sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung angegeben. \* kennzeichnet  $p < 0.05$*

Soweit kann gefolgert werden, daß GRO- $\alpha$  auf aktivierten HUVEC vorhanden ist und über Heparanproteoglykane immobilisiert wird, MCP-1 dagegen in löslicher Form vorliegt.

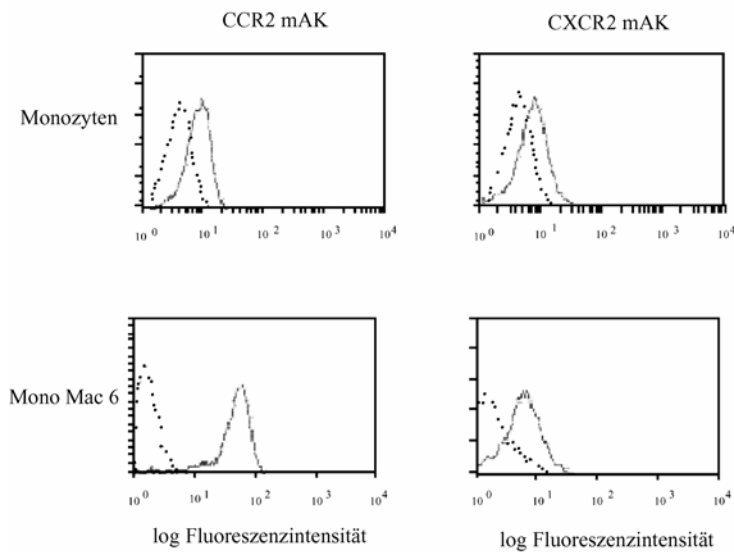


**Abb.8:** Die Immobilisation von GRO- $\alpha$  auf Endothelzellen wird durch TNF- $\alpha$  induziert und durch Heparitinase gespalten. Immunfluoreszenzfärbung auf ruhenden (A) oder TNF- $\alpha$  aktivierten HUVEC (B-D) wurde mit einem mAk gegen MCP-1 (B) oder GRO- $\alpha$  (A,C und D) durchgeführt. HUVEC wurden mit Heparinase behandelt (D). Gezeigt werden repräsentative Abbildungen dreier unabhängiger Experimente. Der Skalierungsbalken kennzeichnet 10  $\mu$ m.

#### 4.2. Expression von CCR2 und CXCR2 auf Monozyten

Monozyten und Mono Mac 6 Zellen sprechen funktionell gut auf MCP-1 und GRO- $\alpha$  an, müssen also auch die entsprechenden Chemokinrezeptoren tragen wie z.B. CCR2 und CXCR2 [6,8,21-23]. Deren Oberflächenexpression verglichen wir auf menschlichen Monozyten isoliert aus Vollblut mit Mono Mac 6 Zellen, welche eine ähnliche Integrinbesetzung zeigen [24]. Die Analyse der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Versuche ergab eine ähnliche Expression von CXCR2 auf beiden Zellarten, während CCR2 auf Mono Mac 6 Zellen viel höher exprimiert war (Abb. 9). Die Expressionslevel auf diesen Zellen waren vergleichbar mit den Daten früherer Publikationen [6,25,26].





**Abb.9:** CCR2 und CXCR2 Expression auf isolierten humanen Monozyten und Mono Mac 6 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit einem Isotyp Kontrollantikörper (gepunktete Linie) oder mit den monoklonalen Antikörpern gegen CCR2 und CXCR2 (durchgehende Linie) gefärbt und in einem Durchflußzytometer unter Verwendung entsprechender Scatter Gates analysiert. Gezeigt sind repräsentative Histogramme.

#### 4.3. Unterschiedliche Rollen von CCR2 und CXCR2 in Mono Mac 6-Endothel-Interaktionen unter Flußbedingungen

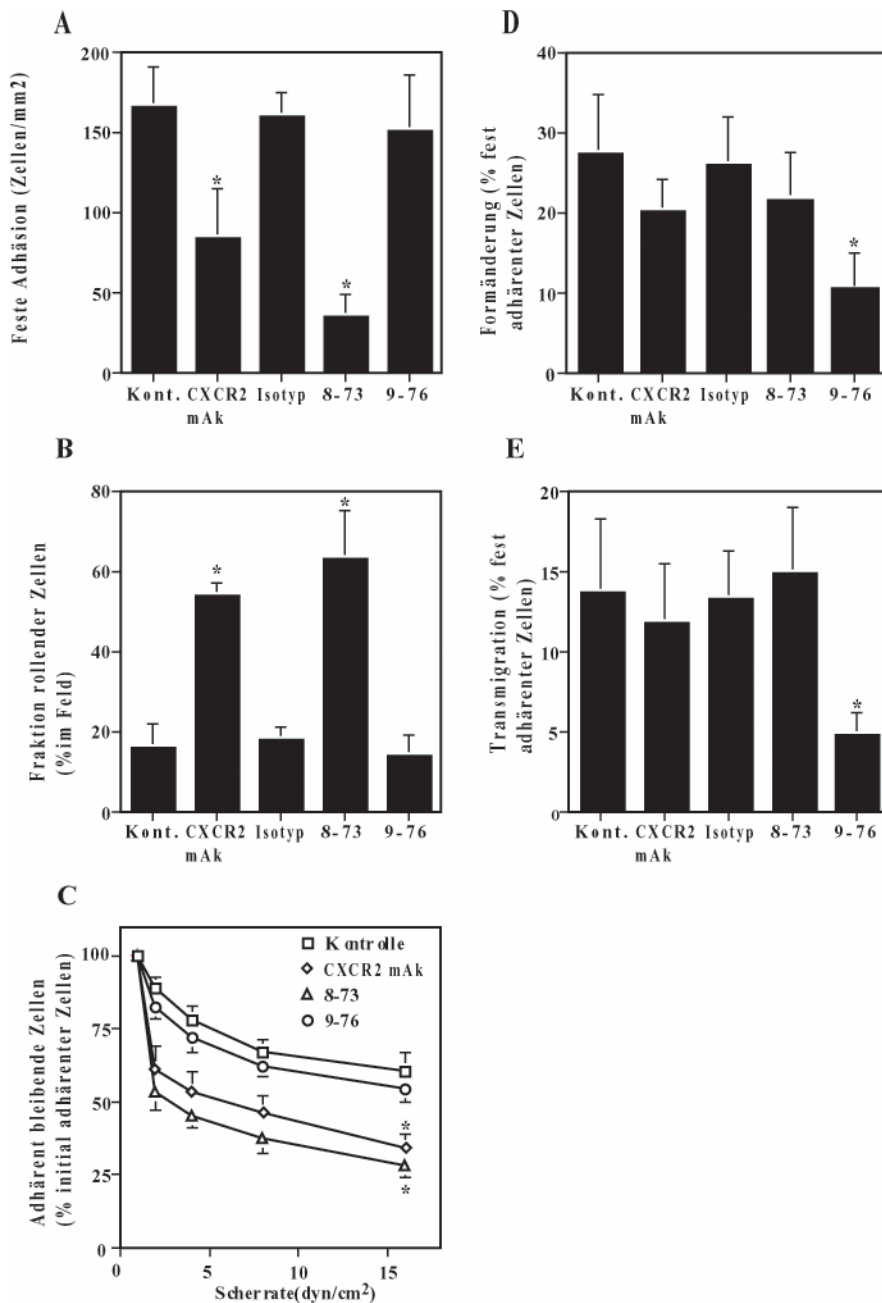
Um die funktionelle Relevanz dieser Befunde herauszufinden, wurden Primärinteraktionen von Mono Mac 6 mit HUVEC unter physiologischem Scherfluß untersucht. Mit TNF- $\alpha$  aktivierte HUVEC dienten einer Parallelwandflußkammer als Boden, über den die monozytischen Zellen mit einer Scherrate von 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> perfundiert wurden. Nach einer kurzen Rollphase konnte ein Teil der Zellen fest adhären, so daß nach einer Zeitspanne von 5 Minuten 166 $\pm$  25 Zellen/mm<sup>2</sup> ausgezählt werden konnten (Abb.10A). Es wurden nur direkte Interaktionen von Mono Mac 6 mit den Endothelzellen, aber keine Wechselwirkung mit bereits adhärenen Mono Mac 6 berücksichtigt. Wurde CXCR2 auf den Mono Mac 6 Zellen mit dem mAk 10H2 blockiert, reduzierte sich die Zahl adhärenter Zellen signifikant, während der Isotypkontrollantikörper keinen Effekt hatte (Abb.10A). Interessanterweise reduzierte der CXCR2 Antagonist 8-73, ein Peptidteil des Chemokins GRO- $\alpha$  [56], die Zahl fest adhärenter Zellen wesentlich stärker als der blockierende Antikörper 10H2, obwohl

auch er selektiv die Bindung von GRO- $\alpha$  an CXCR2 und nicht CXCR1 verhindert. Ein selektiver Antagonist für CCR2,-9-76, dem genau wie dem GRO- $\alpha$  Antagonisten 8-73 die N-terminalen Aminosäuren fehlen, in der gleichen Konzentration angewendet, brachte keine Verringerung des Mono Mac 6 Zellarrests mit sich und diente damit auch als Peptidkontrolle (Abb. 10A). Zusätzlich wurde noch die Anzahl rollender Zellen als ein umgekehrtes Maß festen Arrests analysiert. Der CXCR2 Antagonist 8-73 und der blockierende Antikörper 10H2 erhöhten den Anteil rollender Zellen, verglichen mit allen Mono Mac 6-Endothel Interaktionen (Abb.10 B). Überhaupt war diese Zahl an Gesamtinteraktionen durch keine Behandlung verändert, so daß gefolgert werden kann, daß das initiale Anheften der Zelle aus dem Strom heraus, das „capturing“, nicht durch die verwendeten Antikörper oder Peptide beeinflussbar ist. Kontrollierte Ablösungsversuche, bei denen die Scherrate alle 15 Sekunden verdoppelt wird, wurden unternommen, um die Festigkeit der Bindung zu prüfen. Nur wenige Zelle lösten sich in der Kontrollgruppe sofort, die meisten blieben auch bei hoher Scherrate adhärent (Abb.10 C). Vorbehandlung der Mono Mac 6 Zellen mit dem mAk 10H2 oder mit dem GRO- $\alpha$  Antagonist 8-73, nicht aber mit dem MCP-1 Antagonisten 9-76, verringerten die Scherresistenz deutlich bei 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> (Abb.10 C).

Nach fester Adhäsion unterzogen sich einige Zellen einer Formveränderung, sichtbar durch den Fokusverlust, der durch ihre Abflachung zustande kam. Einige wenige verschwanden teilweise unter den Endothelzellen, was als Transmigration gewertet wurde. 27.3 $\pm$ 7.4% der Kontrollzellen unterliefen einer Formveränderung, während 13.7 $\pm$ 4.6% nach 5 Minuten transmigriert waren (Abb. 10 D,E). Vorbehandlung mit CXCR2 mAk oder 8-73 schien das Abflachen der Zellen ein wenig zu reduzieren, die Transmigration blieb jedoch unverändert. Mehr als 50% Reduktion sowohl der Transmigration als auch der Formveränderung wurden aber bei Vorbehandlung mit dem MCP-1 Antagonisten 9-76 beobachtet (Abb.10 D,E).

Wurden beide Peptidantagonisten zusammen mit den Zellen inkubiert, konnte weder ein höherer Effekt auf den Arrest, noch auf die Transmigration festgestellt werden.

Diese Daten weisen auf die Funktion von GRO- $\alpha$  in Bezug auf Umwandlung von rollenden Zellen in festen Arrest unter Zunahme der Bindungsstärke hin, wohingegen MCP-1 bei den in der Adhäsionskaskade nachfolgenden Schritten der Formänderung und Transmigration eine Bedeutung zukommt.

