

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten,  
Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. P.C. Weber

# **Funktion und Regulation der Tyrosinkinase Syk in Thrombozyten**

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

vorgelegt von  
Petra M. Maschberger  
aus Altötting

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Siess

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Walzog  
Priv.Doiz. Dr. M. Kretzler

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

Tag der mündlichen  
Prüfung: 21.10.2004

*Meiner Familie gewidmet*

# Gliederung

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>	
1.1	Klinische Relevanz der Untersuchungen	7
1.2	Thrombozyten, oxidativ modifiziertes LDL, Thrombin und kardiovaskuläre Erkrankungen	7
1.3	Tyrosinkinase Syk	9
1.4	Syk-Aktivierung in Thrombozyten	13
1.5	Fragestellung	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>	
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, Reagenzien	18
2.1.3	Bakterien- und Hefestämme, Vektoren, cDNA-Banken	20
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolation von humanen Thrombozyten, Maus-Thrombozyten und Maus-Megakaryozyten	23
2.2.2	Messung des <i>shape change</i> und der Aggregation	25
2.2.3	Milde Oxidation von LDL	25
2.2.4	Immunpräzipitation von Proteinen aus Thrombozyten-Lysaten (Syk, FAK, PLC $\gamma$ 2)	26
2.2.5	Isolierung des Thrombozyten-Aktinzytoskeletts	27
2.2.6	Pull-down Assay aus Thrombozytenlysaten mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk	27
2.2.7	Messung der Proteintyrosinphosphorylierung mittels Western Blot	28
2.2.7.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen	28
2.2.7.2	Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen	29
2.2.7.3	Immunologischer Nachweis der Proteine	30

2.2.7.4	Proteinfärbung mit Ponceau S	31
2.2.8	Densitometrische Auswertung des Western Blots	31
2.2.9	Transiente Transfektion von CHO-Zellen	31
2.2.10	Untersuchungen mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie an ausgebreiteten humanen und Mäuse-Thrombozyten, und CHO-Zellen	32
2.2.11	Untersuchungen an knock-out Mäusen	35
2.2.12	Yeast Two-Hybrid System	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Methodik	38
3.1.1	Expression von Syk in Thrombozyten, aber nicht in Endothelzellen	38
3.1.2	Messung der Syk-Tyrosinphosphorylierung nach Immunpräzipitation	39
3.1.3	Expression von Syk bei verschiedenen Probanden	43
3.2	Tyrosinphosphorylierung von Syk während des <i>shape change</i>	44
3.2.1	Aktivierung nach Stimulation des Thrombin-Rezeptors PAR-1 und nach mox-LDL (milde oxidiertes LDL)	44
3.2.2	Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ unabhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk während des <i>shape change</i>	48
3.2.2.1	Thrombasthenia Glanzmann	48
3.2.2.2	RGDS	51
3.2.3	Regulation	51
3.2.3.1	Proteinkinase C	51
3.2.3.2	Calcium	52
3.2.3.3	Piceatannol und weitere Proteintyrosinkinase-Hemmer, Iloprost	55
3.3	Funktion der Syk-Tyrosinphosphorylierung für den <i>shape change</i>	57
3.3.1	Untersuchungen an mit EGTA vorbehandelten Thrombozyten	57
3.3.2	Einfluß von allgemeinen und spezifischen Inhibitoren der Src-Kinasen auf Syk- Tyrosinphosphorylierung und <i>shape change</i>	60
3.3.3	Untersuchungen an Syk(-/-)-Mausthrombozyten	63

3.4	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk	65
3.4.1	Transfizierte CHO-Zellen als Modellsystem für einen ITAM unabhängigen Signalweg der Syk-Aktivierung	65
3.4.2	Thrombozyten	68
3.4.2.1	Thrombozyten-Aggregation: FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung, Syk- und PLC $\gamma$ 2-Aktivierung	70
3.4.2.2	Dissoziation des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ : FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung, Syk- und PLC $\gamma$ 2-Aktivierung	81
3.4.2.3	Ausbreitung	85
3.5	Yeast Two-Hybrid System zur Identifikation von Interaktionspartnern von Syk	93
<b>4. Diskussion</b>		<b>95</b>
4.1	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unabhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk während des <i>shape change</i>	95
4.2	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk	102
4.3	Perspektive	106
<b>5. Zusammenfassung</b>		<b>107</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>		<b>109</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>124</b>

## Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Danksagung

Lebenslauf

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinische Relevanz der Untersuchungen

Kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen sind in westlichen Industrieländern führend für Mortalität und Morbidität. Ein fundamentales Verständnis der pathogenetischen Mechanismen ermöglicht die Entwicklung neuer Ansätze in Diagnostik, Prävention und Therapie entsprechender Krankheitsbilder. Bei der Pathogenese der Arteriosklerose sind verschiedene Zelltypen beteiligt: Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und glatte Muskelzellen, die miteinander und mit Stoffwechselfaktoren interagieren.

Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen wird durch biologische Signale vermittelt. Zelluläre Interaktionen können hierbei als Vorgänge betrachtet werden, die sich in zwei Schritten vollziehen. Zunächst bindet ein extrazelluläres Molekül an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelle und versetzt ihn in einen aktiven Zustand. Dann stimuliert der Rezeptor intrazelluläre biochemische Mechanismen, die zu einer Zellantwort führen.

Die Tyrosinkinase Syk wird bei der Stimulation des B-Zellrezeptors auf Lymphozyten und verschiedener Fc-Rezeptoren auf Lymphozyten und Monozyten durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Auch in Thrombozyten wurde die Aktivierung von Syk nach Stimulation mit diversen physiologischen Agonisten z.B. Thrombin, PAF und Kollagen beobachtet. Die Rolle dieser Tyrosinkinase für die Thrombozytenfunktion und thrombozytäre Signaltransduktion, sowie deren Regulation sind noch weitgehend ungeklärt.

## 1.2 Thrombozyten, oxidativ modifiziertes LDL, Thrombin und kardiovaskuläre Erkrankungen

Thrombozyten sind neben ihrer physiologischen Bedeutung in der Hämostase auch in einer Vielzahl von pathologischen Prozessen involviert. In arteriosklerotischen Blutgefäßen spielen sie bei der Bildung von Thromben mit der Folge des Myokardinfarkts und Apoplex eine entscheidende Rolle. Seit Virchow wurden viele Anstrengungen unternommen, um die Pathogenese der Arteriosklerose zu erklären. Die 1976 entwickelte *response to injury* Hypothese lieferte ein wichtiges Konzept, um diesen komplizierten Prozeß zu verstehen.

Diese Hypothese involviert eine Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten nach einer Verletzung des Endothels (Ross und Glomset, 1976; Ross, 1986; Ross, 1993). Das Endothel wird in der Weise geschädigt, daß es für viele Blutproteine, auch das LDL durchlässig wird. Außerdem können Monozyten an aktiviertes Endothel adhären, in die Gefäßintima immigrieren und dort zu Makrophagen differenzieren. Diese nehmen oxidiertes LDL auf und werden dadurch zu Schaumzellen, die in der Regel die Gefäßwand nicht mehr verlassen.

Es wird angenommen, daß nicht LDL, sondern vor allem oxidativ modifiziertes LDL den pathogenetischen Faktor bei der Arteriosklerose darstellt. Weiche lipid-reiche Plaques, welche u.a. LDL und oxidiertes LDL enthalten, sind vulnerabel und legen nach Ruptur thrombogene Substanzen und LDL-Partikel frei (Fernandez-Ortiz et al., 1994). Dadurch können zirkulierende Plättchen innerhalb von Sekunden aktiviert und zur Aggregation gebracht werden, was zu einer intravaskulären Thrombusbildung führt. Der entstandene Thrombus kann einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt hervorrufen (Falk et al., 1995). *In vitro* aktiviert oxidiertes, jedoch nicht natives LDL Thrombozyten, wobei milde oxidiertes LDL (mox-LDL) aktiver ist als stark oxidiertes LDL (ox-LDL), und im Gegensatz zu stark oxidiertem LDL zur Thrombozyten-Aggregation führt (Meraji et al., 1992; Weidtmann et al., 1995).

Mox-LDL könnte auch im Kreislauf anwesend sein. Eine Fraktion von LDL, welche aus elektronegativen, schwach oxidierten LDL-Partikeln geringer Dichte besteht, wurde im peripheren Blut gefunden (Avogaro et al., 1991; Sevanian et al., 1997). Eine Interaktion der Plättchen mit zirkulierendem mox-LDL könnte die verstärkte Neigung der Plättchen zur Aggregation erklären, welche häufig bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird. Tatsächlich wurde bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen oder Arteriosklerose ein Vorherrschen von zirkulierenden LDL-Partikeln geringer Dichte beschrieben (Slyper et al., 1994). Außerdem werden erhöhte Konzentrationen von ox-LDL im Blut von Patienten mit instabiler Angina pectoris gefunden (Holvoet et al., 1998). Die Interaktion von zirkulierendem mox-LDL mit Thrombozyten könnte die intravaskuläre Thrombusbildung an hämodynamisch kritischen Stenosen von Koronararterien und Carotisarterien begünstigen.

Während ox-LDL oft toxische Effekte auf Zellen hat (Hughes et al., 1994; Coffey et al., 1995), scheint mox-LDL die Funktion von Zellen der Gefäßwand und der Plättchen durch Stimulation von spezifischen Rezeptoren und Signaltransduktionswegen zu verändern (Parhami et al., 1993; Berliner et al., 1995; Weidtmann et al., 1995).

Thrombin ist nicht nur der stärkste physiologische Thrombozyten-Stimulus, sondern aktiviert auch andere vaskuläre Zellen, wie z. B. Endothelzellen, und spielt bei den der Arteriosklerose zugrunde liegenden hämostatischen, thrombotischen und entzündlichen Prozessen eine zentrale Rolle (Coughlin et al., 2000). Thrombin wird durch Aktivierung des Gerinnungssystems gebildet und aktiviert Thrombozyten und andere Zellen über die Bindung an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*protease-activated receptors*, PARs). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung durch ox-LDL und Thrombin könnte neue präventive und therapeutische Strategien bei atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen liefern.

### 1.3 Tyrosinkinase Syk

Der Begriff Kinase geht auf den griechischen Ausdruck *kinein* zurück, was Bewegen bedeutet, also Übertragung einer energiereichen Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf bestimmte Aminosäuren. Diese dynamische Proteinphosphorylierung stellt einen wichtigen Signalübertragungsmechanismus in der Zelle dar. Vor allem werden hierbei die drei Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen macht weniger als 0,01% der totalen intrazellulären Proteinphosphorylierung aus.

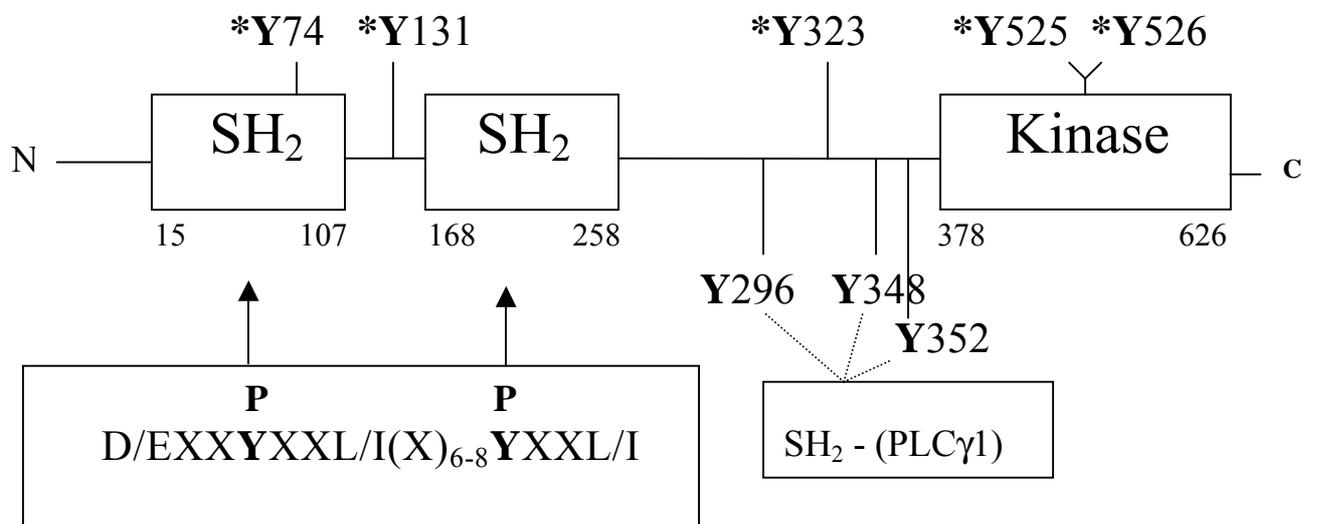
Die Tyrosinkinase Syk (spleen tyrosine kinase) wurde zuerst in Schweine-Splenozyten beschrieben (Chan et al., 1991; Taniguchi et al., 1991; Chan et al., 1992; Yamada et al., 1993). Syk ist stark konserviert zwischen Mensch und Schwein. Das für das humane Syk kodierende Gen wurde auf dem Chromosom 9, Bande q22 lokalisiert (Law et al., 1994). Außer Syk in B-Lymphozyten und Mastzellen wurde eine zu Syk homologe Proteintyrosinkinase, ZAP-70, in T-Lymphozyten beschrieben. Eine autosomal rezessive Erkrankung des Immunsystems, bei der ZAP-70 nicht gebildet wird, gibt Hinweise auf die Signaltransduktion bei der T-Lymphozytenentwicklung (Perlmutter et al., 1994). Bei ZAP-70 handelt es sich um ein Phosphotyrosin-enthaltendes Protein mit Molekülmasse 70 kD, welches mit den  $\zeta$ -Ketten des T-Zell-Antigen-Rezeptor Komplexes während der T-Zellaktivierung assoziiert. Daher stammt auch der Name: *zeta-associated protein-70* (Chan et al., 1992). ZAP-70 negative Patienten entwickelten zwar eine normale Anzahl an zirkulierenden Lymphozyten, jedoch führte eine T-Zellrezeptorstimulation nicht zur

Proliferation (Arpaia et al., 1994). Desweiteren war bei Patienten mit einer ZAP-70 Mutation zu beobachten, daß bei der T-Zellproduktion nur CD4<sup>+</sup>, aber nicht CD8<sup>+</sup> Zellen entstanden, was auf eine fehlerhafte Reifung der Thymuszellen hinweist.

Syk wird vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Hier wird Syk nach Aktivierung des B-Zellrezeptors auf Lymphozyten und verschiedener Fc-Rezeptoren auf Lymphozyten und Monozyten stimuliert. Außerdem ist Syk in der Lymphozytendifferenzierung und in der Mastzell-Degranulation involviert (Turner et al., 1995). Desweiteren wird Syk nach Ligandenbindung von  $\beta$ 1 Integrinen in Neutrophilen und  $\beta$ 2 Integrinen in monozytären Zellen aktiviert (Lin et al., 1995; Yan et al., 1997).

Syk ist eine Proteintyrosinkinase, die tandemartig angeordnet zwei aminotermine SH2-Domänen, zwei Spacer-Regionen, die Kinase-Domäne und den C-Terminus enthält (Abb. 1) (Chan et al., 1992). Die Aktivierung des Proteins Syk erfolgt vermutlich über ein doppelt phosphoryliertes *Immunoreceptor Tyrosine Activation Motiv* (ITAM) (Kurosaki et al., 1995), das einen Bereich von etwa 18 – 20 Aminosäuren umfaßt (Rowley et al., 1995). In Thrombozyten kommen zwei ITAM-enthaltende Proteine vor, der Fc $\gamma$ RIIA Rezeptor (Chacko et al., 1994) und die Fc $\gamma$ R Untereinheit (Gibbins et al., 1996; Asselin et al., 1997), wobei die letztere bei der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen eine wesentliche Rolle spielt (Asselin et al., 1997; Ichinohe et al., 1997; Poole et al., 1997). Die Assoziation der Syk Tandem-SH2-Domäne mit tyrosinphosphoryliertem ITAM (s. Abb. 1) stimuliert die Syk-Autophosphorylierung. Vor allem die hierbei in der katalytischen Domäne erfolgende Phosphorylierung von Tyrosin 525 und Tyrosin 526 ist für die Aktivierung der Kinase verantwortlich (Kimura et al., 1996; El-Hillal et al., 1997).

# p72<sup>syk</sup>



## Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif (ITAM)

Abb. 1: Struktur von Syk und Interaktionen mit anderen Proteinen

\*Y: phosphoryliertes Tyrosin

Phospholipase C $\gamma$ 1 stellt ein Substrat von Syk dar, dessen SH2-Domäne mit konservierten Phosphotyrosinresten in der Linkerregion von Syk interagiert (Abb. 1) (Law et al., 1996). PLC $\gamma$ 1, ein Isoenzym der Phosphoinositide-spezifischen Phospholipase C-Familie, nimmt eine zentrale Rolle in Signaltransduktionswegen ein. Die Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 führt zur Aktivierung des Enzyms und zur Bildung von Inosit-1,4,5-Trisphosphat und 1,2-Diacylglycerid, welches Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung und die Aktivierung der Proteinkinase C induziert.

Mit dem Yeast Two-Hybrid System konnte die Gruppe um Altman Vav1 (*guanine nucleotide exchange factor*, *GEF*, für die Rho/Rac Familie der GTPasen) als Interaktionspartner *downstream* von Syk ermitteln (Deckert et al., 1996). Es gibt drei verschiedene Vav Proteine: Vav1 wird vor allem im hämatopoetischen System, Vav2 und Vav3 werden ubiquitärer exprimiert. Vav1 ist ein durch ein Proto-Onkogen kodiertes Protein. Vav1 assoziiert mit Syk bzw. ZAP-70 in B- und T-Zellen. Es handelt sich hierbei um eine direkte Interaktion, welche die katalytische Aktivität von Syk erfordert, die SH2-Domäne von Vav1 und spezifische Tyrosinreste in der Linkerdomäne von Syk. Vav1 wird von Syk-Kinasen *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert. Syk und Vav1 induzieren zusammen die Aktivierung von JNK (*Jun N-terminal kinase*), ERK2 (*extracellular-signal-regulated kinase 2*), der Kinase Akt sowie die Tyrosinphosphorylierung des Oncoproteins Cbl (Miranti et al., 1998). Weiterhin sind die Proteine der Vav-Familie an Prozessen der Zytoskelett-Reorganisation beteiligt (Hornstein et al., 2004).

Cbl konnte als negativer Regulator *downstream* von der Tyrosinkinase Syk identifiziert werden. Cbl and Syk bilden einen Komplex, in dem die N-terminale Hälfte von Syk mit seiner Tandem-SH2-Domäne an die N-terminale Domäne von Cbl (AS: 1-655) bindet (Ota et al., 1997). Die Überexpression von Cbl führte zu einer erniedrigten Tyrosinphosphorylierung von Syk. Cbl kann somit als endogener Regulator der Signaltransduktion und der Zellaktivierung dienen.

Sidorenko et al. zeigten, daß Syk und Lyn aus humanen B-Lymphozyten direkt interagieren können. Syk und Lyn wurden aus reifen und aktivierten B-Zellen coimmunpräzipitiert und gel-gereinigtes Syk und Lyn reassozierten *in vitro*, was ihre direkte Assoziation zeigt (Sidorenko et al., 1995). Die Lck-Kinase, eine weitere Proteintyrosinkinase der Src-Familie, konnte via Yeast Two-Hybrid System als Interaktionspartner identifiziert werden (Couture et

al., 1996). Die Tyrosinreste Tyr<sup>518</sup> und Tyr<sup>519</sup> der Autophosphorylierungsstellen von Syk binden an die SH2-Domäne von Lck während der Thrombozyten-Aggregation.

## 1.4 Syk-Aktivierung in Thrombozyten

Viele zelluläre Proteine werden während der Thrombozytenaktivierung an Tyrosin phosphoryliert. Verschiedene Mechanismen regulieren diesen Prozeß. Die Aktivierung von Thrombozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren führt zum Formwandel von diskoid zu sphärisch und der Ausbildung von Pseudopodien, dem sogenannten *shape change*. Dieser stellt die früheste Antwort während der Thrombozytenaktivierung dar und kann unabhängig von einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und einer Sekretion des Granulainhalts erfolgen (Siess et al., 1989; Rasmussen et al., 1993). Während des Formwandels kommt es zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung von Proteinen mit der Molekülmasse von 62 kDa, 68 kDa und 130 kDa. Da durch den Tyrosinkinasehemmer Genistein die Stimulierung der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine und der Formwandel inhibiert werden, führte dies zu der Annahme, daß die Aktivierung von Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle für die frühe Phase der Thrombozyten-Aktivierung spielt (Negrescu et al., 1995).