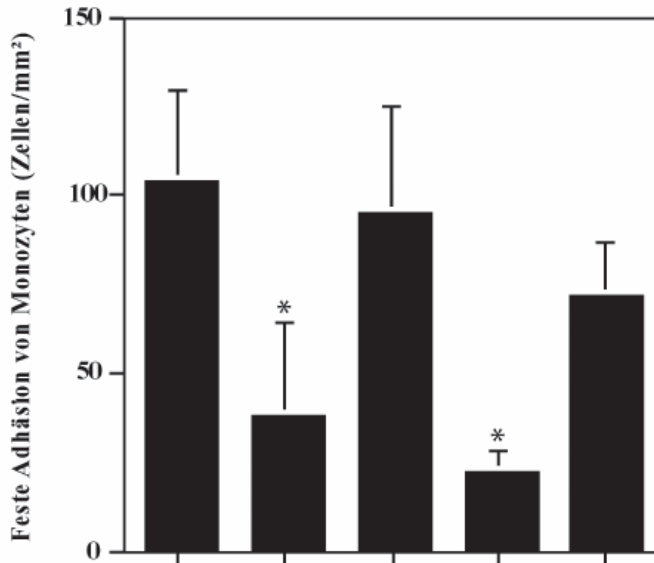


**Abb.10:** Einfluß der Chemokinrezeptoren CCR2 und CXCR2 auf scherresistente Adhäsion, Rollen, Spreading und Transmigration von Mono Mac 6 Zellen auf mit TNF- $\alpha$  aktiviertem Endothel. Mono Mac 6 Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen CXCR2 oder mit einem Isotypkontrollantikörper (10  $\mu$ g/ml), 8-73 GRO- $\alpha$  Analogon oder MCP-1 Analogon (5  $\mu$ g/ml) präinkubiert und mit 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> für 5 Minuten perfundiert. (A) Die Zahl fest adhärenter Zellen wurde in mehreren Feldern ausgezählt und als Zellen/cm<sup>2</sup> dargestellt. (B) Die Fraktion mit verringerter Geschwindigkeit rollender Zellen wurde in mehreren Feldern ausgezählt und als Prozent der Zellen pro Feld beschrieben. (C) Die Scherresistenz wurde bestimmt, indem die Scherrate allmählich gesteigert wurde und die noch fest haftenden Zellen gezählt wurden. Die Daten wurden als Prozent initial adhärenter Zellen festgehalten. (D,E) Zellen mit einer Formänderung oder Spreading (D) und Transmigration wurden in mehreren Mikroskopfeldern ausgezählt und als Prozent fest adhärenter Zellen ausgedrückt. Die Daten repräsentieren Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung vier unabhängiger Experimente. \*kennzeichnet  $p < 0.05$ .

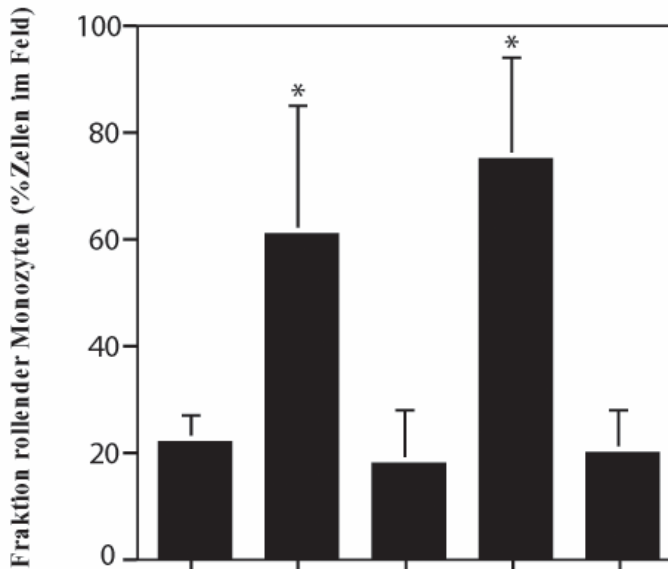
#### **4.4. Unterschiedliche Rollen von CCR2 und CXCR2 unter Flußbedingungen für Monozyten-Endothel-Interaktionen**

Ähnliche Experimente wurden mit Monozyten, die frisch aus Vollblut isoliert waren, durchgeführt. Bei niedriger Scherrate wurde auf TNF- $\alpha$  stimuliertem Endothel nach initialem Kontakt mit dem Endothel und Rollen schnell feste Adhäsion sichtbar (Abb.11 A). Innerhalb von 5 Minuten akkumulierten  $104 \pm 26$  Kontrollzellen pro  $\text{mm}^2$  (Abb.11A). Genau wie bei den Mono Mac 6 reduzierte sich durch Inkubation der Monozyten mit CXCR2 mAK oder 8-73 die Zahl fest adhärenter Monozyten im Gegensatz zur Behandlung mit 9-76 bzw. Isotypkontrollantikörper (Abb. 11A). Der CXCR2 mAk, der GRO- $\alpha$  Antagonist, aber nicht der MCP-1 Antagonist, erhöhte die Fraktion rollender Monozyten und verringerte im Gegenzug die Fraktion fest adhärenter Zellen (Abb.11B). Ein prozentualer Anteil von  $35.8 \pm 7.8\%$  der adhärenter Zellen unterlief entweder eine Formveränderung oder transmigrierte unter die Endothelzellen (Abb. 11C). Ähnlich den Ergebnissen bei Mono Mac 6 Zellen, war auch bei der Formänderung und Transmigration der Monozyten wiederum der MCP-1 Antagonist in der Hemmung aktiv, im Gegensatz zu dem GRO- $\alpha$  Antagonisten und dem CXCR2 mAK 10H2 (Abb. 11 C). Das bestätigt die mit Mono Mac 6 gewonnenen Daten: MCP-1 und sein einziger Rezeptor CCR2 sind für die der Adhäsion von Monozyten folgenden Ereignisse auf dem Weg der Gefäßevasion, nämlich Formveränderung und Transmigration, verantwortlich, GRO- $\alpha$  aber und sein Rezeptor CXCR2 sind wichtig für die mittleren Schritte der Adhäsionskaskade, nämlich die Umwandlung von rollenden Zellen in festen Arrest.

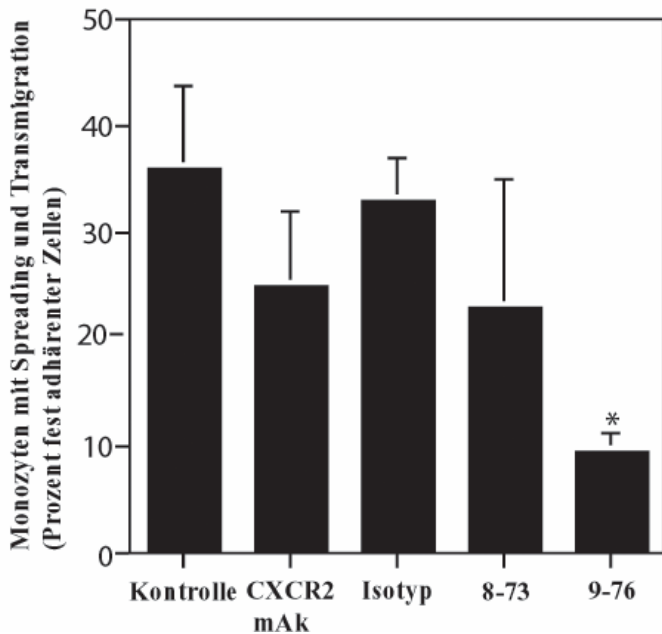
A



B



C



**Abb.11:** Rolle von CXCR2 und CCR2 beim Arrest, Rollen und der Transmigration isolierter humaner Monozyten im Scherfluß auf aktivierten Endothelzellen. Konfluente HUVEC wurden mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Monozyten wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen CXCR2 oder mit einem Isotypkontrollantikörper (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 8-73 GRO- $\alpha$  Analogon oder MCP-1 Analogon (5  $\mu\text{g/ml}$ ) präinkubiert und mit 1,5  $\text{dyn/cm}^2$  für 5 Minuten perfundiert. (A) Die Zahl fest adhärenter Zellen wurde in mehreren Feldern ausgezählt und als Zellen/ $\text{cm}^2$  dargestellt. (B) Die Fraktion mit verringerter Geschwindigkeit rollender Zellen wurde in mehreren Feldern ausgezählt und wird als Prozent der Zellen pro Feld beschrieben. (C) Zellen mit Spreading oder Transmigration wurden in mehreren Mikroskopfeldern ausgezählt und als Prozent fest adhärenter Zellen ausgedrückt. Daten repräsentieren Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. \*kennzeichnet  $p < 0.05$ .

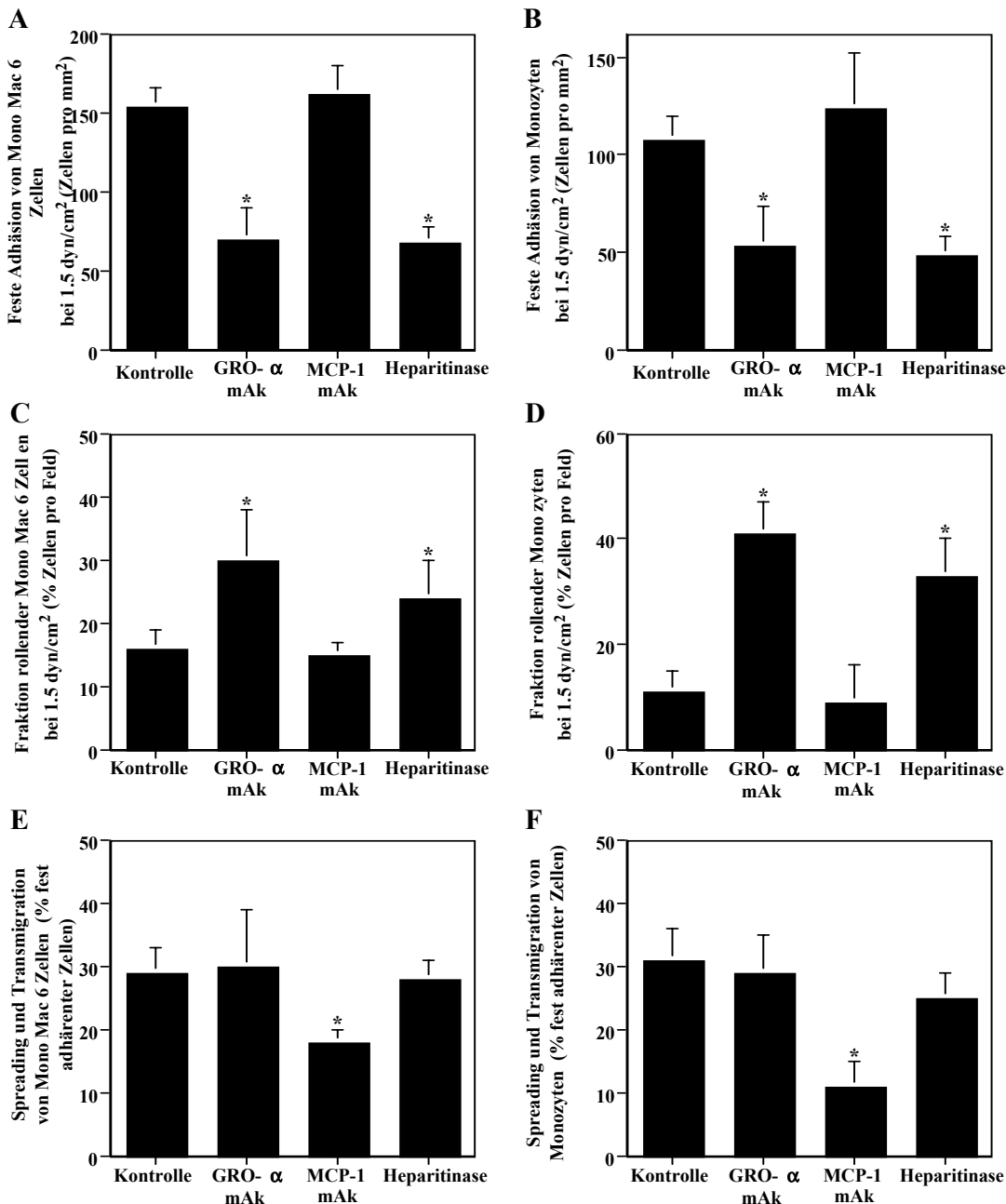
#### **4.5. Unterschiedliche Rollen von GRO- $\alpha$ und MCP-1 bei Monozyten-Endothel-Interaktionen unter Scherflußbedingungen**

Obwohl CCR2 und MCP-1 gegenseitig als einzige Bindungspartner zu Verfügung stehen, war immer noch die Möglichkeit gegeben, daß andere CXC Chemokine auf den aktivierten HUVEC präsent waren, so daß die Blockade der Chemokinrezeptoren mittels Antikörper oder Peptidantagonisten nicht eine Beteiligung anderer Chemokine ausschloß.

Folglich wurden die Chemokine MCP-1 und GRO- $\alpha$  mit blockierenden mAk mit den Endothelzellen inkubiert und während des Flußversuchs präsent gehalten. Konsistent mit den vorigen Ergebnissen verringerte sich die Zahl adhärenter Mono Mac 6 wie Monozyten (Abb. 12 A,B), mit der Konsequenz erhöhter Zahl rollender Zellen (Abb. 12 C,D) nur bei Blockade von GRO- $\alpha$ . MCP-1 Blockade, nicht aber GRO- $\alpha$  hingegen, führte bei der Analyse der Formveränderung und Transmigration zu dem Ergebnis einer starken Bedeutung von MCP-1 für die Transmigration (Abb. 12 E,F). Vorbehandlung des Endothels mit Heparitinase um gebundenes GRO- $\alpha$  zu entfernen reduzierte festen Arrest, aber nicht den Anteil transmigrierender oder sich ausbreitender Zellen (Abb. 12 A-F). Bemerkenswerterweise resultierte die Heparitinasebehandlung in einer Verringerung der Zahl rollender Zellen im Vergleich mit GRO- $\alpha$ , wenn sie auch immer noch höher als die Zahl in der MCP-1- oder Kontrollgruppe war.