Nach dem Formwandel kommt es während der physiologischen Thrombozyten-Aktivierung zur Aggregation. Der Aggregation liegt die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zugrunde. Integrine sind nicht-kovalente  $\alpha\beta$  Heterodimere. Jede Untereinheit besteht aus einer relativ großen NH<sub>2</sub>-terminalen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Membrandomäne und einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Ruhende Thrombozyten enthalten etwa 80000 Oberflächekopien des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und einen zusätzlichen Pool an Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in den Membranen der  $\alpha$ -Granula und dem offenen kanikulären System (Wagner et al., 1996). Die Aktivierung von Thrombozyten über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  läuft in zwei Phasen ab (s. Abb. 2). Zum einen werden die Thrombozytenfunktionen durch einen Prozeß reguliert, der als *inside-out signaling* bekannt ist. Hierbei erhöhen bzw. erniedrigen Plättchenagonisten bzw. bestimmte Plättchenhemmer (Prostazyklin) die Affinität des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  für adhesive Liganden wie Fibrinogen (Shattil und Ginsberg, 1997; Shattil et al., 1998). Die Bindung von Fibrinogen an das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin verursacht ein *clustering* der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine und führt zu *outside-in* Signalen, die die

Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und die Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung zahlreicher Proteine zur Folge haben (Clark und Brugge, 1995). In späteren Stadien der Aggregation tritt Tyrosindephosphorylierung ein, welche gleichzeitig mit einer Aktivierung und/oder Rückverteilung von spezifischen Proteintyrosinphosphatasen einhergeht (Ezumi et al., 1995). Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  spielt eine essentielle Rolle bei der Hämostase und Thrombose durch die Vermittlung von Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

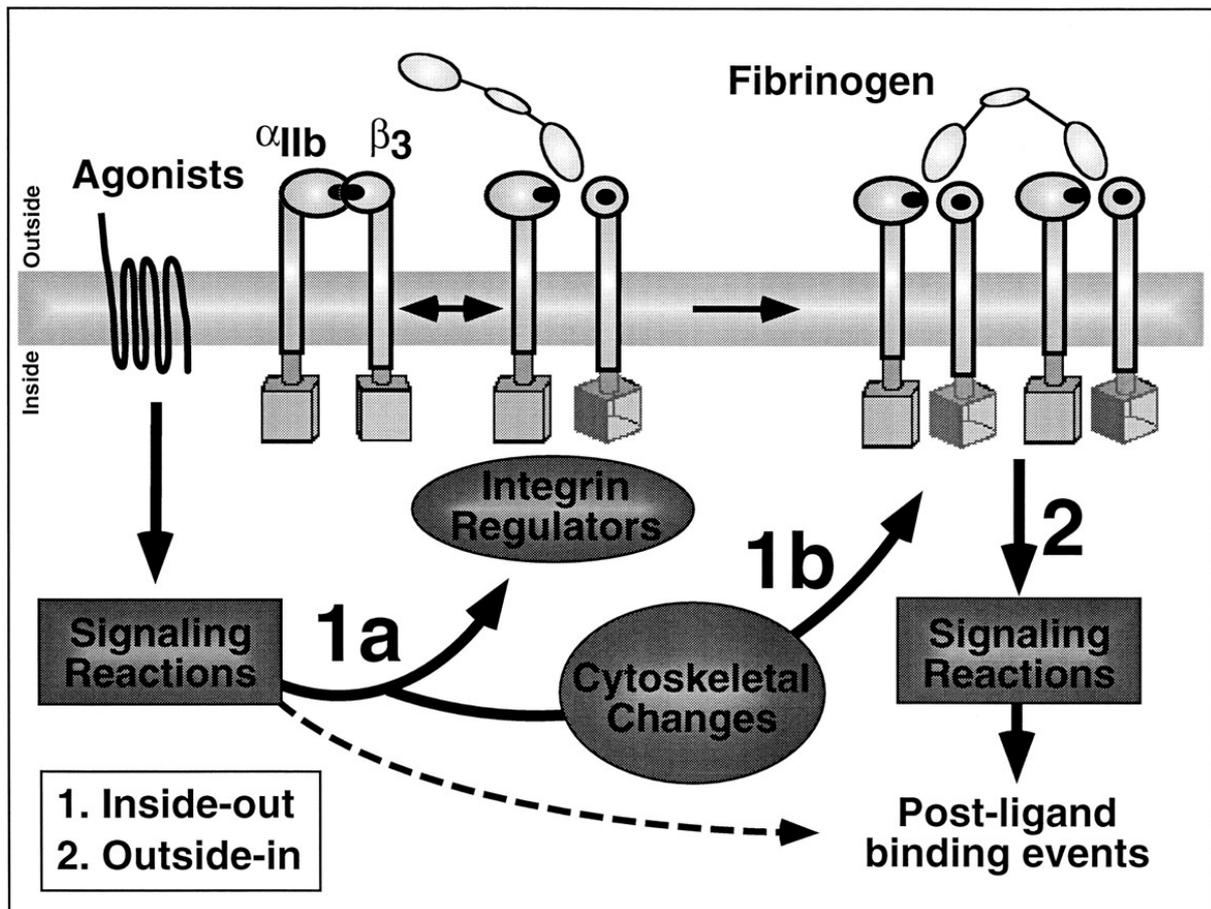


Abb. 2: Schema des *inside-out* und *outside-in* signaling (Shattil et al., 1998)

Thrombozyten enthalten die Tyrosinkinase Syk sowie Tyrosinkinasen der Src-Familie (Golden et al., 1986; Ferrell et al., 1990; Jackson et al., 1996; Arias-Salgado et al., 2003). Syk wird nach Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Thrombozyten aktiviert (Shattil und Brass, 1987; Shattil et al., 1992; Taniguchi et al., 1993; Hers et al., 1998). Dabei wurde gefunden, daß schon während der frühen Thrombozyten-Aktivierung, die im Review von Clark et al. als Phase des Formwandels und der Sekretion definiert wird, Syk und Src-Proteintyrosinkinasen aktiviert werden (Clark et al., 1994).

Während der Thrombozyten-Aggregation, ausgelöst durch Aktivatoren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie PAF (Rezaul et al., 1994), Thrombin und Thromboxan-Analoga, wird die Syk-Tyrosinphosphorylierung weiter erhöht (Clark et al., 1994). Untersuchungen von der Gruppe von Shattil zeigten, daß Syk außer während der Aggregation auch während der Thrombozytenausbreitung (*spreading*) vermehrt tyrosinphosphoryliert wird und dies eine Folge der Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch Fibrinogen ist (Miranti et al., 1998). Die Behandlung mit Antikörpern, welche die Fibrinogenbindung an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  blockiert, reduzierte die Tyrosinphosphorylierung von Syk um 40% (Clark et al., 1994). Weiterführende Untersuchungen an transfizierten CHO-Zellen zeigten, daß Syk ein proximales Glied bei der Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelten Signaltransduktion darstellt. Dabei sind die zytoplasmatischen Enden sowohl von der  $\alpha_{IIb}$ - als auch der  $\beta_3$ -Untereinheit für die Syk-Aktivierung erforderlich (Gao et al., 1997). Woodside et al. beschreiben eine direkte Bindung von Syk an das zytoplasmatische Ende des  $\beta_3$ -Integrins (Woodside et al., 2001). Außerdem ist Syk an einer Stimulus-induzierten Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Mausthrombozyten beteiligt (Law et al., 1999). Allerdings enthalten diese Integrine in ihren zytoplasmatischen Bereichen keine ITAMs, d.h. es wurde vorgeschlagen, daß die Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängige Syk-Aktivierung ITAM-unabhängig verläuft (Gao et al., 1997). Außer der Ligandenbindung an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  führt die Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch EGTA zur Tyrosinphosphorylierung von Syk und zu einem Anstieg der Syk-Kinaseaktivität (Negrescu und Siess, 1996). Diese Untersuchungen schlagen somit fundamentale Unterschiede in der Aktivierung von Syk durch das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und durch Immunrezeptoren vor.

Außer nach Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird Syk nach Kollagen-Aktivierung von Thrombozyten stark aktiviert. Am Modell der Syk knock-out Maus konnte von der Gruppe um S.P. Watson eine zentrale Rolle für Syk in der Kollagen-stimulierten thrombozytären Signaltransduktion gezeigt werden. Bei der Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliales Kollagen wird eine Signalkaskade ausgelöst, die vor allem durch die Bindung von Kollagen an das Glykoprotein VI (GPVI) auf der Thrombozytenmembran vermittelt wird. Die Bindung von Kollagen an GPVI führt unter Beteiligung von Src-Tyrosinkinase zur Phosphorylierung des ITAM innerhalb der FcR $\gamma$ -Kette, die eng mit GPVI assoziiert ist. Das tyrosinphosphorylierte ITAM bindet an die Tandem-SH2-Domäne der Tyrosinkinase Syk. Die folgende Aktivierung von Syk führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (Gibbins et al., 1996; Watson and Gibbins, 1998; Watson, 1999). Die Frage, welche Tyrosinkinase ITAM innerhalb der FcR $\gamma$ -Kette an Tyrosin

hosphorylieren, wurde weitgehend geklärt. Es sind dies Tyrosinkinasen der Src-Familie. Src ist in Thrombozyten stark exprimiert und repräsentiert 0,2 - 0,4% des gesamten Plättchenproteins (Golden und Brugge, 1989). Vor allem Fyn und Lyn assoziieren in Kollagen-aktivierten Thrombozyten mit tyrosinphosphorylierten Proteinen, wozu auch die FcR $\gamma$ -Kette gehört (Bridson et al., 1999). Auch nach Thrombozyten-Aktivierung mit Thrombin werden Tyrosinkinasen der Src-Familie (Src, Fyn Yes und Lyn) aktiviert (Clark et al., 1994). Inwiefern für die Aktivierung der Syk-Tyrosinkinase in Thrombin-aktivierten Thrombozyten Tyrosinkinasen der Src-Familie eine Rolle spielen, ist unklar. Während also Fibrinogen über die Bindung an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine ITAM-unabhängige Syk-Aktivierung induziert, kommt es nach einer Stimulation mit Kollagen über die Bindung an GPVI zu einer ITAM-abhängigen Syk-Stimulation.

## 1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde im Bereich der Signaltransduktion in Thrombozyten die Funktion und Regulation der Tyrosinkinase Syk während Formwandel, Aggregation und Ausbreitung untersucht.

Als Thrombozytenstimuli wurden vorwiegend mox-LDL und Thrombin bzw. das Heptapeptid YFLLRNP, das den Thrombinrezeptor PAR-1 partiell aktiviert, verwendet. Die Aktivierung der Thrombozyten durch mox-LDL ist von pathophysiologischer Bedeutung für die Atherothrombose bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Da in der Arbeitsgruppe gefunden wurde, daß mox-LDL Lysophosphatidsäure (LPA) enthält und Plättchen über die Aktivierung von LPA-Rezeptoren stimuliert werden, wurde die frühe Aktivierung und Regulation der Tyrosinkinase Syk auch nach Aktivierung der Thrombozyten durch LPA untersucht.

Da unklar war, ob Syk während der frühen Phase der Thrombozytenaktivierung, d.h. während des Formwandels (ohne Sekretion von Inhaltsstoffen aus den Granula) aktiviert wird, wurden hierzu Untersuchungen durchgeführt. Weiterhin wurden Experimente zur Regulation der Syk-Aktivierung während des *shape change* und zur Funktion von Syk für den Formwandel unternommen.

Außerdem wurde die Funktion und Regulation von Syk während der Thrombozytenaggregation und -ausbreitung (*spreading*) untersucht. Hier sollte mit biochemischen und zellbiologischen Methoden die Signaltransduktionskette ausgehend von der Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bis hin zur Aktivierung von Syk und der Phospholipase  $C\gamma_2$  aufgeklärt werden („Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *outside-in signaling*“).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte**

Autoklav (Bioclav, Schütt); Brutschrank (WTCbinder, Tuttlingen); BiofugeA Tischzentrifuge (Heraeus Sepatech, Osterode); Lumi-Aggregometer, Platelet Ionized Calcium Aggregometer (Chronolog, NOBIS Labordiagnostica GmbH, Endingen); 2-Kanal-LABOR-Aggregometer (Fresenius, Bad Homburg); Lichtmikroskop D65323 (Leitz, Wetzlar); Multiphor II LKB Novablot (Pharmacia Biotech, Freiburg); Omnifuge 2. ORS (Heraeus Instruments GmbH, Biometra, Göttingen); Protean II xi Cell (Bio-Rad, München); Speed Vac Univapo 150 H (Uni Equip, Martinsried); Spektralphotometer Uvikon 930 (Kontron Instruments); Thermocycler UNO-Thermoblock (Biometra); Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg); Tischzentrifuge MR 1812 (Jouan GmbH, Unterhaching).

#### **2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, Reagenzien**

Trypton und Agar für Bakteriennährmedien wurden von Difco (Detroit), Hefeextrakt von Merck (Darmstadt) bezogen. Medien und anderweitige Reagenzien stammten von den Firmen Gibco/BRL (Eggenstein), PharMingen (San Diego), Seromed (Berlin) und Dianova (Hamburg).

Soweit nicht im Text anders erwähnt, wurden alle weiteren Chemikalien in p.a.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder ICN (Eschwege) bezogen.

Es wurde mit Nucleinsäure-modifizierenden Enzymen und Restriktionsenzymen mit den dazugehörigen Inkubationspuffern sowie Proteaseinhibitoren von Boehringer Mannheim, Pharmacia oder ICN gearbeitet.

Desweiteren wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Anti- $\beta$ 3 monoklonal, cat # I19620 (Transduction Laboratories)

Anti-p125Fak/Protein A-Agarose monoklonal, cat # 16-109 (UBI, Lake Placid, NY/USA)

Anti- $\gamma$ -subunit (TCR, Fc Receptors) polyklonal, cat # 06-727 (UBI, Lake Placid, NY/USA)

Anti-Phosphotyrosine PY20 monoklonal, cat # 05-321 (UBI, Lake Placid, NY/USA)

Anti-Phosphotyrosine 4G10 monoklonal (UBI, Lake Placid, NY/USA)

Anti-PLC $\gamma$ 2 (C-19) polyklonal, cat # 406 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA/USA)

Anti-Syk (4D10) monoklonal, cat # sc-1240 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA/USA)

Anti-Syk (LR, frei oder als Agarose-Konjugat) polyklonal, cat # sc-573 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA/USA)

Anti-Syk (C-20) polyklonal, cat # sc-929 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA/USA)

Anti-Vinculin, cat # 63-780 (ICN Biomedicals, Inc., Ohio/USA)

Anti-Maus IgG, an HRP gebunden (Amersham)

Anti-Kaninchen IgG, an HRP gebunden (Amersham)

Kontroll-Kaninchen IgG, kovalent an Agarose gebunden (Sigma, St. Louis, MO/USA)

#### Fluoreszenzfarbstoffe:

FITC anti-Maus (*New Alexa*<sup>TM</sup> 488, A-11001, Molecular Probes)

Rhodamine phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR/USA)

TRITC anti-Maus (*New Alexa*<sup>TM</sup> 568, A-11004, Molecular Probes)

TRITC anti-Kaninchen (*New Alexa*<sup>TM</sup> 568, A-11011, Molecular Probes)

#### Weitere Substanzen:

Apyrase (Sigma A-6535, Deisenhofen)

BAPTA-AM (5,5-Dimethyl-bis-(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetra-(acetoxymethyl)-ester) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR/USA)

Kollagen (Horn-Chemie, München)

FR-1 (Novabiochem)

Genistein (Calbiochem)

Oleoyl-LPA (Sigma)

PD173956 (Parke Davis, Geschenk von Dr. A.J. Kraker, MI/USA)

Piceatannol (Biomol, USA)

PP1 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA/USA)

RGDS (Sigma)

Rho-Kinase Hemmer Y-27632 (Geschenk von Dr. A. Yoshimura, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Saitama, Japan)

Ro-31-8220 (Roche; Geschenk von Dr. P. Presek, Pharmakologisches Institut, Universität Gießen)

Thrombin human (Boehringer Mannheim)

Tyrphostin A1 (Calbiochem)

Tyrphostin A23 (Calbiochem)

Tyrphostin A47 (Calbiochem)

YFLLRNP (Bachem Ltd., Bubendorf, Schweiz)

### 2.1.3 Bakterien- und Hefestämme, Vektoren, cDNA-Banken

#### Bakterien-Stämme:

E.coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Kompetente Zellen (Gibco BRL, Life Technologies)

Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>)  
*phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1*

E.coli Max-Efficiency<sup>TM</sup> HB101Kompetente Zellen (Gibco BRL, Life Technologies)

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrB mrr hsdS20* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2*  
*rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xy15 $\lambda$ <sup>-</sup> leu mtl1*

KC8 Chemisch Kompetente Zellen (Clontech)

DH5 $\alpha$ /pAS2-1

DH5 $\alpha$ /pAS2-1/p72 (Syk full-length)

DH5 $\alpha$ /pAS2-1/Syk kinase dead

DH5 $\alpha$ /pGBT9

DH5 $\alpha$ /pGBT9/3a

DH5 $\alpha$ /pGBT9/Syk full-length

DH5 $\alpha$ /pGBT9/Syk kinase dead

28F4/pACT

Kompetente Zellen E.coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> und Max-Efficiency<sup>TM</sup> HB101 wurden von Gibco-BRL Life Technologies, USA bezogen. Für Dauerkulturen wurden Bakterien bzw. Hefestämme mit 15 % final sterilem Glycerin versetzt, gut vermischt und schnell bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### Hefe-Stämme:

Name	Genotyp	Referenz
<i>S.c.</i> Y190	<i>MATa ade2-101 gal4-<math>\Delta</math> gal80-<math>\Delta</math> his3 leu2-3, 112 trp1-<math>\Delta</math>901 ura3-52 LYS2::<i>GAL1-HIS3</i> URA3::<i>GAL1-lacZ</i></i>	(Durfée et al., 1993)

Y190/pAS2-1

Y190/pAS2-1/Syk full-length

Y190/pAS2-1/Syk kinase dead

Y190/pAS2-1/Syk full-length, pGAD10/Knochenmarks-cDNA-Bank; clone 26

Y190/pGBT9

Y190/pGBT9/2b

Y190/pGBT9/3a

Y190/pGBT9/Syk full-length

Y190/pGBT9/Syk kinase dead

Y190/pGBT9/GP3a/Endonexin, (+)-Kontrolle für  $\beta$ -Galaktosidasetest

*S.c.* CG-1945

## **Vektoren:**

PAcG2T Baculovirus Transfer Vektor

pAS2-1: DNA-BD Vektor (DNA-bindende Domäne; *bait*-Plasmid)

pAS2-1/Syk full-length

pAS2-1/Syk kinase dead

pUC 9 DNA

clone 28 (Endonexin)

pGBT9

pGBT9/3a

pGBT9/2b

pGBT9/Syk full-length

pGBT9/Syk kinase dead

## **cDNA-Banken:**

(in *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>)

DH5 $\alpha$ /pGAD10/Knochenmarks-cDNA-Bank (pGAD10: Vektor mit DNA-aktivierender Domäne, DNA-AD, *prey*-Plasmid)

DH5 $\alpha$ /pGAD10/Fötale Leberzellen-cDNA-Bank

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von humanen Thrombozyten, Maus-Thrombozyten und Maus-Megakaryozyten

#### Isolation von humanen Thrombozyten

Die Blutentnahme erfolgte aus der Kubitalvene von gesunden Probanden (Alter: 20-50 Jahre) in 1/10 Volumen Natriumcitratlösung (3,13%, Fa. Fresenius, Bad Homburg). Das Blut wurde bei Raumtemperatur 20 min bei 180xg zentrifugiert und anschließend das Plättchen-reiche Plasma (PRP) abpipettiert. Nach Inkubation des PRP mit 1 mM Acetylsalicylsäure und 0,3 U/ml Apyrase für 15 min bei 37°C, wurden 9 mM Citronensäure und 5 mM EDTA (pH 7,4) zugegeben und bei 800xg (20 min, RT) zentrifugiert.

Das Thrombozytenpellet wurde anschließend in Puffer B (10% des Vollblut-Volumens) mit 0,6 U/ml Apyrase resuspendiert.

#### Puffer B:

20 mM HEPES, 138 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM EGTA, pH 6,2
---

Vor dem erneuten Zentrifugationsschritt bei 800xg, 20 min, RT wurde eine Probe mit THROMBO PLUS<sup>®</sup> Spezialzählösung (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verdünnt und die Thrombozyten-Zahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Das Zellpellet wurde schließlich in entsprechendem Volumen Puffer C mit 0,6 U/ml Apyrase und 5 mM Glucose aufgenommen. Hierbei ergeben 200 ml Blut etwa 10 ml Thrombozytensuspension mit einer Konzentration von 800000 Zellen/μl.

#### Puffer C:

20 mM HEPES, 138 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
--

## **Isolation von Maus-Thrombozyten und -Megakaryozyten**

### **Maus-Thrombozyten**

Die Präparation der Maus-Thrombozyten erfolgte am Department of Pharmacology, University of Oxford, UK (Dr. S.P. Watson) und wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Blutabnahme (etwa 1 ml Blut) im Verhältnis 1:10 in ACD (*Acid-Citrate-Dextrose*: Na-Citrat 25 g/l, Glucose 20 g/l, Citronensäure 15 g/l) durch Herzpunktion.
2. Abzentrifugieren des PRP (platelet rich plasma) bei 120xg, 10 min, RT.
3. PRP abpipettieren; Zugabe von 0,3 U/ml Apyrase (und je nach Versuchsanordnung evtl. 1 mM Aspirin), Inkubation für 15 min bei 37°C.
4. Zugabe von 9 mM Citronensäure und 5 mM EDTA, pH 7,4; Zentrifugation bei 1000xg für 10min bei RT.
5. Zugabe von Puffer B (Volumen: 10% des Blutvolumens), der 3 U/ml Apyrase enthält und Resuspension.
6. Zentrifugation bei 1000xg für 10 min bei RT.
7. Zugabe von vorgewärmtem Puffer C (37°C), der 0,6 U/ml Apyrase und 5 mM Glucose enthält; Zellzahlzählung mittels Zählkammer oder Zell-Counter und Einstellung der finalen Thrombozytenkonzentration.
8. Thrombozyten vor Versuchsbeginn 30 min ruhen lassen.