Diese Daten zeigen, daß GRO- $\alpha$  auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen über Heparanproteoglykane immobilisiert und präsentiert wird, mit dem Ergebnis einer effizienten Umwandlung von Rollen in feste, scherresistente Adhäsion. MCP-1 aber unterstützt das sich Ausbreiten und Abflachen der Monozyten mit anschließender Transmigration durch den interendothelialen Spalt.

Interessanterweise war die Formveränderung der Monozyten sehr viel häufiger, wenn die Adhäsion unter Scherfluß stattfand und nicht unter statischen Bedingungen (Abb.12A,B). Dies wurde mit einer quantifizierenden Analyse bestätigt, die den prozentualen Anteil formverändernder oder transmigrierender Zellen in Fluß gegenüber statischen Bedingungen nach 5 Minuten verglich (Abb.12C). Dieses Ergebnis impliziert, daß Scherfluß notwendig ist, um einen Gradienten eines löslichen Chemokins zu erstellen und aufrechtzuerhalten, der die zur Transmigration notwendigen Aktivierungsschritte auslöst. Die hemmenden Effekte des MCP-1 Antagonisten und des blockierenden Antikörpers weisen auf eine fundamentale Rolle des löslichen Chemokins MCP-1 bei diesem Extravasationsschritt hin.



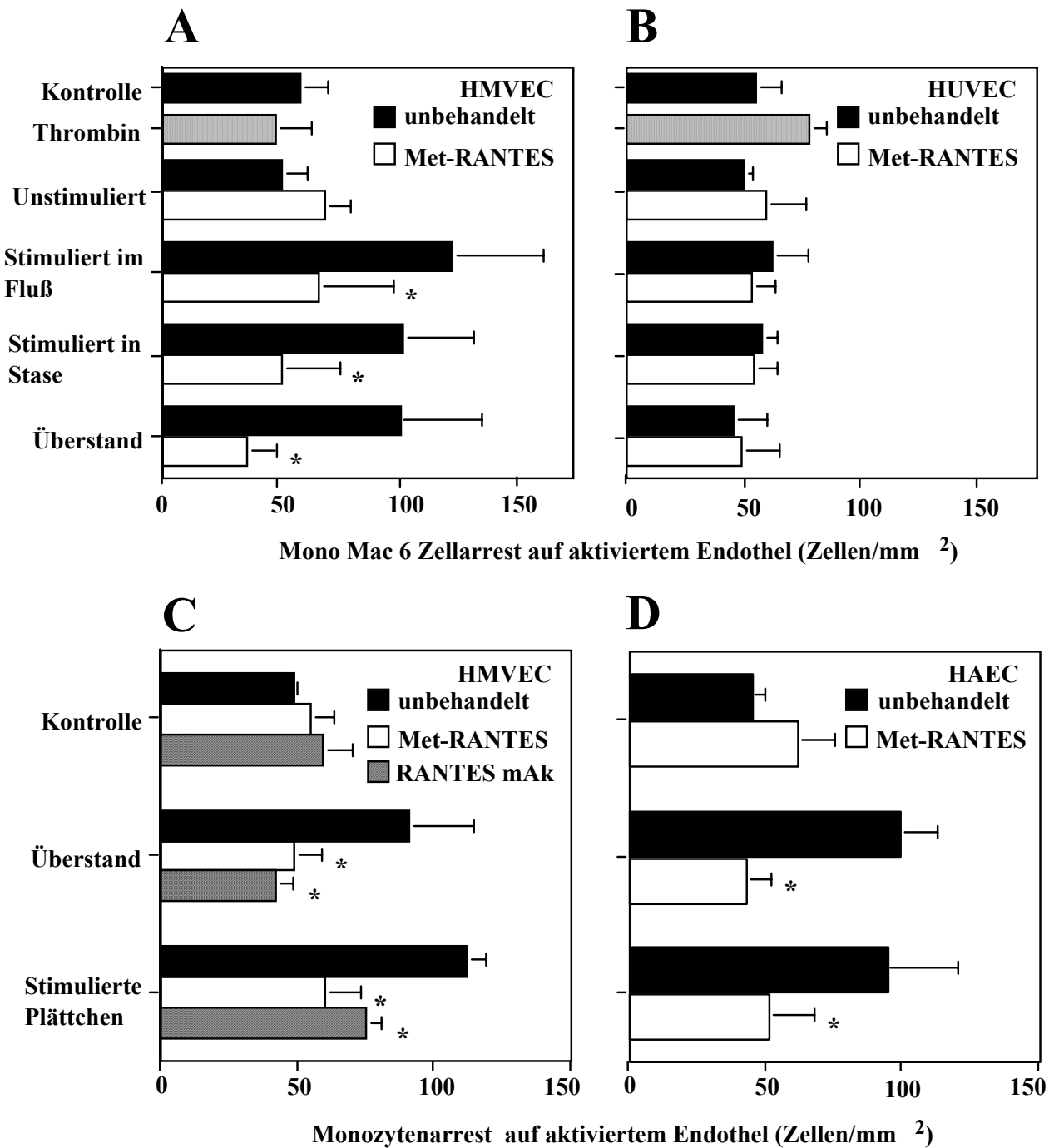
**Abb.12:** Veränderungen bei Arrest, Rollen oder Transmigration monozytischer Zellen auf aktiviertem Endothel unter Scherflußbedingungen wenn MCP-1 und GRO-α neutralisiert werden. Konfluente HUVEC wurden mit TNF-α stimuliert und für 30 Minuten mit blockierenden Antikörpern gegen MCP-1, GRO-α, einem Isotyp Kontrollantikörper (10 µg/ml) inkubiert, der während des Versuchs präsent gehalten wurde oder mit Heparitinase behandelt war. Monozyten wurden bei 1.5 dyn/cm<sup>2</sup> 5 Minuten perfundiert. (A,B) Die Zahl fest adhärenter Mono Mac 6 Zellen (A) oder Monozyten (B) wurde in mehreren Feldern bestimmt und als Zellen/cm<sup>2</sup> ausgedrückt. (C,D) Mono Mac 6 Zellen (C) oder Monozyten (D), die mit reduzierter Geschwindigkeit rollten, wurden in mehreren Feldern ausgezählt und als Prozent Zellen pro Feld ausgedrückt. (E,F) Mono Mac 6 Zellen (E) oder Monozyten (F) mit Spreading oder Transmigration wurden in mehreren Feldern bestimmt und als Prozentsatz fest adhärenter Zellen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt. \* bezeichnet p<0.05

#### **4.6. RANTES löst auf mit Thrombozyten vorbehandeltem Endothel Monozytenadhäsion aus**

Um herauszufinden, ob Plättchen selbst oder ihre sekretorischen Produkte verantwortlich für die initiale Monozytenadhäsion sind, wurden endotheliale Monolayer mit IL-1 $\beta$  behandelt und aktivierten versus nicht aktivierten und fließenden versus statischen Thrombozyten exponiert oder mit deren Überständen inkubiert. Monozytische Mono Mac 6 Zellen wurden anschließend mit 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> über das Endothel laufen gelassen und primär adhärenente Zellen wurden nach 5 Minuten Akkumulation gezählt. Nach Präperfusion mit Thrombin behandelten Thrombozyten auf aktivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC) und ebenfalls unter statischen Bedingungen, konnte ein Anstieg der adhärenenten Zellen um das 2-fache beobachtet werden (Abb.13 A). Auf unstimuliertem Endothel war kein adhärenieren der Zellen festzustellen. Überstände aktivierter, nicht aber unstimulierter Plättchen, oder Thrombin alleine vermochten die Zellakkumulation zu steigern (Abb.13 A). Das läßt lösliche Faktoren stimulierter Thrombozyten vermuten und schließt direkte Thrombineffekte als Ursache aus.

Da bekannt ist, daß Thrombozyten RANTES sezernieren, wenn sie aktiviert werden und daraufhin den Inhalt ihrer Granula freisetzen [17], studierten wir die Rolle von RANTES für den Monozytenarrest auf von Plättchen konditioniertem mikrovaskulären Endothel. Der durch die aktivierten Plättchen und ihre Überstände hervorgerufene Effekt konnte durch die Blockade der RANTES-Rezeptoren mit dem Peptidantagonist Met-RANTES vollständig aufgehoben werden [44]. Eine ähnliche Hemmung der Akkumulation konnte mit einem monoklonalen blockierenden RANTES Antikörper erreicht werden (Abb.13 A). Diese Ergebnisse zeigen, daß das sezernierte Plättchenprodukt das Chemokin RANTES ist und RANTES-Rezeptoren auf monozytischen Zellen involviert sind. Im Gegensatz dazu konnte auf mit IL-1 $\beta$  stimulierten humanen Nabelschnurvenenendothelzellen kein Effekt mit aktivierten Thrombozyten und deren Überständen beobachtet werden (Abb.13 B). Da nun RANTES an aktivierte HMVEC aber nicht an HUVEC bindet [9], liegt der Schluß nahe, nur immobilisiertes RANTES könne für die Aktivierung wichtig sein. Experimente mit aus Vollblut isolierten Monozyten auf aktivierten Plättchen oder deren Überständen bestätigten, daß mit Met-RANTES blockierte Monozyten nicht in dem Maße wie Kontrollzellen adhärenieren (Abb. 13 C). Zusätzlich konnten dieselben Ergebnisse nicht nur mit HMVEC, sondern auch mit Endothelzellen menschlicher Aorten wiederholt werden (Abb. 13 D). Damit erstreckt sich die Relevanz dieser Daten nicht nur auf die kleinen, sondern auch auf die großen Gefäße.