### **Maus-Megakaryozyten**

Ebenso wurden Maus-Megakaryozyten am Department of Pharmacology, University of Oxford untersucht.

#### Hank's Puffer:

143 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 10 mM Hepes
--------------------------------------

Am Versuchstag wurden dem Hank's Puffer 10 mM final Glucose zugegeben. Nach 20 – 30 min O<sub>2</sub>-Begasung wurden 0,4% BSA zugefügt und der pH-Wert auf 7,22 eingestellt. Pro Maus wurden zwei 1 ml Gefäße mit Hank's Puffer und 0,2 U/ml Apyrase final vorbereitet.

Dem verbleibenden Puffer wurden 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben.

Die Mäuse (4-8 Wochen alt) wurden mittels cervikaler Dislokation getötet und die Femoralknochen extrahiert, wobei das Knochenmark vorsichtig durch eine Spritzennadel (23) in Hank's Puffer gewaschen wurde. Anschließend wurde Prostazyklin (1 µg/ml) zugesetzt und die Zellen nach einem 8-minütigen Zentrifugationsschritt bei 500 rpm in frischem Puffer resuspendiert.

### **2.2.2 Messung des *shape change* und der Aggregation**

Aliquots der Thrombozytensuspension (Thrombozytenkonzentration: i.d.R. 800000/µl; Volumen: 0,5 - 1 ml) wurden in Aggregometerküvetten überführt und bei 37°C mit oder ohne entsprechende Hemmsubstanzen vorinkubiert (Zeit: 5 - 20 min). Nach Zugabe verschiedener Thrombozyten-Stimuli (mox-LDL, dem partiellen Thrombinrezeptor-Agonisten YFLLRNP, Thrombin, Kollagen) wurden der *shape change* bzw. die Aggregation der Thrombozyten in einem 2-Kanal-LABOR-Aggregometer oder in einem Lumi-Aggregometer gemessen.

Desweiteren erfolgte die Abnahme entsprechender Proben und Überführung in vorgelegten 2x Laemmli-Puffer (s. 2.2.7) zur Bestimmung der Proteintyrosinphosphorylierung in den Thrombozyten, bzw. nach Überführung in Lysis-Puffer (s. 2.2.4) zur Immunpräzipitation und Bestimmung der Tyrosinphosphorylierung der Proteine Syk, FAK und PLCγ2.

### **2.2.3 Milde Oxidation von LDL**

Die LDL-Präparation erfolgte entsprechend dem Protokoll von (Schulz et al., 1995) und (Weidtmann et al., 1995). Hierbei wurde von 400 ml Blut ausgegangen. LDL (0,5 - 5 mg/ml) wurde in einem N<sub>2</sub>-gesättigten Puffer (pH 7,4) dialysiert, welcher NaCl (150 mM), Chloramphenicol (0,15 mM) und EDTA (1 mM) enthielt und bei 4°C unter Lichtabschluß und N<sub>2</sub> gelagert wurde. Vor der Oxidation wurde EDTA aus dem LDL-Puffer entfernt. Dies erfolgte über Entsalzungssäulen (Econo-Pac 10 DG, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Mit Hilfe von Konzentratoren (Centricon 100, Fa. Amicon, Beverly, MA, USA) wurde auf eine Proteinkonzentration von 10-20 mg/ml in PBS eingengt. Der Proteingehalt wurde nach einer modifizierten Lowry Methode mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt

(Markwell et al., 1978). Die Oxidation des LDL (etwa 0,3 - 0,5 ml pro Eppendorff-Cup) erfolgte durch Zugabe von 640  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  bei 37°C unter leichtem Schütteln (niedrigste Stufe) für 18 - 20 h in einem Eppendorff Thermomixer. Das Eppendorff-Cup blieb hierbei geöffnet und wurde mit Parafilm, welcher mit einer Nadel perforiert worden war, abgedeckt.

## 2.2.4 Immunpräzipitation von Proteinen aus Thrombozyten-Lysaten (Syk, FAK, PLC $\gamma$ 2)

Die Thrombozytensuspension (0,6 ml; 800000 Zellen/ $\mu\text{l}$ ) in der Aggregationsküvette wurde vor oder nach Stimulation mit 0,6 ml 2x eiskaltem Lysis-Puffer A versetzt und für 30 min auf Eis lysiert.

Lysis-Puffer A 2x:

2% Triton X-100, 2 mM EGTA, 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4  
 vor Gebrauch frisch zugeben: Proteasehemmercocktail "Complete Mini EDTA-free" (Boehringer Mannheim, #1836153, 1 Tbl. in 5 ml), 2 mM PMSF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

Die folgenden Schritte wurden entweder im Kühlraum durchgeführt oder die Proben auf Eis gelagert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation bei 13.000xg für 10 min bei 4°C von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand (1,2 ml) wurde mit den entsprechenden an Agarose gekoppelten Antikörper-Konjugaten bei 4°C für 2 h oder 12 h inkubiert. Alternativ erfolgte bei einigen Experimenten eine Inkubation mit dem Antikörper für 1 h bei 4°C, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit CL4B Protein A-Sepharose (2,5 mg = 50  $\mu\text{l}$ ) bei 4°C. Bei letzterer Methode wurde ein Preclear-Schritt mit Kaninchen IgG (1  $\mu\text{g}$ ) und CL4B Protein A-Sepharose vorgeschaltet.

Verwendete Antikörpermengen für die Immunpräzipitation:

\*) : an Agarose gekoppeltes Antikörper-Konjugat

Syk-IP		FAK-IP	PLC $\gamma$ -2-IP
1.	2. *)	*)	
15 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$

Die Immunpräzipitate wurden durch Zentrifugation bei 13.000xg für 10 min bei 4°C abgetrennt. Dann erfolgten 3 Waschschrte mit 1 ml kalten 1x Lysis-Puffer A, 1 x Waschen

mit kaltem 10 mM HEPES, 500 mM NaCl (pH 8,0) und 1 x Waschen mit kaltem 10 mM HEPES (pH 8,0). Schließlich wurden die Immunpräzipitate für 3 min bei 95°C in 100 µl 2x Laemmli-Puffer gekocht, bevor die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und über Western Blot nachgewiesen wurden.

Ein zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführter Vergleich verschiedener Lysis-Puffer für die Syk-Immunpräzipitation zeigte sehr gute Resultate bei der Verwendung des Lysis-Puffers C, der für die Pull-down Assays eingesetzt wurde (s. 2.2.6), wobei das Detergens NP-40 gegen Triton X-100 ausgetauscht wurde.

### **2.2.5 Isolierung des Thrombozyten-Aktinzytoskeletts**

Die Zytoskelettfractionen wurden nach einer Modifikation der Methode von (Jennings et al., 1981) präpariert. Thrombozytensuspensionen (0,6 ml) wurden vor oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation durch Zugabe gleicher Volumina eiskaltem 2x Triton Lysis-Puffer B (pH 7,5) lysiert.

#### Triton Lysis-Puffer B 2x (pH 7,5):

100 mM Tris-HCl, 2% Triton X-100, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 20 µg/ml Leupeptin, 2 mM PMSF, 25 µM Pepstatin A und 20 µg/ml Aprotinin.
---

Die Proben (1,2 ml) werden für 30 min auf Eis gestellt und anschließend bei 15.600xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden einmal mit Triton X-100 (1%) Lysis-Puffer B gewaschen und in 100 µl Gelelektrophorese-Auftragspuffer resuspendiert.

### **2.2.6 Pull-down Assay aus Thrombozytenlysaten mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk**

Ein GST-Fusionsprotein, welches die Tandem-SH2-Domäne von Syk (Geschenk von Dr. S.P. Watson, Institute of Pharmacology, Oxford) enthielt, wurde hierfür an Glutathione Sepharose<sup>®</sup>4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gebunden. Die Thrombozyten-Suspension (0,35 ml) wurde mit gleicher Menge Lysis-Puffer C versetzt:

### Lysis-Puffer C (Pull-down Assay) 2x:

2% Nonidet P-40, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5  
vor Gebrauch frisch zugeben: Complete Mini EDTA-free (Boehringer Mannheim, #1836153,  
1 Tbl. in 5 ml), 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 8 mM Pefablock

Zunächst wurde ein Preclear-Schritt mit 5 µg GST-Sepharose für 0,7 ml Thrombozyten-Lysat für 1 h bei 4°C durchgeführt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) wurde der Überstand mit je 10 µg Fusionsprotein versetzt und 2,5 h bei 4°C inkubiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 1x Lysis-Puffer C (+Protease-, Phosphatasehemmer) und 4x mit 1 ml TBS-T gewaschen. Nach den Waschsritten wurde wie in 2.2.4 beschrieben weiterverfahren.

## **2.2.7 Messung der Proteintyrosinphosphorylierung mittels Western Blot**

Das Western Blot-Verfahren verbindet die gelelektrophoretische Analyse mit der Spezifität der immunologischen Reaktion.

### **2.2.7.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen**

#### Puffer:

Elektrodenpuffer: 0,6% (w/v) Tris-Base, 0,1% (w/v) SDS, 2,88% (w/v) Glycerin,  
pH 8,3 – 8,4  
Laemmli-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20% (w/v) SDS, 87% (w/v) Glycerin, 1% (w/v)  
Bromphenolblau

Elektrophoresen wurden in 8 – 12%igen Polyacrylamidgelen (200 mm x 200 mm x 1 mm) bzw. 5 – 20% Gradientengelen durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in einer Gelelektrophoreseapparatur (Protean II xi Cell, Bio-Rad) mit dem von (Laemmli, 1970) beschriebenen diskontinuierlichen Puffersystem. Außerdem wurden auch mit Tricin-Gelen nach Schägger für die Auftrennung niedermolekularer Peptide (1-15 kDa) gearbeitet (Schägger und v. Jagow, 1987). Die Herstellung der Gele (20 x 20 cm) und die Durchführung

der Elektrophoresen (vertikal) erfolgte wie in genannter Literatur beschrieben.

Der Probenpuffer wurde mit Mercaptoethanol oder DTT versetzt, um die Proteine zu reduzieren. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95°C im Thermomixer erhitzt. Zur Ermittlung der Molekülmassen der Proteine wurden käufliche Molekulargewichtsmarker (Full Range Rainbow™ RPN 800, Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, UK) mit auf das Gel aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 10 mA über Nacht unter kontinuierlicher Kühlung, gefolgt von einer einstündigen Fokussierung bei 35 mA.

### **2.2.7.2 Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen**

Anodenpuffer 1:

0,3 M Tris, 10% Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer 2:

25 mM Tris, 10% Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer:

25 mM Tris base, 40 mM 6-Amino-n-Caprionsäure, 10% Methanol, pH 9,4

Der Proteintransfer wurde mit einer Semidry-Blot-Apparatur (LKB 2117 Multiphor II, semidry) mit Graphitelektroden durchgeführt. Für den Transfer wurde folgender Sandwich-Aufbau verwendet:

- 4 Lagen 3 MM Chromatographie-Papier (Munktell-Filterpapier, Pharmacia, Freiburg) in Anodenpuffer 1 equilibriert
- 4 Lagen in Anodenpuffer 2
- Nitrocellulose (Hybond C-Super, Supported Pure Nitrocellulose, 0,45 µm, Amersham)
- Polyacrylamidgel
- 7 Lagen in Kathodenpuffer

Blotbedingungen: 1 mA/cm<sup>2</sup> für 2 h bei RT.

### 2.2.7.3 Immunologischer Nachweis der Proteine

#### 10x TBS-T:

1,5 M NaCl, 0,25% (v/v) Tween 20, 100 mM Tris-Base, pH 7,6

#### Blocklösung:

5% (w/v) Magermilchpulver (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 1x TBS-T

Vor der Antikörpernachweisreaktion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit der Magermilchlösung (40 ml für 12,5 cm x 16 cm Membran) für 1 h bei RT blockiert. Nach mehreren Waschstufen mit TBS-T (2x kurz, 1x 15 min, 2x 5 min) erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurde die Reaktion mit dem entsprechenden 2. Antikörper (anti-mouse Ig (m) bzw. anti-rabbit Ig (r), HRP linked whole antibody, Fa. Amersham) durchgeführt.

#### Verwendete Antikörperkonzentrationen (Verdünnungen):

1. AK	PY20 1:2000	4G10(PY) 1:2000	Syk 1:1000	FAK 1:2000	FcR $\gamma$ -Kette 1:1000	PLC $\gamma$ -2 1:1000
2. AK	1:15000 (m)	1:15000 (m)	1:2500 (r)	1:15000 (m)	1:2500 (r)	1:2500 (r)

Danach wurde nochmals gewaschen und anschließend die Chemilumineszenzreaktion (SuperSignal<sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate Luminol/Enhancer, Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Emittiertes Licht der Wellenlänge 466 nm wurde mit geeigneten Filmen (Hyperfilm<sup>™</sup>ECL<sup>™</sup>, Fa. Amersham) detektiert.

Bei den Anti-Phosphotyrosinimmunoblots von Syk, FAK und PLC $\gamma$ 2 Immunpräzipitaten wurden mittels *stripping* (2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM Mercaptoethanol, Inkubation 10 min bei 50°C) die Anti-Phosphotyrosin-Antikörper von der Membran entfernt. Anschließend wurde der Blot mit spezifischen Antikörpern inkubiert, mit dem Ziel, die Menge der immunpräzipitierten Proteine densitometrisch zu quantifizieren.

#### **2.2.7.4 Proteinfärbung mit Ponceau S**

Mit dem roten Farbstoff Ponceau S (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) können die Proteine nach Transfer auf Nitrocellulose visualisiert werden.

Die Membran wird hierfür für etwa 10 min mit verdünnter Lösung Ponceau S inkubiert. Anschließend wird die Membran mit PBS mehrmals gewaschen, bis das Proteinbandenmuster gut zu erkennen ist. Nach Ergebnisdokumentation über Scannen oder Kopieren kann die Membran nach erneuten PBS-Waschschritten mit der Magermilchlösung behandelt werden (2.2.7.3).

#### **2.2.8 Densitometrische Auswertung des Western Blots**

Die quantitative Auswertung der Schwärzung der Banden auf dem Film erfolgte densitometrisch mit der Software GelScan<sup>TM</sup>XL von Pharmacia LKB Biotechnology (Scanner SHARP JX-325, Pharmacia Biotech). Gemessen wurde die Absorption der spezifischen gesamten Bande in Bezug auf einen Hintergrund-Parameter. Die Absorption pro Flächeneinheit wurde nach Integration in Absorptionseinheiten x mm<sup>2</sup> angegeben.

#### **2.2.9 Transiente Transfektion von CHO-Zellen**

Diese Untersuchungen wurden von mir in der Arbeitsgruppe von Dr. S.J. Shattil (Department of Vascular Biology, Scripps Research Institute, La Jolla, USA) durchgeführt. Die mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin stabil transfizierten CHO-Zellen wurden auf eine 100 mm Petrischale aufgebracht, so daß sie am Tag der Transfektion mit dem Syk-Plasmid zu 40-60% konfluent waren. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gewaschen, um fötales Rinderserum aus dem Kulturmedium zu entfernen. Die Syk-Plasmid-DNA wurde via Maxi-prep (Qiagen, Santa Clarita, CA) gereinigt. Eine Gesamtmenge von 4  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde zu 200  $\mu$ l DMEM gegeben und mit 20  $\mu$ l Lipofectamin-Lösung für 15 min in Polystyrene-Röhrchen inkubiert. Lipofectin<sup>TM</sup> (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD,

USA), ein kationisches Lipid, geht spontan Wechselwirkungen mit der rekombinierten DNA ein und bildet einen Lipid-DNA-Komplex. Hierdurch wird die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht. Anschließend wurde die Mischung mit 3,8 ml DMEM verdünnt und die Zellen wurden damit überschichtet.

Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> erfolgte ein Mediumswechsel zu DMEM mit 10% FCS, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (komplettes Wachstumsmedium). Einen Tag später wurde noch einmal frisches komplettes Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben, bevor diese dann wiederum einen Tag später für das jeweilige Experiment eingesetzt wurden.

### **2.2.10 Untersuchungen mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie an ausgebreiteten humanen und Mäuse-Thrombozyten, und CHO-Zellen**

Die Immunfluoreszenz dient dazu, die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle zu untersuchen. Spezifische Antikörper gegen das zu untersuchende Protein (Antigen) werden durch die Bindung an Zweit-Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, sichtbar gemacht. Das Antigen in der Probe muß hierbei in eine unlösliche Form gebracht werden. Dazu dient eine chemische Vernetzung von Proteinen oder eine Präzipitation durch organische Lösungsmittel. Die Permeabilisierung mit Hilfe von Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln macht ein Eindringen der Antikörper in die Probe möglich. Die meisten Filter für die Immunfluoreszenz sind auf die Standardfluorophore Fluorescein und Rhodamin abgestimmt.

#### Physikalische Daten der Fluorophore

Fluorophor	Fluorescein	Rhodamin
Excitation	495 nm	552 nm
Emission	525 nm	570 nm
Farbe	grün	rot

#### Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Glasobjektträger und Deckgläschen
- PBS:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

- Fibrinogen (Sigma) bzw. Polylysin (Sigma)
  
- Coating Puffer:

NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,0

- Rinderserumalbumin (BSA)
- 3,7% Formaldehyd/PBS (methanol-freies Formaldehyd, Polysciences)
- 0,2% Triton X-100/PBS
- 10% steriles Normal-Goat-Serum/PBS
- Primärantikörper, Rhodamin-Phalloidin (zur Anfärbung)
- Fluorescein (FITC)- bzw. Rhodamin (TRITC)-konjugierte Zweitantikörper (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) (Alexa Dyes, Molecular Probes)
- Mounting Medium (Immuno-Fluore Mounting Medium, ICN Biochemicals)
- Konfokales Laserfluoreszenzmikroskop Leika DM IRB, Leika software TCSNT version 1.5.451

### Methode

1. Coverslips mit Seife für 5 min waschen, anschließend 5 Waschschritte (5x) mit H<sub>2</sub>O.
2. Coverslips mit 20 µg/ml Fibrinogen (bzw. Polylysin) in Coating-Puffer bedecken und für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubieren.
3. 1x mit PBS waschen.
4. Mit 20 mg/ml BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) blocken.
5. 2x mit 2 ml PBS waschen.
6. 500 µl Probe auf die Fibrinogen-gecoateten Deckgläser geben (Thrombozyten: 2 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml; CHO-Zellen: 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) und für 60 min bei 37°C inkubieren. Für Thrombozyten wurde alternativ auch *spreading* auf Polylysin-gecoateten Coverslips durchgeführt.
7. 2x mit PBS waschen und mit 3,7 % Formaldehyd/PBS, 10 min, RT fixieren.
8. 2x mit PBS waschen. (Bei diesem Schritt kann das Experiment unterbrochen werden; PBS dazugeben und bei 4°C lagern.)
9. Fixierte Zellen mit 0,2% Triton X-100/PBS für 5 min, RT, permeabilisieren. 2x mit

- PBS waschen.
10. Unspezifische Bindungsstellen mit 10% sterilem Normal-Goat-Serum/PBS für 30 min bei RT blockieren.
  11. Primärantikörper mit Blocklösung verdünnen (1:100) und vor Gebrauch bei 14000 rpm für 10 min zentrifugieren. Die Coverslips werden 45 min bei 37°C auf 100 µl Antikörperlösung, die auf Parafilm vorgelegt werden, inkubiert. Für die Aktinfärbung wird Rhodamin-Phalloidin in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt.
  12. 5x für 2 min in PBS waschen.
  13. Sekundärantikörper in Blocklösung verdünnen (1:200). Bei 37°C für 45 min inkubieren. 5x waschen.
  14. Deckgläser 1x mit H<sub>2</sub>O waschen.
  15. Einen kleinen Tropfen Mounting Medium (Immuno Fluore Mounting Medium, ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) auf einen sauberen Glasobjektträger geben und vorsichtig die Deckgläschen auf das Medium geben. Die Ränder werden mit Nagellack versiegelt.
  16. Im Dunkeln bei 4°C lagern.
  17. Die Proben werden mit konfokaler Laserimmunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Verwendet werden: Leika diaphan Fluoreszenzmikroskop, Biorad MRC 1024 Scanning Confocal Laser Microscop Software.

Als Kontrolle für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde das entsprechende Immunglobulin anstelle des spezifischen Primärantikörpers eingesetzt.

Um die Proteintyrosinphosphorylierung während des *spreading* zu untersuchen, wurden Parallelansätze von ausgebreiteten Thrombozyten (600 µl) mit 100 µl kochendem Laemmli-Puffer bedeckt, mit einem Scraber vom Coverslip gelöst und via Western Blot die Proteintyrosinphosphorylierung gemessen. Hierfür wurden 8-Wellplatten (12,5 cm x 7,5 cm) und große Coverslips (3,5 cm x 3 cm) eingesetzt.

### 2.2.11 Untersuchungen an knock-out Mäusen

Die Arbeiten mit Wildtyp und knock-out Mäusen erfolgten zum größten Teil in der Arbeitsgruppe von Dr. S.P. Watson am Institute of Pharmacology in Oxford/UK. Die BALB/c Mäuse wurden nach einer Bestrahlung mit den entsprechenden defizienten fötalen Leberzellen rekonstituiert. Als Kontrolle dienten BALB/c Wildtyp-Mäuse.