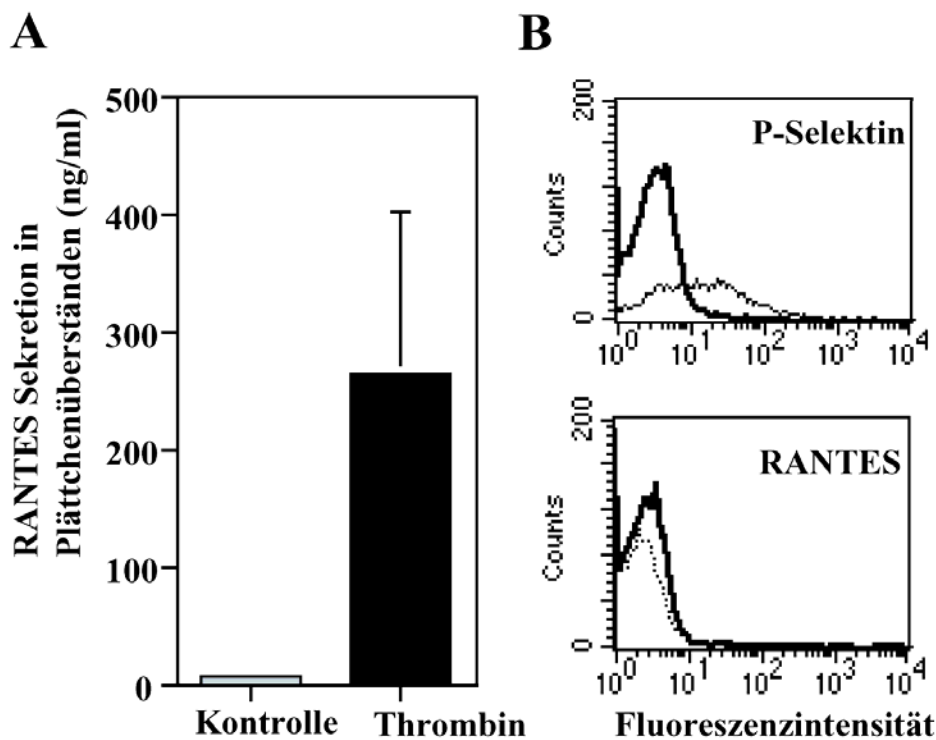




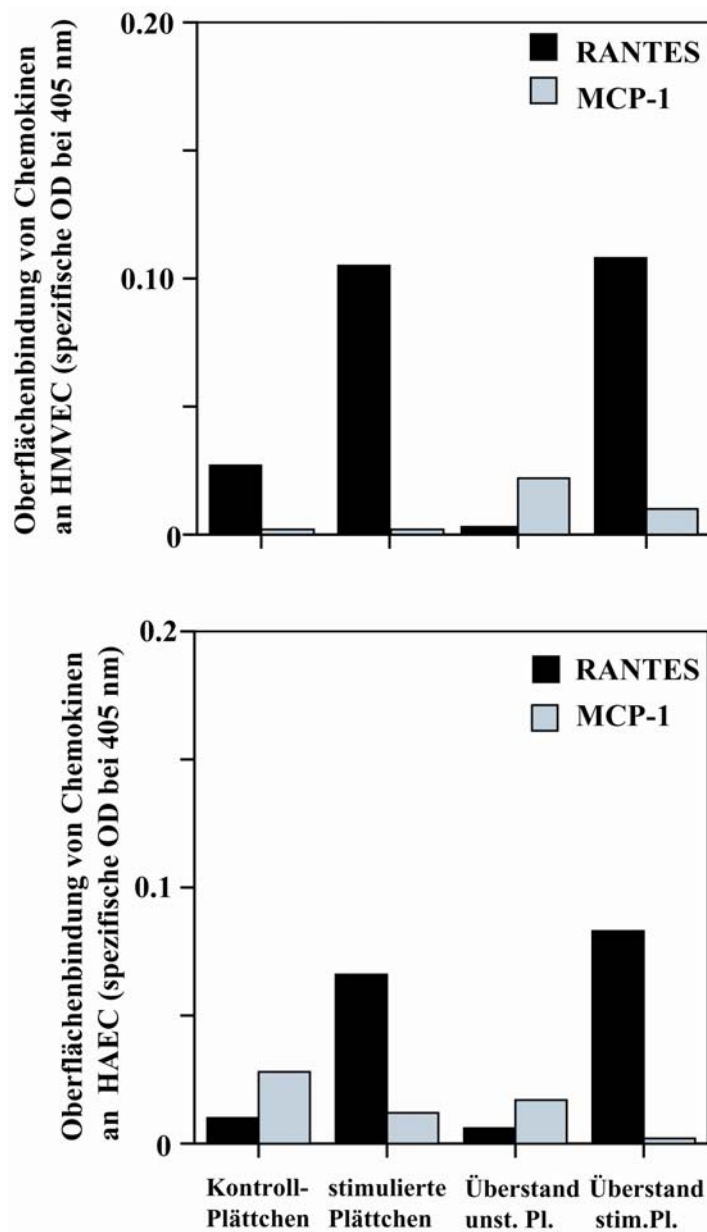
**Abb.13:** Met-RANTES, ein RANTES Rezeptorantagonist, blockiert die von sekretorischen Plättchenprodukten ausgelöste Adhäsion von Monozyten auf aktiviertem Endothel. Mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimulierte konfluente HMVEC (A,C), HUVEC (B) oder HAEC (D) wurden mit Thrombin (0.5 U/ml) und mit Thrombin aktivierten Plättchen im Fluß perfundiert oder für 20 Minuten in Stase oder mit deren Überständen inkubiert, mit oder ohne den blockierenden mAK gegen RANTES (C). Mono Mac 6 (A,B) oder Monozyten wurden mit Met-RANTES (1 $\mu$ g/ml) behandelt oder unbehandelt gelassen und mit 1.5 dyn/cm<sup>2</sup> auf aktivierte Endothelzellen perfundiert. Die Zahl fest adhärenter Zellen wurde nach 5 Minuten Akkumulation bestimmt (MW $\pm$ SA, n=6). \*p<0.05 vs unbehandelte Monozyten.

#### 4.7. Bindung von RANTES an aktiviertes Endothel

Die nächste Fragestellung betraf die Immobilisierung von RANTES auf HMVEC, wenn es von Plättchen sezerniert wurde, die Kontakt mit dem Endothel hatten oder aus deren Überstand kam. Ein Sandwich-ELISA zeigte zunächst, daß Plättchen große Mengen RANTES innerhalb von 5 Minuten sezernieren, wenn sie mit Thrombin stimuliert werden (Abb. 14 A). Die Aktivierung der Plättchen wurde zusätzlich mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Als Marker diente dabei ein P-Selektin Antikörper und ein Isotypkontrollantikörper. RANTES konnte nicht mittels Durchflußzytometrie auf der Oberfläche von Thrombozyten detektiert werden (Abb.14 B). Wohl aber zeigte ein Zelloberflächen ELISA mit IL-1 $\beta$  behandelten HMVEC oder HAEC RANTES-Detektion, wenn zuvor stimulierte Plättchen oder deren Überstände mit den Endothelzellen rotierend inkubiert waren. Keine Detektion konnte mit unstimulierten Plättchen oder mit dem Antikörper gegen MCP-1 beobachtet werden.

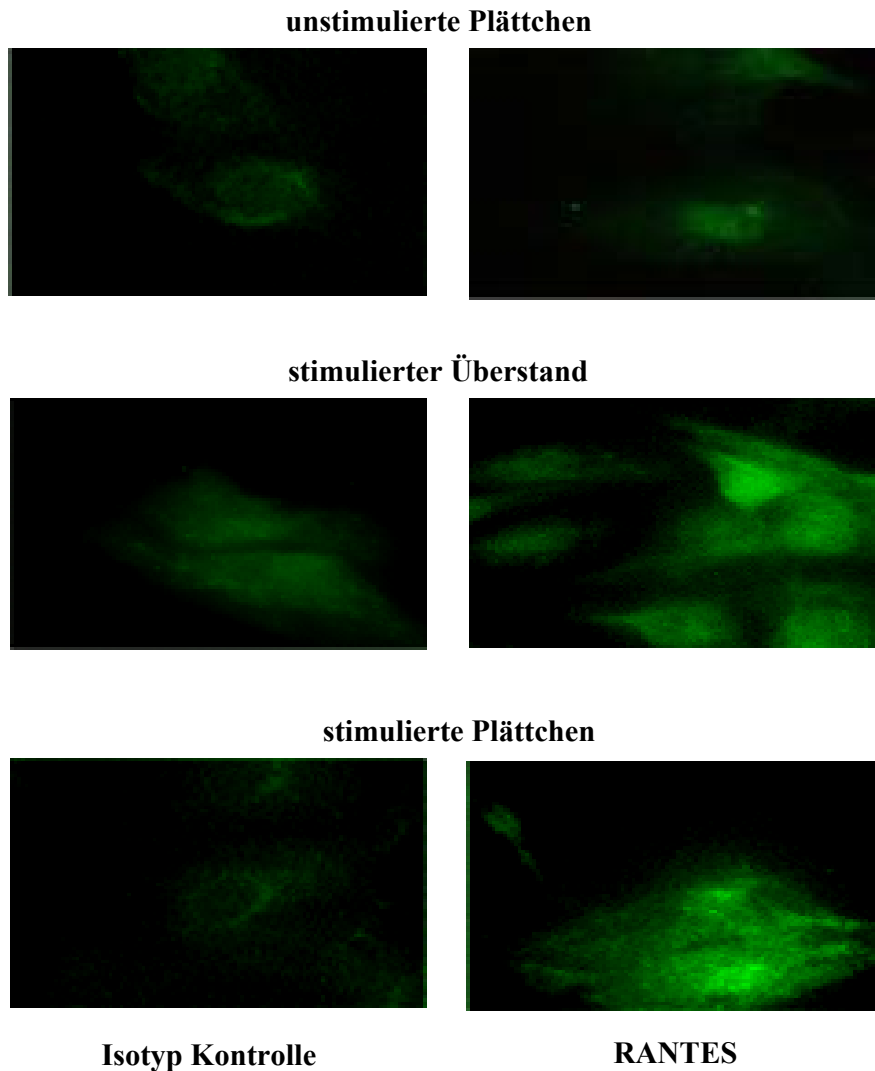


**Abb.14:** Mit Thrombin (0,5 U/ml) stimulierte Thrombozyten ( $10^8$ /ml) sezernieren RANTES, das mittels ELISA im Überstand gemessen wurde (A). Aktivierte und nicht aktivierte Thrombozyten wurden mit PFA fixiert und im Durchflußzytometer auf den Aktivierungsmarker P-Selektin und auf immobilisiertes RANTES hin untersucht.



**Abb.15:** Nach rotierender Präinkubation stimulierter HMVEC oder HAEC mit stimulierten oder nichtstimulierten Thrombozyten bzw. deren Überständen wurden MCP-1 und RANTES mittels ELISA detektiert. Inkubation aktivierter HMVEC mit rekombinantem RANTES (0.5 µg/ml) ergab eine OD von  $0.19 \pm 0.02$  ( $n=4$ ), während mit aktivierten HUVEC oder unstimulierten HUVEC alle spezifischen ODs  $<0.02$  blieben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus 4 unabhängigen Experimenten.

Die RANTES-Deposition erschien nach Plättchenpräperfusion stärker ausgeprägt als bei der Inkubation mit Überständen. Eventuell kann hier ein selektinabhängiger Mechanismus postuliert werden, oder zumindest ein Mechanismus, der durch den Kontakt rollender Plättchen auf dem Endothel ausgelöst wird, der zur Degranulation der Plättchen führt.

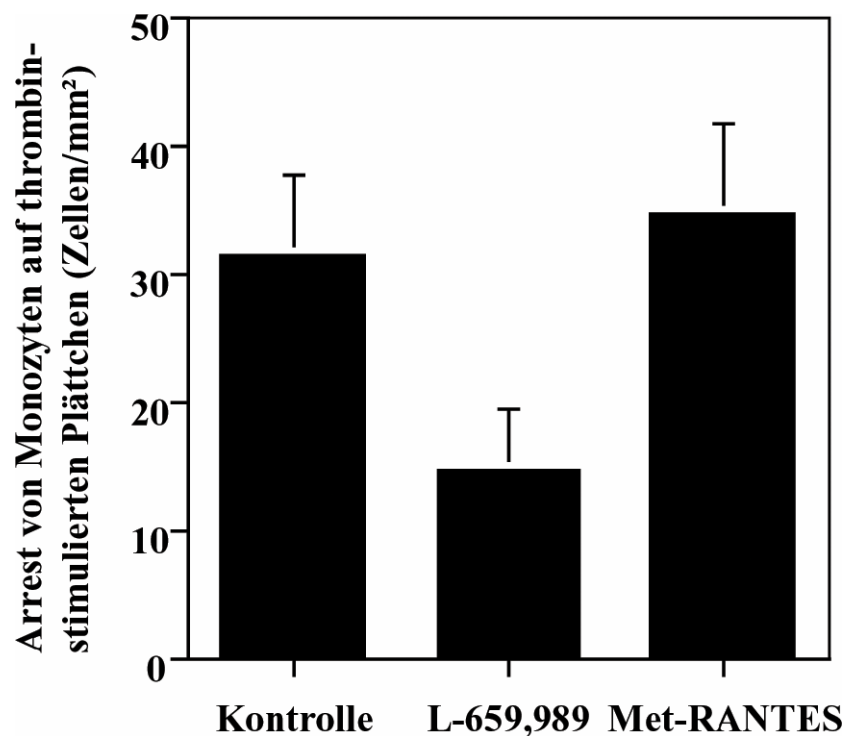


**Abb.16:** Auf beschichteten Objektträgern gewachsene, mit  $IL-1\beta$  inkubierte Endothelzellen konnten über die Flußkammer mit Plättchen perfundiert werden, um anschließend mit einer Immunfluoreszenzfärbung Chemokine nachzuweisen. Diese Immunfluoreszenzaufnahmen bestätigten, daß mit nicht aktivierten Plättchen in Kontakt gekommene Endothelzellen keinen Intensitätsunterschied zur Kontrolle aufweisen, was MCP-1 und RANTES betrifft. Doch eine Perfusion mit Thrombin stimulierten Thrombozyten ergab eine viel intensivere Endothelfärbung mit dem RANTES Antikörper als die Isotypkontrolle, im Gegensatz zu MCP-1, das etwa gleich intensiv wie die Kontrolle gefärbt war.

#### 4.8. RANTES ist nicht am Arrest auf adhärenen Plättchen beteiligt

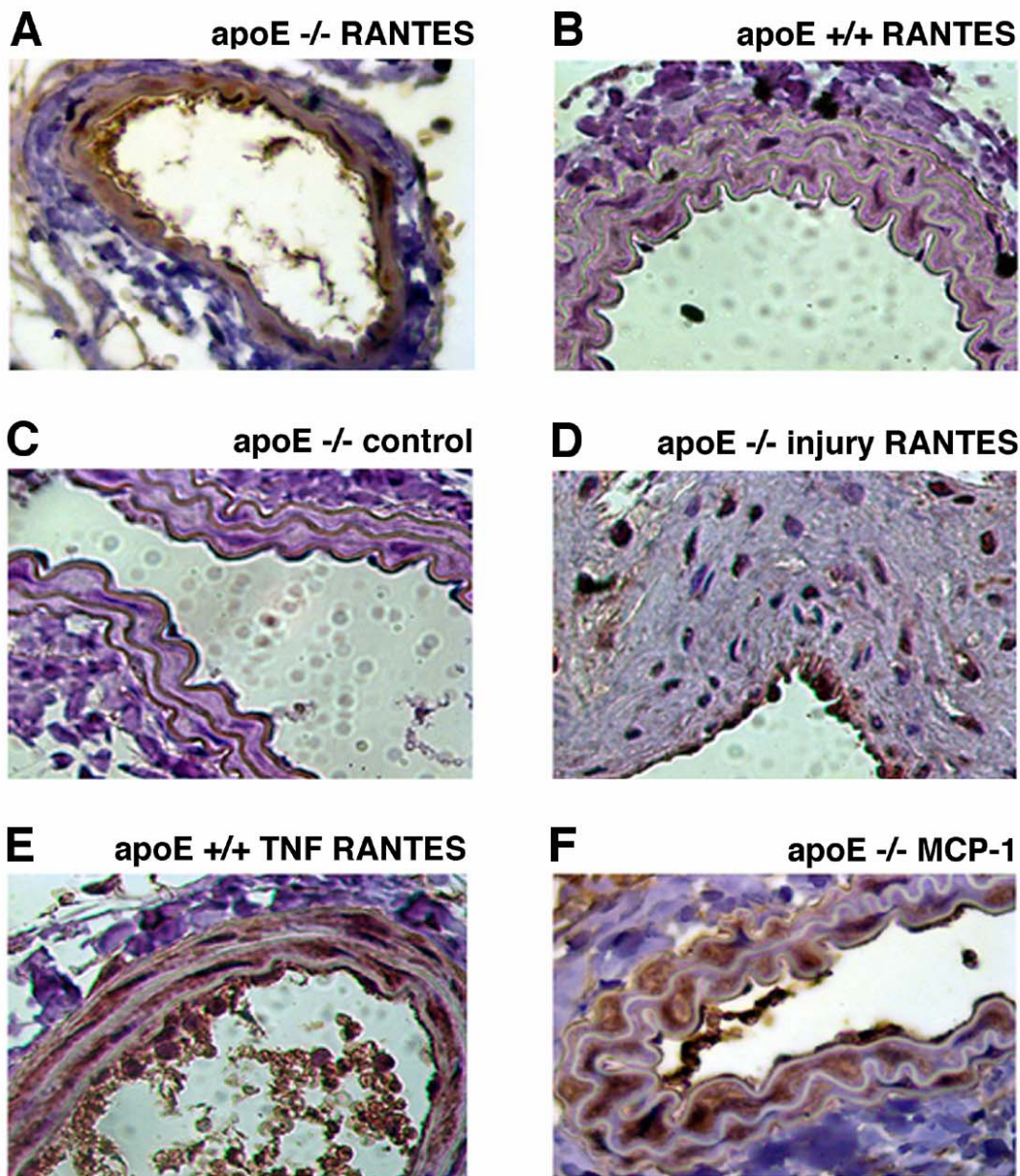
Plättchen spielen eine große Rolle, wenn sie bei endothelialen Verletzungen in Kontakt mit der subendothelialen Matrix kommen, dort adhären und dabei als Brücke Leukozyten rekrutieren. Akkumulation neutrophiler Leukozyten auf stimulierten Plättchen unter Scherflußbedingungen erfordert die Aktivierung der  $\beta$ -Kette von Mac-1 durch den Lipidmediator PAF; Chemokine, die über den Rezeptor CXCR2 aktivieren, sind nicht beteiligt [10]. Auf ähnliche Weise bewirkte der PAF-Antagonist L-659,989 [57] verminderte Monozytenadhäsion unter Scherflußbedingungen auf immobilisierten Plättchen, Met-RANTES zeigte aber keinen Effekt (Abb.17). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Verankerung von PAF in Membranen, hervorgerufen durch seine Lipophilie, während das hydrophile RANTES sich nicht in die Plättchenmembran einlagern kann und weggeschwemmt wird. Somit ist PAF verantwortlich für Thrombozyten-Monozyten Interaktionen unter Flußbedingungen, während RANTES aus Plättchen nur wirksam dann Arrest vermittelt, wenn es durch entzündlich verändertes Endothel immobilisiert wird.

**Abb.17:** Monozyten, die mit Met-RANTES ( $1\mu\text{g/ml}$ ) oder dem PAF-Antagonisten L659,989 ( $1\mu\text{mol/l}$ ) behandelt waren, wurden auf mit Thrombin aktivierten oberflächenadhärenen Plättchen mit  $1.5\text{ dyn/cm}^2$  perfundiert. Nach 5 Minuten wurden fest adhärenen Monozyten gezählt ( $MW\pm SA$ ,  $n=6$ ).



#### **4.9. Luminale RANTES-Ablagerung in atherosklerotischen und verletzten Arterien**

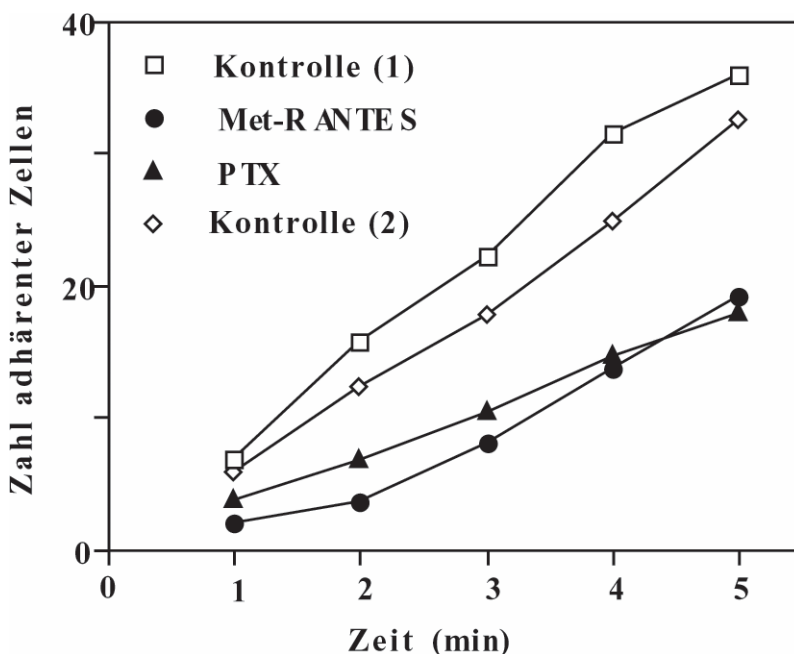
In atherosklerotisch veränderten Koronararterien nach Herztransplantation ist erhöhte RANTES Expression auf dem Endothel gemessen worden [8]. Bei in situ Hybridisierungen wurde aber keine RANTES mRNA in entzündetem Endothel detektiert [58]. Die Überlegung, daß RANTES parakrin abgelagert wird, liegt deshalb nahe. Um die Bedeutung der Ablagerung von RANTES auf atherosklerotisch verändertem Endothel zu untersuchen, wurden Schnitte von Karotiden Atherosklerose empfindlicher Apo-E knock-out Mäuse nach atherogener Diät oder nach Endothelverletzung mit einer Katheterspitze oder als Kontrolle Wildtypmäuse (C57Bl/6) mit oder ohne intraperitoneale TNF- $\alpha$  Injektion angefertigt. RANTES ließ sich in der Intima und Media früher atherosklerotischer Läsionen Apoprotein-E-defizienter Mäuse anfärben. Die jedoch akzentuierteste Färbung zeigte die luminale Endothelfläche, die diese Läsionen bedeckte und an der Arterienwand aufgelagertes thrombotisches Material (Abb. 18 A). Eine ähnliche Verteilung ergaben Färbungen an menschlichen Atherektomiepräparaten. Im Gegensatz dazu konnte RANTES in Wildtypmäusen nicht nachgewiesen werden (Abb. 18 B) und auch der Isotypantikörper erbrachte keine Detektion (Abb. 18 C). 4 Wochen nach einer Verletzung der endothelialen Bekleidung der A.carotis [59] zeigte die Immunhistochemie selektiv die Anfärbung der Oberfläche über der Neointimabildung (Abb. 18 D). TNF- $\alpha$  Behandlung für 4 Stunden führte zu einer massiven Anfärbung sowohl der Intima als auch der Media der Karotiden von Wildtypmäusen (Abb.18 E). Das Chemokin MCP-1 wurde als Positivkontrolle auf Schnitten ApoE defizienter Mäuse angefärbt, da es bekannterweise eine Rolle bei der Atherogenese spielt [1] und wurde auch in den atherosklerotischen Läsionen gefunden (Abb.18F)



**Abb.18:** Immunhistochemische Detektion von RANTES in atherosklerotisch veränderten, Zytokin-stimulierten oder luminal verletzten Karotiden. RANTES (Ak C-19) wurde in Paraffinschnitten früher atherosklerotischer Läsionen in Karotiden von apo E<sup>-/-</sup> Mäusen, die 5 Wochen lang Westerndiät erhalten hatten gesehen (A), aber nicht in apo E<sup>+/+</sup> Mäusen (B) oder mit Isotyp Kontrollantikörper (C). Nach einer endoluminalen Schädigung mit einem Führungsdraht in den Karotiden von apo E<sup>-/-</sup> Mäusen akzentuiert sich die RANTES-Detektion auf der Gefäßoberfläche (D), während sich in TNF behandelten Wildtypmäußen die Färbung durch die gesamte Gefäßwand erstreckt (E). Intimal und in der Media lokalisiert, findet man MCP-1 Färbung (Ak R-17) bei apo E<sup>-/-</sup> Mauskarotiden (F). Originalvergrößerungen waren x100 und x200.

#### 4.10. Monozytenakkumulation in ApoE -/- Mauskarotiden ist RANTES Rezeptor abhängig.

In einem mechanistischen Modell, bei dem monozytische Zellen durch die frei präparierte A.carotis von ApoE -/- Mäusen perfundiert wurden, ist erhöhte Akkumulation über frühen atherosklerotischen Läsionen festgestellt worden und damit als Modell der Monozytenrekrutierung bei Atherogenese gut geeignet [60]. In diesem Modell erhöhte sich die Zahl der adhärenen Mono Mac 6 Zellen stark, sobald das Gefäß mit RANTES präperfundiert wurde (Abb.19). Mit einer Pertussistoxin-Vorbehandlung der Mono Mac 6 Zellen, die einen Hinweis auf die Abhängigkeit der Adhäsion von einem G<sub>i</sub>-Protein gibt, konnte die Akkumulation auf 50% des Ausgangsniveaus gesenkt werden, eine G<sub>i</sub>-unabhängige Komponente war also auch vorhanden (Abb.19).



**Abb.19:** Rolle der RANTES Rezeptoren für die Akkumulation von Monozyten in Karotiden apo E defizienter Mäuse. Calcein gefärbte Mono Mac 6 Zellen wurden mit Met-RANTES (1µg/ml) oder mit PTX (200 ng/ml) vorbehandelt und in explantierte, RANTES vorbehandelte, Karotissegmente perfundiert. Bei 0 Minuten wurde der hohe Scherstreß auf 3 dyn/cm<sup>2</sup> reduziert. Kontrollzellen (unbehandelte monozytische Zellen) flossen durch das gleiche Gefäß vor und nach der Perfusion mit behandelten Zellen. Die Akkumulation adhärenter Zellen wurde an den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführter Experimente.



Da die Inkubation der Zellen mit Met-RANTES in etwa den gleichen Effekt wie die Pertussistoxin-Behandlung erbrachte, kann gefolgert werden, daß die G<sub>i</sub>-Protein gekoppelten RANTES Rezeptoren beteiligt waren. Die PTX-unabhängige Komponente konnte mit blockierenden Antikörpern gegen  $\alpha$ 4-Integrine aufgehoben werden. Wahrscheinlich spielen also vermehrt aktivierte  $\alpha$ 4-Integrine wie VLA-4 bei diesem Prozess die maßgebliche Rolle [60].

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wird die unterschiedliche Art und Weise, wie ein Chemokin auf aktivierten Endothelzellen präsentiert wird und damit den spezifischen und hierarchischen Beitrag seiner monozytären Rezeptoren auf die hintereinander geschaltete Folge von Rollen, festem Arrest, Formänderung und schließlich Transmigration beeinflusst, beschrieben. Das CXC-Chemokin GRO- $\alpha$  wird auf mit Proteoglykanen assoziiertem Heparansulfat immobilisiert, während das CC-Chemokin MCP-1 in löslicher Form sezerniert und dadurch unter Flußbedingungen entfernt wird. Übereinstimmend mit diesen Unterschieden war GRO- $\alpha$  und sein Rezeptor CXCR2 an der Umwandlung von Rollen in feste Adhäsion und Festigung der Adhäsion beteiligt, während MCP-1 an der Formänderung und Transmigration auf TNF- $\alpha$  aktiviertem HUVEC involviert war. RANTES wird ähnlich wie GRO- $\alpha$  auf entzündetem Endothel immobilisiert und trägt zum festen Arrest von Monozyten einen erheblichen Anteil bei.