### 2.2.12 Yeast Two-Hybrid System

Das Yeast Two-Hybrid System wurde von Fields et al. entwickelt. Es handelt sich um eine hefegenetische Methode, die es ermöglicht, Protein-Proteininteraktionen *in vivo* nachzuweisen (Fields et al., 1989). Als Maß hierfür wird die Transkription eines Reportergens genutzt. Das verwendete System enthält den eukaryotischen Transkriptionsfaktor GAL4, der in der Hefe den Galaktose-Metabolismus reguliert. Viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren, so auch GAL4, bestehen aus zwei physikalisch getrennten modularen Domänen: aus einer DNA-bindenden Domäne und einer die Transkription aktivierenden Domäne.

Die Transkription geeigneter Reportergene (*LacZ*, *HIS3*) ermöglicht den Nachweis der Interaktion zwischen den zwei Proteinen. Über den  $\beta$ -Galaktosidase Assay mit X-Gal als Substrat wurde die aktivierbare Transkription des *LacZ* Gens gemessen. Das zweite Reportergen *HIS3* ermöglicht eine gezielte Selektion positiver Klone.

Das Yeast Two-Hybrid System wurde verwendet, um Interaktionspartner des Proteins Syk zu identifizieren. Hierfür wurde der Hefestamm *S.c.* Y190 zunächst mit dem *bait*-Vektor pAS2-1/Syk transformiert und in einem zweiten Schritt mit der jeweiligen cDNA-Bank (250 $\mu$ g) cotransformiert. In dem verwendeten Yeast Two-Hybrid System kann das *bait*-Plasmid die *TRP*-Deletion, das *prey*-Plasmid die *LEU*-Deletion von Y190 ersetzen. Die transformierten Zellen wurden auf Drop-out Medium plattiert, welchem Leucin und Tryptophan fehlte (*LEU TRP*<sup>-</sup>), um somit beide Plasmide positiv zu selektionieren. Mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidasetests wurden die Kolonien auf eine two-hybrid Interaktion überprüft. Bei einer positiven Interaktion, die zur Aktivierung des *HIS3* Reportergens führt, wachsen die Zellen dann auch auf dem 3-fach Drop-out Medium (*LEU TRP HIS*<sup>-</sup>).

### **Klonierung der Plasmide:**

Syk/DNA-BD Hybride: Die Syk-DNA wurde aus dem PAcG2T Baculovirus Transfer Vektor (Geschenk Dr. S.P. Watson, Oxford) isoliert und mit dem *bait*-Vektor pAS2-1 ligiert (Syk full-length). Desweiteren wurde eine Kinase-inaktive Mutante (Geschenk Dr. S.J. Shattil, La Jolla) in den *bait*-Vektor pAS2-1 eingefügt (Syk kinase dead).

Im folgenden werden die grundlegenden Arbeitsmethoden mit E.coli erklärt (ausführliche Protokolle hierzu s. Clontech Handbuch):

### **Bakterienanzucht**

#### LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,2, eingestellt mit NaOH.
---

#### LB-Agar:

LB-Medium mit 1,25% (w/v) Bacto-Agar
--------------------------------------

Für transformierte E.coli-Zellen DH5 $\alpha$  wurde dem Medium 150  $\mu$ l/ml Ampicillin (Hoechst) zugesetzt.

Alle E.coli-Stämme wurden bei 37°C in Vollmedium vermehrt. Aufbewahrt wurden sämtliche Bakterienstämme in LB-Medium mit 20% (v/v) Glycerin bei -80°C oder bei 4°C auf LB-Agar-Platten.

### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Glycerinkultur der jeweiligen Klone wurde aus -80°C kurz angetaut und eine kleine Menge davon mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Nach einer Trocknungszeit von 5 - 10 min bei Raumtemperatur wurde die Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 1 - 3 ml LB-Medium mit einer von der Agar-Platte gepickten Einzelkolonie angeimpft und die E.coli-Zellen anschließend 4 - 5 h bei 37°C und 200 rpm vermehrt. Aliquots aus diesen E.coli-Kulturen wurden danach zum Beimpfen von 10 ml bzw. 50 ml Übernacht-Kulturen verwendet.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Plasmid-DNA dienten die Übernacht-Kulturen. Die Isolierung und Reinigung von supercoiled Plasmid-DNA aus E.coli Zellen wurde mit Hilfe der Plasmid-Isolierungskits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Herstellung des Zellysats basiert auf einer optimierten alkalischen Lyse gemäß der Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) und die Reinigung der Plasmid-DNA auf einer Chromatographie in Anionenaustauschersäulen. Im Einzelnen wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA war für alle durchzuführenden Reaktionen ausreichend.

Die hefegenetischen Arbeiten wurden wie folgt durchgeführt:

### **Lithiumacetat-Transformation von Hefe**

nach (Schiestl et al., 1993)

### **Nachweis des in Hefe exprimierten Proteins**

Um die Proteinexpression in der Hefe zu kontrollieren, wurden Proteinextrakte hergestellt (Puffer und Vorgehensweise s. Clontech Handbuch), diese über SDS-PAGE getrennt und über einen Westernblot die Expression des rekombinanten Proteins überprüft.

### **Überprüfen der *HIS*<sup>+</sup>, *β-GAL*<sup>+</sup> Kolonien**

(ausführliches Protokoll s. Clontech Handbuch)

Die im Blau/Weiß-Screening gefundenen positiven Kolonien müssen auf ihre Echtheit überprüft werden.

Hierzu wird die DNA aus der Hefe isoliert (Hoffman und Winston, 1987) und der E.coli Stamm HB101 transformiert. Nach dem Ausplattieren werden von den erhaltenen Kolonien so viele wie möglich auf ihre Interaktion nach erneuter Plasmidisolation und Transformation in den Hefestamm Y190/pAS2-1/Syk full-length getestet. Entsprechende Positiv- und Negativkontrollen wurden angefertigt.

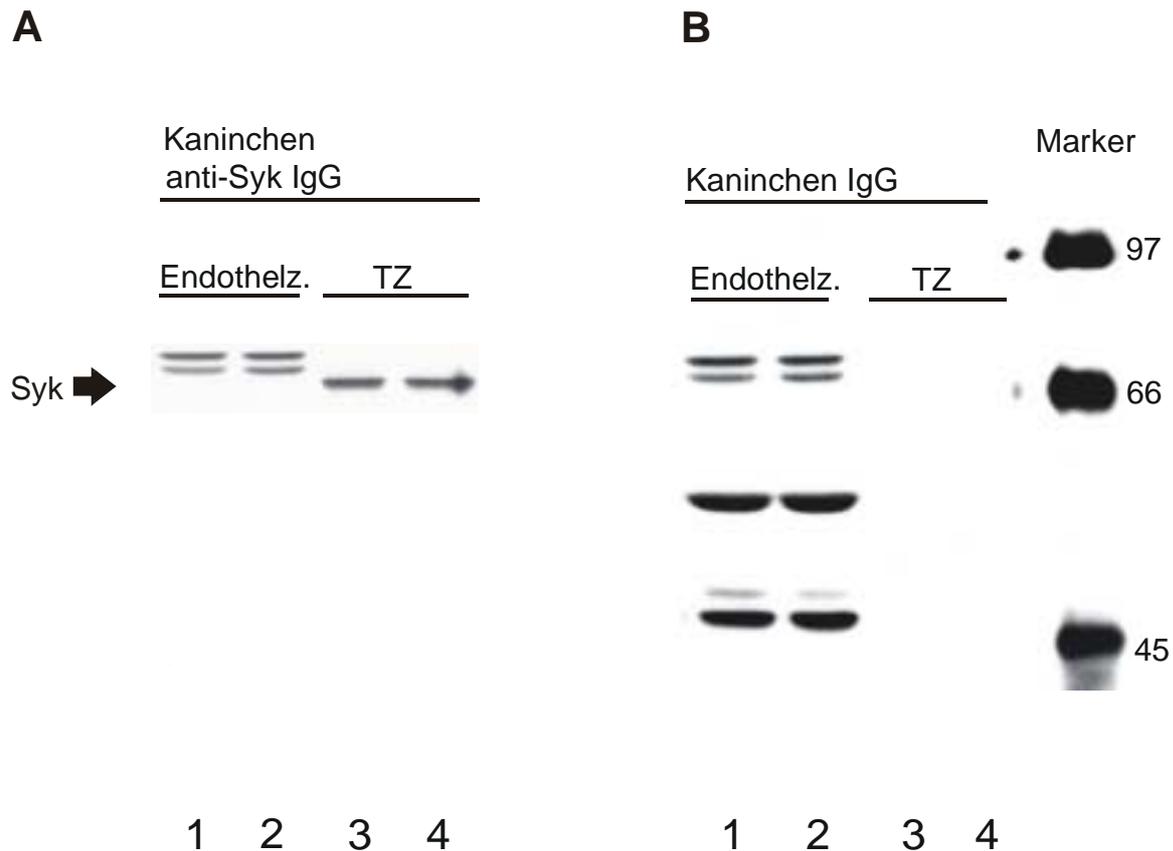
## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Methodik**

Es wurden einige Vorversuche zur Prüfung der Spezifität des eingesetzten polyklonalen Antikörpers und zur Optimierung der Immunpräzipitation von Syk in Thrombozyten durchgeführt. Für die Isolierung der Thrombozyten waren mehrmalige Wasch- und Zentrifugationsschritte notwendig. Um die Bildung und Wirkung von Thromboxan A2 und ADP während der Thrombozytenpräparation zu unterbinden, wurde das PRP mit Aspirin inkubiert. Der Wasch- und Resuspensionspuffer enthielt Apyrase, welches ADP inaktiviert.

#### **3.1.1. Expression von Syk in Thrombozyten, aber nicht in Endothelzellen**

Um das Protein Syk spezifisch in einem Lysat und damit Gemisch verschiedenster Proteine nachzuweisen, wurde die Methode des Western Blots eingesetzt. Hierbei wurden die Proteine in einem ersten Schritt via SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und schließlich das gesuchte Protein im Immunoblot spezifisch nachgewiesen. Im nachfolgend beschriebenen Experiment wurden Lysate von Thrombozyten und Endothelzellen untersucht. Für das Immunostaining wurde ein polyklonaler anti-Syk Antikörper verwendet. Die Blots (s. Abb. 3) zeigten in den Thrombozytenlysaten eine klare Bande in der Höhe von 72 kDa, welche das Protein Syk repräsentiert. In den Endothelzellysaten war eine Doppelbande in der Höhe von etwa 75 kDa zu beobachten. Der Kontrollblot mit Kaninchen IgG zeigte jedoch in den Endothelzellen außer weiteren unspezifischen Banden die gleiche Doppelbande; in Thrombozyten waren keine unspezifischen Banden erkennbar. Syk ist somit spezifisch in humanen Thrombozyten exprimiert, nicht jedoch in humanen Endothelzellen.