Chemokine sind positiv geladene Proteine, die Heparansulfat oder verwandte negativ geladene Glykosaminoglykane binden können [4, 54]. Sowohl die gebundene als auch die lösliche Form von RANTES und MIP-1 $\beta$  können über integrinabhängige Mechanismen T-Zelladhäsion an extrazellulärer Matrix auslösen [5, 6]. Überdies kann mit modifiziertem LDL behandeltes Endothel, das GRO- $\alpha$  an seiner Oberfläche bindet, Monozytenadhäsion vermittelt werden [61]. Es ist bereits die Vermutung angestellt worden, daß an Proteoglykane gebundene Chemokine nicht durch die Strömung im Gefäß weggewaschen werden und auf diese Weise effizienter Monozyten aktivieren [5, 54]. IL-8 ein CXC-Chemokin bindet an Heparanproteoglykane und verstärkt auf diese Weise seine Wirkung auf Leukozyten [62]. Hier wird beschrieben, wie immobilisiertes GRO- $\alpha$  und sein Rezeptor CXCR2 eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von Monozyten an HUVEC unter physiologischen Flußbedingungen spielt. Auf eine ähnliche Art bindet, wie hier gezeigt, RANTES nicht nur an IL-1 $\beta$  stimuliertes mikrovaskuläres Endothel sondern auch an aortales und verursacht dort Monozytenaktivierung mit konsekutivem Arrest. Mit Heparitinase konnte auf HUVEC immobilisiertes GRO- $\alpha$  entfernt werden, mit der Folge, daß unter Flußbedingungen die Adhäsion von Monozyten reduziert wurde. Dies ist ein starker Hinweis auf die Beteiligung von Heparanproteoglykanen, die GRO- $\alpha$  binden, präsentieren und durch die anschließende Monozytenaktivierung das Rollen in festen Arrest verwandeln. Heparansulfate können die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch IL-8 verstärken [63] und leukämische T-Zellen können über die Bindung von proteoglykangebundenem MIP-1 $\beta$  integrinabhängig adhären, weil MIP-1 $\beta$  auf diese Weise dem Rezeptor optimal angeboten wird [7]. Interessanterweise ist ein wichtiger Chemokinrezeptor für IL-8, CXCR1, der aber für GRO- $\alpha$  nur von

untergeordneter Bedeutung ist, auf HUVEC gefunden worden [64], während der für GRO- $\alpha$  entscheidende CXCR2-Rezeptor offensichtlich nicht exprimiert wird. Mögliche Bedeutung für die Expression von Chemokinrezeptoren auf Endothel haben Prozesse, die ein migrieren von Endothelzellen benötigen, wie die Angiogenese oder Wundheilung. Während gelöste Chemokine im Gefäß von Proteoglykanen eingefangen und immobilisiert werden können, kann injiziertes IL-8 von Vesikeln der Plasmamembran aufgenommen werden und von basal nach luminal innerhalb einer Endothelzelle transportiert werden [62], womit ein anderer, neuer Weg des Chemokintransportes und der Präsentation beschrieben wird.

Schaltete man GRO- $\alpha$  oder seinen Rezeptor CXCR2 mit Antikörpern oder Peptidanaloga aus, reduzierte sich die Zahl der unter Scherfluß adhären gewordenen Monozyten wie Mono Mac 6 Zellen drastisch. Monozyten und Mono Mac 6 Zellen exprimieren CXCR2 auf einem deutlich höheren Niveau als CXCR1 [65], mit der eventuellen Bedeutung, daß CXCR2 der für den festen Arrest hauptsächlich verantwortliche Rezeptor ist. Das Peptidanalogen 8-73 schien dabei wirksamer als die blockierenden Antikörper zu sein. Möglicherweise liegt das an Interaktionen der mAk mit den Fc-Rezeptoren auf Monozyten mit konsekutiver Aktivierung oder an noch nicht entdeckten Rezeptoren für GRO- $\alpha$ , die durch das Peptid blockiert werden können, nicht aber durch Antikörper. CXCR1 kommt dafür aber nicht in Frage, denn es wird durch 8-73 nicht blockiert.

Die Analyse der primären Interaktionen der Monozyten mit TNF- $\alpha$  behandelten HUVEC ergab, daß die Blockade von GRO- $\alpha$  in einer Verringerung adhärenter zugunsten rollender Monozyten resultierte, so wie das auch schon bei der kombinierten Blockade der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine beobachtet werden konnte [66, 67]. Die Zahl der Gesamtinteraktionen von Monozyten mit Endothelzellen blieb jedoch unabhängig von der Wahl des Antagonisten 8-73 oder des CXCR2 blockierenden Antikörpers konstant. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß beim initialen Kontakt, der zum Rollen der Zelle führt, GRO- $\alpha$  oder sein Rezeptor nicht involviert waren. Initialer Kontakt der Monozyten zu TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen wird durch L- oder P-Selektin vermittelt, aber nicht durch  $\alpha$ -4 Integrine wie VLA-4, die Ziele für Chemokinaktivierung sind. Sekundäre Interaktionen mit bereits adhären Monozyten verursachen lineare Agglomerate und werden nicht durch Integrine, sondern durch L-Selektin vermittelt [66, 68, 69]. Nach enzymatischer Spaltung von Heparanproteoglykanen mit Heparitinase und damit Entfernung von immobilisiertem GRO- $\alpha$ , wurde weniger verstärktes Rollen beobachtet als nach Blockade von GRO- $\alpha$ . Möglicherweise waren nun Bindungsstellen für L-Selektin modifiziert oder fehlten sogar vollständig. Befunde, daß Heparitinase deutlichere Auswirkungen auf die Adhäsion von Monozyten unter Scherfluß vermittelt als L-

Selektin [70], das an Endothel bindet, können hier mit der Rolle immobilisierter Chemokine erklärt werden.

In knock-out Mäusen ist die große Bedeutung von MCP-1 für die Extravasation von Monozyten demonstriert worden. Dabei wird ein Gradient des löslichen MCP-1 für die Transmigration benötigt [71, 72]. Da MCP-1 nicht in polarisierter Art sezerniert wird [72], sind andere Mechanismen für die Entstehung eines Gradienten wichtig. Im Gegensatz zu GRO- $\alpha$  wird MCP-1 nicht auf HUVEC immobilisiert. Möglicherweise wird das von den Endothelzellen exprimierte und luminal sezernierte MCP-1 von der vorbeiströmenden Flüssigkeit weggewaschen, und es entsteht durch ständig nachproduziertes MCP-1 ein Gradient.

Tatsächlich fanden wir unter statischen Bedingungen kaum polarisierte Formänderung und Transmigration der adhären Monozyten. Neutralisierung von löslichem MCP-1 und der MCP-1 Rezeptorantagonist hatten bemerkenswerterweise keinen Einfluß auf die Adhäsion von Monozyten, wohl aber einen hemmenden Effekt auf die Diapedese aufgrund mangelnder Formänderung und Transmigration. So ist MCP-1 eventuell deshalb nicht in der Lage, festen Arrest auszulösen, da es unter Flußbedingungen weggewaschen wird. Ähnliche Ergebnisse sind mit Eotaxin, einem CC-Chemokin, gefunden worden. Lösliches Eotaxin erhöhte in statischen Versuchen die Bindung von Eosinophilen an Endothel. Unter Flußbedingungen erwiesen sich allerdings Versuche, die Adhäsion mit CCR3 Antagonisten zu hemmen, als nahezu wirkungslos. Erst in Kombination mit einem blockierenden  $\alpha 4$  mAk gelang eine deutliche Reduzierung adhären Eosinophiler [73]. Transendotheliale Chemotaxis von Monozyten erreicht MCP-1 durch eine dynamische Regulation der Integrinaktivität [71, 74]. Dies deutet auf die selektive Wirkung eines MCP-1 Gradienten und seines Rezeptors, CCR2, auf die Migration und Diapedese adhären Monozyten hin. Der Scherfluß selbst spielt bei der Transmigration ebenfalls eine eminente Rolle. Mit peripheren Lymphozyten wurde gezeigt, daß die transendotheliale Migration -unabhängig von Calciumstrom und IP3- auch ohne Chemokingradienten funktionieren kann [75].

Die geringe Beteiligung von CXCR2 an der Diapedese mag an der Immobilisation von GRO- $\alpha$  auf dem Endothel liegen, die ein Zustandekommen eines transendothelialen Gradienten verhindert. Das Speichern von immobilisierbaren Chemokinen auf der endothelialen Oberfläche führt womöglich zu einer sehr viel stärkeren Konzentration und damit zu einer stärkeren Auslastung der Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten. Das könnte eher die Voraussetzung für eine starke Beeinflussung der Adhäsion und Adhäsionsstärke als für Chemotaxis sein [76]. Andererseits können Unterschiede in der Wirkung von GRO- $\alpha$  und MCP-1 durch Entkoppeln der Bindung des Chemokins von spezifischen Signaltrans-

duktionswegen hervorgerufen werden oder aber durch Besonderheiten in der Bindung an Proteoglykane, die die Funktion des Chemokins verändern können, wie z.B. die Integrinavidität gegenüber der Chemotaxis [7, 77].

Während GRO- $\alpha$  auf entzündlich veränderten HUVEC immobilisiert wird, kann RANTES nur auf mikrovaskulärem oder aortalem Endothel, nicht aber auf HUVEC immobilisiert werden. RANTES kommt in erheblichen Konzentrationen in Thrombozyten vor, wo es in Vesikeln gespeichert, und auf Aktivierung, beispielsweise mit Thrombin, sezerniert wird. RANTES ist in Prozessen wie der Transplantatabstoßung und Transplantat-assoziierten Atherosklerose als ein wichtiger Mediator identifiziert worden. Hier wird gezeigt, daß sich RANTES aus aktivierten Plättchen auf entzündetem mikrovaskulären oder aortalen Endothel anlagert und nachfolgende Monozyten vermehrt zum Arrest bringt. Was könnte nun die Rolle von RANTES sein, das von aktivierten Plättchen sezerniert wird und sich entzündetem Endothel auflagert?

Bisherige Studien zur Interaktion zwischen Plättchen und Monozyten waren angelegt, direkte Wechselwirkungen zu zeigen. Bis vor kurzem wurde die Funktion von Plättchen ausschließlich in der Blutgerinnung gesehen. Als kleine kernlose Zellen sind Thrombozyten sowohl für den Verschuß von Wunden als auch für Thrombosen im venösen und arteriellen Gefäßsystem verantwortlich. Inzwischen ist klar geworden, daß Plättchen mehr als nur Mitspieler in der Gerinnungskaskade sind. Plättchen gehen direkte Interaktionen mit Monozyten ein und können so über plättcheneigene Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und GP-Ib den Leukozyten zum Arrest bringen. Diese Leukozyten-Plättchen Aggregate spielen eine Rolle bei der instabilen Angina pectoris und könnten klinisch als Frühwarnsystem verwendet werden [78].

Thrombozyten speichern eine Fülle verschiedenster inflammatorischer Mediatoren (PF4, PAF, RANTES), ein starker Hinweis für ihre wichtige Rolle auch bei entzündlichem Geschehen. So schlagen Plättchen eine Brücke zwischen hämostatischen und inflammatorischen Ereignissen. Durch Chemokine wie RANTES, die spezifisch endothelial binden können, sind aktivierte Plättchen an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt und können an pathologischen Prozessen wie z.B. Arteriosklerose teilnehmen und erfüllen eine weitere Aufgabe, die ihnen bis vor kurzem nicht zugesprochen wurde.

Die hier vorgestellten Daten zeigen zum ersten Mal, daß RANTES aus Thrombozyten und seine Deposition auf inflammatorisch alteriertem mikrovaskulären wie aortalen Endothel zum Arrest von Monozyten führt. Obwohl mögliche Effekte anderer Chemokine, die schwach exprimiert werden, oder Chemokinvorläufer nicht ausgeschlossen werden können, implizieren

die dargestellten Ergebnisse doch stark das Chemokin RANTES und dessen Rezeptoren. Dieser Mechanismus stellt ein neues Prinzip dar, nach dem Plättchen unter Entzündungsbedingungen eine Monozytenrekrutierung aus dem Blutkreislauf in unterschiedliche Gefäßbetten auslösen. Die Präsenz von RANTES in erkrankten oder verletzten Karotiden impliziert, daß dieses Konzept relevant für die direkte Monozytenrekrutierung in atherosklerotische oder stenosierende Läsionen ist. Bedenkt man die Rolle der Monozyten für die Atherogenese, bietet die Blockade von RANTES Rezeptoren durch Peptide wie Met-RANTES oder synthetische selektive Antagonisten einen künftigen Zugang zur Sekundär- wie Primärprävention für atherosklerotisch bedingte Erkrankungen.

Einer Beschreibung dieser Prozesse dient in dieser Arbeit vor allen Dingen die Flußkammer, die eine Erforschung der Adhäsion von Monozyten unter möglichst physiologischen Bedingungen erlaubt. Ein Vorteil dieses Systems besteht in der Vereinfachung des in der Natur äußerst komplexen Wechselspiels vieler Komponenten. Diese Reduzierung ermöglicht einerseits eine klarere Beziehung der einzelnen Komponenten zueinander, verhindert andererseits eine direkte Aussagefähigkeit zur physiologischen Relevanz. Hier sind Tiermodelle unumgänglich. Immunhistochemische Detektion von Chemokinen in Mäusen unterschiedlichen genetischen Hintergrunds sowie die Möglichkeit, diese Mäuse ähnlich wie Zellkultursysteme zu behandeln, eröffnet konkretere Hinweise auf die Prozesse, wie sie sich im Organismus abspielen. Allerdings sind auch hier die Ergebnisse der Untersuchungen von auf Zellkultur basierenden Experimenten nicht direkt zu übertragen, da die funktionelle Komponente fehlt. Explantierte Mauskarotiden dienten in dieser Arbeit als Brücke zwischen in vitro und in vivo Versuchen. Hier konnten Zellen einer monozytoiden humanen Zelllinie verwendet werden, erstens, da die Homologie der einzelnen Adhäsionsmoleküle sehr hoch ist, zweitens, da humanes RANTES verwendet wurde. Dieses Modell erlaubt eine direkte Visualisierung von Rollen und fester Adhäsion von Monozyten unter annähernd physiologischen Bedingungen.

Ein weiteres Beispiel für die vielschichtige Rolle von Chemokinen wird durch Fraktalkine verdeutlicht. Fraktalkine wurde 1997 entdeckt und fällt durch mehrere Eigenschaften aus dem Rahmen. Einmal paßt es nicht in das Schema der CC- und CXC-Chemokine, da seine beiden Cysteinreste durch drei Aminosäurereste voneinander getrennt sind, und darüber hinaus erscheint Fraktalkine in zwei verschiedenen Formen: membrangebunden auf einem Mucinstiel und in gelöster Form. Während die lösliche Form in der Lage ist, Lymphozyten- und Monozytenmigration auszulösen, vermittelt die membrangebundene Form die Adhäsion von

Fraktalkinerezeptor transfizierten Zellen. Interessanterweise ist dieser Prozeß nicht durch Pertussistoxin inhibierbar und von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation unabhängig. Auch weitere Adhäsionsmoleküle werden nicht benötigt [43, 79]. Mutationsstudien zeigten, daß der Mucinstiel wichtig für die effiziente Präsentation, die Chemokindomäne dagegen für die Zelladhäsion war [79]. Auf ähnliche Weise könnte auch die Interaktion von GRO- $\alpha$  auf Heparansulfaten immobilisiert mit CXCR2 direkt zur festen Adhäsion beitragen.

Um den Prozess der Extravasation erfolgreich zu durchlaufen, müssen die aufeinander folgenden Schritte der Adhäsionskaskade überlappen und aktivierbar sein [51, 80].

Chemokine induzieren in Integrinen eine Konformationsänderung, die zu einer Erhöhung ihrer Avidität führt und damit die Bindung an Liganden auf dem Endothel oder auch der extrazellulären Matrix verursacht. Unterschiedliche Kinetiken der Integrine beeinflussen die Transmigration und die Lokalisation der Leukozyten [6, 71, 74, 81, 82]. Leukozyten besitzen die Fähigkeit, selbst bei einer abgesättigten Konzentration eines Chemokins, das somit keinen chemotaktischen Gradienten mehr darstellt, einem zweiten, weiter entfernten chemotaktischen Gradienten zu folgen. Es ist dabei impliziert worden, daß die Navigation der Leukozyten durch mehrere Chemokine eine Kommunikation zwischen ihren Rezeptoren benötigt [83, 84]. Vergleichbar den in dieser Arbeit beschriebenen Befunden binden die CXC-Chemokine Mig und IP10 an TNF- $\alpha$  oder INF- $\gamma$  stimulierte HUVEC und verursachen Adhäsion im Scherfluß - in diesem Fall von T-Lymphozyten- über CXCR3. Blockierte man CXCR3, reduzierte sich die Adhäsion, jedoch nicht die Transmigration [85]. Das führt zu der Schlußfolgerung, daß andere Chemokin-Rezeptor-Wechselwirkungen für die Transmigration verantwortlich sein müssen. Führt man diese Daten mit den in dieser erhobenen zusammen, suggerieren die Ergebnisse, daß CXC-Chemokine mit ihren Rezeptoren hauptsächlich der Adhäsion unter Flußbedingungen dienen, andere, lösliche hingegen, wichtig für die Diapedese sind.

Unterschiedliche Präsentation von Chemokinen zusammen mit einer funktionellen Spezialisierung ihrer Rezeptoren ergibt ein neues molekulares Konzept für ihre Teilnahme am immer komplexer werdenden Prozess der Extravasation von Leukozyten.

## 5. Zusammenfassung

Die Extravasation von Monozyten in entzündetes Gewebe erfordert sequentielle Interaktionen multipler Adhäsionsmoleküle von denen Chemokine in dieser Arbeit den größten Stellenwert einnehmen. Zum einen wird der differentielle Beitrag von Chemokinrezeptoren und ihren Liganden, die von entzündetem Endothel gebildet werden, für den Arrest von Leukozyten und ihrer Transmigration untersucht, zum anderen wird der Beitrag von aktivierten Plättchen zur Adhäsion von Monozyten auf entzündetem Endothel beschrieben.

Als potenter Entzündungsmediator stimuliert TNF- $\alpha$  die Expression von GRO- $\alpha$  und MCP1. In den Überständen entzündeten Endothels ist aber allein MCP-1 detektierbar. Umgekehrt läßt sich nur GRO- $\alpha$  mit verschiedenen Methoden auf der Endotheloberfläche darstellen. Da Chemokine in unterschiedlichem Ausmaß an negativ geladene Heparanproteoglykane binden, scheint selektiv GRO- $\alpha$  auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen gebunden und immobilisiert, während MCP-1 zwar exprimiert und sezerniert wird, jedoch ohne auf dem Endothel immobilisiert zu werden. Nach enzymatischer Spaltung der Heparanproteoglykane war GRO- $\alpha$  nicht mehr detektierbar.

Der Chemokinrezeptor CCR2 ist spezifisch für MCP-1, während GRO- $\alpha$  an CXCR1 und CXCR2 bindet. Die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 exprimiert CCR2 und CXCR2 mit funktioneller Relevanz. Denn in Adhäsionsversuchen unter physiologischen Scherflußbedingungen und in Transmigrationskammern wurde ihr Einfluß auf Rollen, Adhäsion, Formänderung und Transmigration ersichtlich. Monozyten und Mono Mac 6 Zellen verhalten sich dabei sehr ähnlich. Mit blockierenden Antikörpern gegen Chemokinrezeptoren und gegen Chemokine, aber auch mit Peptidanaloga von MCP-1 und GRO- $\alpha$  konnte jeweils selektiv die Funktion dieser einzelnen Komponenten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit von GRO- $\alpha$  und CXCR2 für die Konversion von Rollen in feste Adhäsion von Monozyten. Unbeeinflusst dagegen blieben Formänderung und Transmigration. Ähnliche Resultate hinsichtlich Rollen, Adhäsion und Formänderung ließen sich erzielen, wenn statt Blockade der Chemokinrezeptoren die Immobilisation von GRO- $\alpha$  durch enzymatische Spaltung von Heparanproteoglykanen verhindert wurde. MCP-1 und CCR2 besaßen ihrerseits keinen Effekt auf die Adhärenz monozytärer Zellen. Ihre Funktion beschränkt sich auf das „spreading“, das Ausbreiten und Abflachen der adhärenen Monozyten auf Endothelzellen, gefolgt von Transmigration. Offensichtlich ist der Scherfluß hilfreich um eine Formänderung adhärenter Monozyten zu bewirken, denn unter statischen Bedingungen vollzog nur ein Bruchteil der Monozyten eine Formänderung.



**Abb.20:** *Modell der unterschiedlichen Funktion von MCP-1 und GRO- $\alpha$* 

Im zweiten Teil wird der Einfluß aktivierter Thrombozyten auf die Adhärenz von Monozyten untersucht. Monozyten und Mono Mac 6 Zellen adhären verstärkt an stimuliertem Endothel, wenn zuvor mit Thrombin-stimulierten Thrombozyten präperfundiert wird. Dabei wurde Endothel unterschiedlichen Ursprungs verwendet. Sowohl auf mikrovaskulären als auch auf aortalen Endothelzellen zeigte sich der beschriebene Effekt, nicht jedoch auf venösen Endothelzellen. Interaktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten sollten keine Rolle spielen. Um auszuschließen, daß Thrombozyten durch Brückenbildung zwischen Endothel und Monozyten die Adhäsion verursachen, wurden Überstände von aktivierten Thrombozyten zur Präperfusion verwendet, die eine beinahe ähnlich starke Adhäsion der Monozyten bewirkten. Ein Peptidanalogen des RANTES CC-Chemokins mit antagonistischer Wirkung vermochte den Arrest auf den Ausgangswert zu reduzieren. RANTES wird in hoher Konzentration von Plättchen sezerniert, ist aber nicht das einzige von Thrombozyten sezernierte Chemokin. Ein blockierender Antikörper gegen RANTES erzielte aber eine identische Wirkung wie der Peptidantagonist und erbrachte so den Nachweis, daß thrombozytäres RANTES die Verstärkung der Adhäsion bewirkte.

Mit verschiedenen Methoden konnte die Immobilisierung von RANTES auf Endothelzellen, nach dem Kontakt mit Plättchen oder deren Überständen visualisiert und quantifiziert werden. Thrombozyten in aktiviertem Zustand sind in der Lage Mono Mac 6 Zellen zu stimulieren und in den Arrest zu überführen. In Flußversuchen auf Plättchenrasen konnte RANTES nicht dafür verantwortlich gemacht werden, das nicht auf der Plättchenmembran detektierbar war, sondern der lipidlösliche Mediator PAF, der in der Thrombozytenmembran verankert ist und dort in Kontakt mit monozytären Zellen ein Aktivierungssignal auslösen kann.

Die Versuche in der Flußkammer und die Quantifizierung von Chemokinen durch ELISA und Immunfluoreszenz sind aber nur sehr eingeschränkt auf die Realität übertragbar. Sehr viel näher am menschlichen Organismus zeigten Explantation und immunhistochemische Aufarbeitung von Karotiden aus Mäusen die Rolle von RANTES für den Prozess der Arteriosklerose und Intimaverdickung nach Ballonangioplastie. RANTES stellte sich in der Intima und Media mit besonderer Akzentuierung luminal in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen dar, welche unter cholesterinreicher Nahrung atherosklerotische Läsionen entwickeln. Als Vergleich hierzu dienten MCP-1 Färbungen, die in ihrer Verteilung die gesamte Arterienwand betrafen. Wildtyp Mäuse mit einer Drahtverletzung der Karotis entwickelten in den darauffolgenden Wochen eine Stenose und dienten als Modell für Angioplastie. Hier

detektierte man RANTES besonders stark auf dem repopularisierten Endothel. In Wildtyp Mäusen ohne Behandlung dagegen, ließ sich RANTES nicht darstellen, im Gegensatz zu TNF behandelten Wildtyp Mäusen, die eine sehr starke Färbung für RANTES in der gesamten Arterienwand zeigten.

Flußversuche in aus Mäusen explantierter Karotiden bestätigten die in vitro Ergebnisse: Mit RANTES präperfundierte Gefäße zeigten Adhärenz von Mono Mac 6 Zellen, die sich mit PTX und Met-RANTES verhindern ließ. Somit läßt sich auch im Tiermodell die besondere Relevanz endothelial immobilisierter Chemokine hinsichtlich der festen Adhäsion nachweisen. Dabei spielen Thrombozyten, die bisher als allein für die Blutgerinnung wesentlich angesehen wurden, als Übermittler immobilisierbarer Chemokine eine bedeutende Rolle im Entzündungsprozess. Die Unterscheidung in Chemokine, die immobilisiert werden können wie RANTES oder GRO- $\alpha$  und Chemokine, die löslich bleiben, trägt zum Verständnis der Vielfalt dieser Proteine bei.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 894-7.
2. Boisvert, W.A., et al., *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice*. *J Clin Invest*, 1998. 101(2): p. 353-63.
3. Lu, B., et al., *Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice*. *J Exp Med*, 1998. 187(4): p. 601-8.
4. Witt, D.P. and A.D. Lander, *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. *Curr Biol*, 1994. 4(5): p. 394-400.
5. Tanaka, Y., et al., *T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta*. *Nature*, 1993. 361(6407): p. 79-82.
6. Gilat, D., et al., *Regulation of adhesion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to intact or Heparitinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta*. *J Immunol*, 1994. 153(11): p. 4899-906.
7. Tanaka, Y., et al., *Heparan sulfate proteoglycan on leukemic cells is primarily involved in integrin triggering and its mediated adhesion to endothelial cells*. *J Exp Med*, 1996. 184(5): p. 1987-97.
8. Pattison, J.M., et al., *RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis*. *J Heart Lung Transplant*, 1996. 15(12): p. 1194-9.
9. Grone, H.J., et al., *Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment*. *Faseb J*, 1999. 13(11): p. 1371-83.
10. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor*. *J Clin Invest*, 1997. 100(8): p. 2085-93.
11. Kirchhofer, D., M.A. Riederer, and H.R. Baumgartner, *Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model*. *Blood*, 1997. 89(4): p. 1270-8.
12. Theilmeier, G., et al., *Circulating activated platelets assist THP-1 monocyte/endothelial cell interaction under shear stress*. *Blood*, 1999. 94(8): p. 2725-34.
13. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta3 integrin, and GPIIb/IIIa*. *J Exp Med*, 1998. 187(3): p. 329-39.
14. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 591-4.
15. Touqui, L., M. Hatmi, and B.B. Vargaftig, *Human platelets stimulated by thrombin produce platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when the degrading enzyme acetyl hydrolase is blocked*. *Biochem J*, 1985. 229(3): p. 811-6.
16. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. *J Exp Med*, 1991. 174(4): p. 785-90.
17. Kameyoshi, Y., et al., *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils*. *J Exp Med*, 1992. 176(2): p. 587-92.
18. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
19. Breslow, J.L., *Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases*. *Nat Med*, 1997. 3(6): p. 600-1.

20. Braunwald, E., *Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities*. N Engl J Med, 1997. 337(19): p. 1360-9.
21. Aqel, N.M., et al., *Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis, 1984. 53(3): p. 265-71.
22. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. 89(5): p. 2462-78.
23. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. 272(34): p. 20963-6.
24. Cathcart, M.K., D.W. Morel, and G.M. Chisolm, 3rd, *Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic*. J Leukoc Biol, 1985. 38(2): p. 341-50.
25. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis*. Toxicol Pathol, 1990. 18(4): p. 560-71.
26. Quinn, M.T., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(8): p. 2805-9.
27. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice*. J Clin Invest, 1997. 100(10): p. 2552-61.
28. Munro, J.M. and R.S. Cotran, *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation*. Lab Invest, 1988. 58(3): p. 249-61.
29. Davies, P.F., *Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis*. Lab Invest, 1986. 55(1): p. 5-24.
30. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(12): p. 5252-6.
31. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. J Clin Invest, 1991. 88(4): p. 1121-7.
32. Aiello, R.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(6): p. 1518-25.
33. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Selectins*. J Clin Invest, 1993. 91(2): p. 379-87.
34. Snapp, K.R., et al., *Dimerization of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) required for optimal recognition of P-selectin*. J Cell Biol, 1998. 142(1): p. 263-70.
35. Etzioni, A., *Loss of endothelial surface expression of E-selectin--a third LAD syndrome*. Blood, 1999. 94(11): p. 3956.
36. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell, 1991. 65(5): p. 859-73.
37. Yoshimura, T., et al., *Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants*. J Exp Med, 1989. 169(4): p. 1449-59.
38. Matsushima, K., et al., *Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line*. J Exp Med, 1989. 169(4): p. 1485-90.
39. Wolpe, S.D., et al., *Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties*. J Exp Med, 1988. 167(2): p. 570-81.
40. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Adv Immunol, 1994. 55: p. 97-179.
41. Kelner, G.S., et al., *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine*. Science, 1994. 266(5189): p. 1395-9.
42. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. 385(6617): p. 640-4.

43. Proudfoot, A.E., et al., *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. J Biol Chem, 1996. 271(5): p. 2599-603.
44. Gong, J.H. and I. Clark-Lewis, *Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues*. J Exp Med, 1995. 181(2): p. 631-40.
45. Talpas, C.J., D.A. Walz, and L. Lee, *1H-NMR studies of bovine platelet factor 4: histidine assignments and interactions with heparin*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1078(2): p. 208-18.
46. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. 338(7): p. 436-45.
47. Diacovo, T.G., et al., *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. J Clin Invest, 1994. 94(3): p. 1243-51.
48. Di Virgilio, F., et al., *Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions*. J Immunol, 1988. 140(3): p. 915-20.
49. Steinberg, T.H., et al., *Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix*. J Cell Biol, 1987. 105(6 Pt 1): p. 2695-702.
50. Hwang, S.B., et al., *Biochemical and pharmacological characterization of L-659,989: an extremely potent, selective and competitive receptor antagonist of platelet-activating factor*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. 246(2): p. 534-41.
51. Pattison, J., et al., *RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney*. Lancet, 1994. 343(8891): p. 209-11.
52. Lindner, V., J. Fingerle, and M.A. Reidy, *Mouse model of arterial injury*. Circ Res, 1993. 73(5): p. 792-6.
53. Ramos, C.L., et al., *Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E- deficient mice*. Circ Res, 1999. 84(11): p. 1237-44.
54. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. 76(2): p. 301-14.
55. Wen, D.Z., A. Rowland, and R. Derynck, *Expression and secretion of gro/MGSA by stimulated human endothelial cells*. Embo J, 1989. 8(6): p. 1761-6.
56. Rollins, B.J., et al., *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*. Am J Pathol, 1990. 136(6): p. 1229-33.
57. Rot, A., *Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration*. Immunol Today, 1992. 13(8): p. 291-4.
58. Ali, S., et al., *Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 2000. 275(16): p. 11721-7.
59. Jones, S.A., et al., *Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2*. J Biol Chem, 1997. 272(26): p. 16166-9.
60. Schwartz, D., et al., *Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL- stimulated endothelium*. J Clin Invest, 1994. 94(5): p. 1968-73.
61. Middleton, J., et al., *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell, 1997. 91(3): p. 385-95.
62. Webb, L.M., et al., *Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(15): p. 7158-62.
63. Schonbeck, U., et al., *IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells*. J Immunol, 1995. 154(5): p. 2375-83.

64. Chuntharapai, A., et al., *Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes*. J Immunol, 1994. 153(12): p. 5682-8.
65. Walz, A., et al., *[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA*. J Leukoc Biol, 1991. 50(3): p. 279-86.
66. Luscinskas, F.W., et al., *L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro*. J Immunol, 1996. 157(1): p. 326-35.
67. Kukreti, S., et al., *Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1beta-stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions*. Blood, 1997. 89(11): p. 4104-11.
68. Spertini, O., et al., *Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions*. J Exp Med, 1992. 175(6): p. 1789-92.
69. Alon, R., et al., *Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow*. J Cell Biol, 1996. 135(3): p. 849-65.
70. Giuffre, L., et al., *Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans*. J Cell Biol, 1997. 136(4): p. 945-56.
71. Weber, C., et al., *Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis*. J Cell Biol, 1996. 134(4): p. 1063-73.
72. Randolph, G.J. and M.B. Furie, *A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro*. J Immunol, 1995. 155(7): p. 3610-8.
73. Kitayama, J., et al., *The C-C chemokine receptor CCR3 participates in stimulation of eosinophil arrest on inflammatory endothelium in shear flow*. J Clin Invest, 1998. 101(9): p. 2017-24.
74. Weber, C., et al., *Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells*. J Immunol, 1997. 159(8): p. 3968-75.
75. Campbell, J.J., et al., *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol, 1996. 134(1): p. 255-66.
76. Graham, G.J., et al., *Uncoupling of stem cell inhibition from monocyte chemoattraction in MIP-1alpha by mutagenesis of the proteoglycan binding site*. Embo J, 1996. 15(23): p. 6506-15.
77. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. 91(4): p. 521-30.
78. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. 67(6): p. 1033-6.
79. Detmers, P.A., et al., *Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils*. J Exp Med, 1990. 171(4): p. 1155-62.
80. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. 279(5349): p. 381-4.
81. Foxman, E.F., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis*. J Cell Biol, 1997. 139(5): p. 1349-60.

82. Campbell, J.J., E.F. Foxman, and E.C. Butcher, *Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration*. Eur J Immunol, 1997. 27(10): p. 2571-8.
83. Piali, L., et al., *The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig*. Eur J Immunol, 1998. 28(3): p. 961-72.

## 8. Anhang

### 8.1. Materialien

#### 8.1.1 Chemikalien

ABTS	Molecular Probes
Aceton	Merck
APES	Sigma
BSA	Sigma
BCECF/AM	Molecular Probes
Calcein acetoxymethylester	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid	Merck
EDTA	Sigma Chemical Co
EGM	PromoCell
Ethanol	Merck
Evan's blue	Sigma Chemical Co
FKS	Sigma
Fura2-AM	Molecular Probes
Gelatine	Sigma
Glukose	Merck
Glutamin	Seromed
Heparitinase	Sigma
HEPES	Sigma
HSA	Sigma
Hydrocortisonacetat	Sigma
Il-1 $\beta$	Pepto Tech.
Kollagen	Sigma
LPS	Sigma
M 199	Life Technologies
MCDB 131	Gibco BRL, Eggenstein
Methanol	Merck
MOPS	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaOH	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumoxalacetat	Merck
Natriumpyruvat	Merck
Nycoprep 1.068	Nycomed (Oslo)
PBS	Life Technologies
Pertussistoxin	Calbiochem
RANTES	Pepto Tech.
RPMI-1640	Sigma Chemical Co
TNF- $\alpha$	Pepto Tech.
Trypsin/EDTA	Sigma Chemical Co
Xylol	Merck



### 8.1.2. Lösungen

Superfusion: 145mmol/L NaCl; 4,7mmol/L KCl; 2,0 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 1,2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>  
\* 7 H<sub>2</sub>O; 5,0 mmol/L Glukose; 2,0 mmol Pyruvat; 1,2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\* H<sub>2</sub>O ; 2 mmol/L  
MOPS, 1% HSA, . 5 U/ml Heparin, pH 7,4)

HHMC: Hank's, 10mM Hepes, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>

Hepes-Puffer: 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 120 mM NaCl<sub>2</sub>, 2,7 mM KCl, 1,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,4 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 % Bovines Albumin, pH = 7,4

HMVEC Medium:

MCDB 131 mit 10% FKS , 1mg/ml Hydrocortisonacetat, 5X10<sup>5</sup> M

Dibutyryladenosenmonophosphat, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml

Streptomycin, 25 mg/ml Amphotericin B, 0.5% Gelatine

### 8.1.3. Antikörper und Antagonisten

CCR2 5A11 Dr. G. LaRosa

CXCR2 10H2 Dr. C. Herbert

GRO-α R&D Systems

MCP-1 R&D Systems

P-Selektin AK-4 Pharmingen

RANTES C-19 Santa Cruz

VI-1 P. Nelson

VI-3 P.Nelson

Met-RANTES A.Proudfoot

8-73 I.Clark-Lewis

8-76 I.Clark-Lewis

### 8.1.4. Medikamente

Nembutal Abott Laboratories

Atropin Elkins-Sinn Inc.

Ketalar Parke-Davis

## 8.2. Für die Dissertation relevante Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung vorab veröffentlicht. Die Veröffentlichungen enthalten entsprechende Hinweise auf diese Dissertation und sind in der nachfolgenden Publikationsliste aufgeführt:

**von Hundelshausen P**, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C.  
RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium.  
Circulation. 2001 Apr 3;103(13):1772-7.

Weber KS, **von Hundelshausen P**, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C.  
Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow.  
Eur J Immunol. 1999 Feb;29(2):700-12.

## 8.3. Sonstige Publikationen

Schober A, Manka D, **von Hundelshausen P**, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K, Weber C.  
Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury.  
Circulation 2002 Sep 17; 106(12):1523-9

Neuzil J, Schroder A, **von Hundelshausen P**, Zerneck A, Weber T, Gellert N, Weber C.  
Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage.  
Biochemistry. 2001 Apr 17;40(15):4686-92.

Weber C, Belge KU, **von Hundelshausen P**, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW.  
Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations.  
J Leukoc Biol. 2000 May;67(5):699-704.

Draude G, **von Hundelshausen P**, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber C.  
Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+)  
monocyte subset.  
Am J Physiol. 1999 Apr;276: 1144-9.

## **9. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med P.C. Weber für die Möglichkeit diese Dissertation an seinem Institut durchführen zu können. Hier fanden im Rahmen von Journal Clubs und „progress reports“ stets fruchtbare Diskussionen statt.

Besonderer Dank gebührt Prof. C.Weber und seiner Frau Kim, die weit über die grundlegenden Ideen und technische Betreuung hinaus mich persönlich mehr gefördert haben, als ich es erwartet hatte.

Ohne die technische Assistenz und so manchen Trick und Kniff von Brigitte Zimmermann, Kathrin von Oheimb und Nina Gellert wäre ich nur sehr mühsam vorangekommen.

Wichtige Techniken in der Immunhistochemie, der Karotisoperationen und immer eine zusätzliche Idee kamen schließlich noch von Klaus Ley und seinen Assistenten aus Charlottesville.

Peter Nelson und Christiane Klier danke ich für Hilfe beim Umgang mit den mikrovaskulären Endothelzellen und der Detektion von RANTES. Weiterhin hat H.W. Löms Ziegler-Heitbrock, der „Erfinder“ der Mono Mac 6 Zellen mir sehr geholfen.

Besonders wichtig war mir die fröhliche Atmosphäre am Institut, an der alle einen Beitrag hatten, für die ich mich bei allen besonders bedanke.

## LEBENS LAUF

Philipp von Hundelshausen  
geboren am 10.10. 1974 in München

### Eltern

Burkhard von Hundelshausen,  
Anästhesist

Christine von Hundelshausen,  
Physiotherapeutin

### Geschwister

Felix von Hundelshausen  
Jochen von Hundelshausen  
Anna von Hundelshausen

### Ausbildung

1981-1984      Grundschule  
1985-1994      Besuch des Wilhelm-Hausenstein-Gymnasiums  
1985-1995      Abitur  
1994 - 1995      Zivildienst GSF-Neuherberg  
1995 - 2002      Studium der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
1997            Ärztliche Vorprüfung  
1998            1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
1998            Beginn der Dissertation am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der  
Kreislaufkrankheiten, München  
1999            Stipendium der Grimmke-Stiftung  
2001            Forschungsaufenthalt am Institute for Biomedical Engineering der  
University of Virginia, Charlottesville  
2001            2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2001-2002      Praktisches Jahr  
2002            3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002            Arzt in Praktikum an der RWTH Aachen