**Abb. 3: Expression von Syk in Thrombozyten, aber nicht in Endothelzellen**

Es wurden konfluente Endothelzellen- (Spuren 1, 2;  $2,5 \times 10^6$  Endothelzellen = 1 mg Protein) und Thrombozytensuspensionen (Spuren 3, 4;  $5 \times 10^8$  Thrombozyten = 1 mg Protein) im Verhältnis 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer lysiert (jeweils Doppelwerte aus dem gleichen Versuchsansatz). Nach Auftrennung über SDS-Gelelektrophorese und Übertragen der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde ein anti-Syk Blot (A) (polyklonales Kaninchen anti-Syk IgG, Verdünnung 1:2500) durchgeführt. Nach *stripping* der Membran zur Entfernung gebundener Antikörper wurde die Membran mit der gleichen Konzentration an unspezifischem Kaninchen IgG (B) (40 ng/ml) inkubiert, um die Spezifität des Syk-Immunoblots zu prüfen.

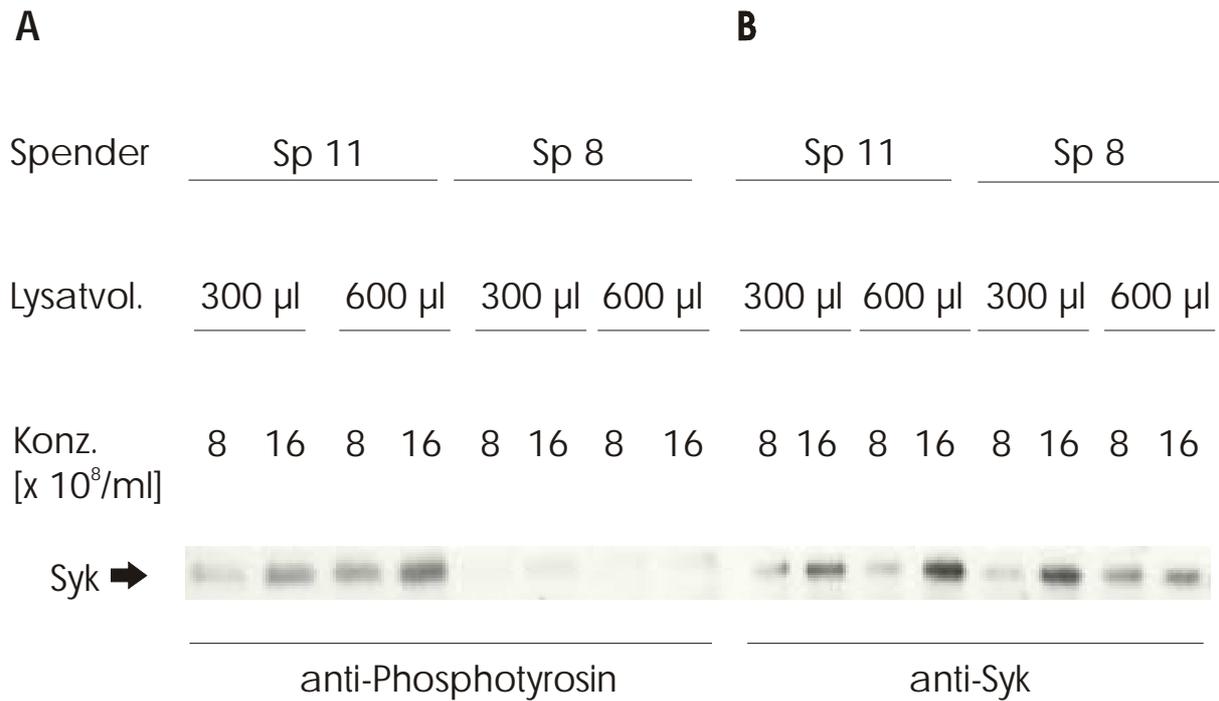
**3.1.2 Messung der Syk-Tyrosinphosphorylierung nach Immunpräzipitation**

Das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen und der durch sie erfolgende Transfer von Phosphatgruppen spielt eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion. Da nur ein kleiner Prozentsatz der Proteine bei der Aktivierung tyrosinphosphoryliert wird, bedient man

sich der Immunpräzipitation als Methode zur Anreicherung des erwünschten Proteins.

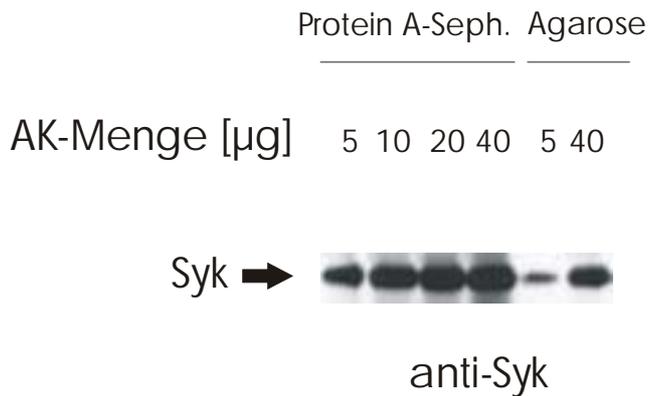
Die folgenden Abbildungen 4 bis 6 zeigen die Resultate von Optimierungsversuchen verschiedener Parameter zum Nachweis von tyrosinphosphoryliertem Syk. Es wurden die Einflüsse von Spender, verwendetem Lysatvolumen, Thrombozytenkonzentration, Antikörpermenge und Protein A-Sepharose Menge untersucht. In Abb. 4 war auffallend, daß der Anteil an tyrosinphosphoryliertem Syk von Spender 8 sehr viel niedriger war als der von Spender 11 bei etwa gleicher Menge an immunpräzipitiertem Syk. Während daher im Fall Spender 11 eine Lysatmenge von 300 µl und eine Thrombozytenkonzentration von  $8 \times 10^8$  / ml ausreichen würde, müßte bei Spender 8 viel mehr Zellmaterial eingesetzt werden, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Eine weitere Variationsmöglichkeit besteht in der Verwendung von Protein A-Sepharose oder Agarose als Kopplungspartner für den Syk-Antikörper sowie in der Antikörpermenge. Bei letzterer wurde zwischen 5 und 40 µg pro 0,6 ml Lysatvolumen variiert. Unter Verwendung von Protein A-Sepharose gekoppeltem Syk-Antikörper im Vergleich zu an Agarose gekoppelten Syk-Antikörper konnte eine etwa 2 - 3-fach höhere Syk-Immunpräzipitation festgestellt werden (Abb. 5). Ähnliche Unterschiede waren im anti-Phosphotyrosin Blot der entsprechenden Syk-Immunpräzipitate zu beobachten. Im Gegensatz zur Protein A-Sepharose ist der kommerzielle Syk-Antikörper kovalent an die Agarose gebunden. Innerhalb einer Optimierungsreihe wurde gefunden, daß bei Verwendung des an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörpers die Antikörpermenge von 10 µg für ein gut verwertbares Signal ausreichte. Desweiteren ergab sich, daß ein Lysatvolumen von 0,6 ml, eine Antikörpermenge von 10 µg und 2,5 µg Protein A-Sepharose die besten Ergebnisse erbrachte. Bereits ein Lysatvolumen von 0,3 ml und eine Antikörpermenge von 5 µg lieferten verwertbare Resultate (Abb. 6).

Bei der Auswertung der Syk-Tyrosinphosphorylierung wurde stets die immunpräzipitierte Syk-Menge mitgemessen und es wurde der Quotient Syk-PY/Syk von jeder Probe gebildet, um Schwankungen der immunpräzipitierten Menge an Syk zu berücksichtigen. Die Menge von immunpräzipitiertem Syk lag in einem Bereich von 15 - 60 % der Gesamtmenge von Syk in Thrombozyten.



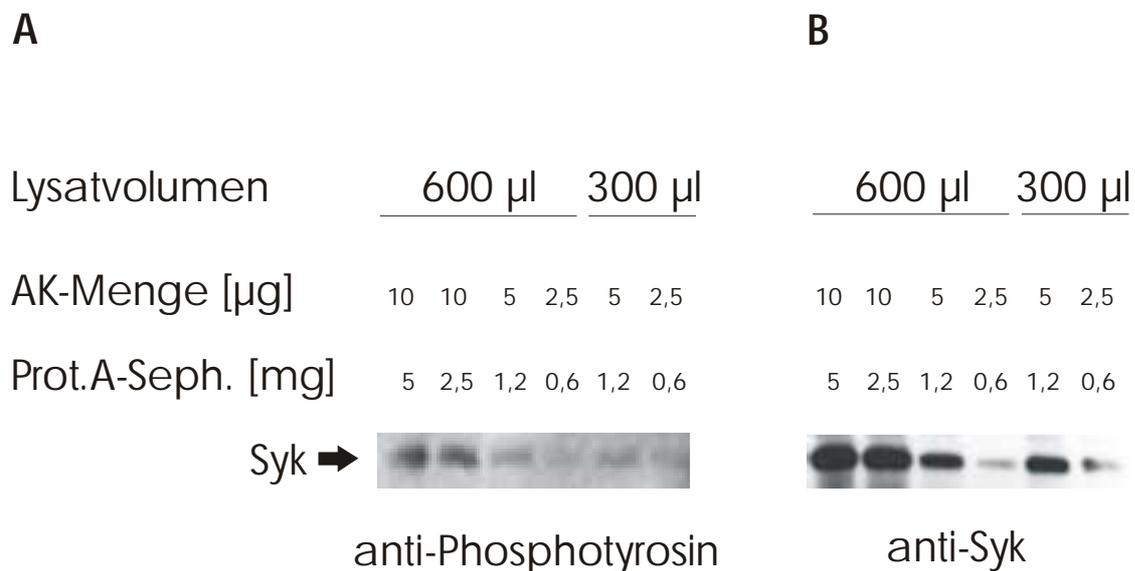
**Abb. 4: Vergleich der Quantität von immunpräzipitiertem Syk und der Stärke der Syk-Tyrosinphosphorylierung in Abhängigkeit von Blutspender, Thrombozytenkonzentration und Lysatmenge**

Von zwei Spendern (Sp 11 und Sp 8) wurden Thrombozytensuspensionen der angegebenen Thrombozytenkonzentration präpariert und Syk wurde mit einem spezifischen an Agarose gekoppelten anti-Syk Kaninchen IgG immunpräzipitiert. Von 75 % der Syk-Immunpräzipitate wurde ein Anti-Phosphotyrosin-Blot (A), von den übrigen 25 % ein anti-Syk Blot (B) angefertigt.



**Abb. 5: Optimierung der Syk-Immünpräzipitation durch Variation der Antikörpermenge bzw. Vergleich von Protein A-Sepharose und Agarose gekoppeltem Antikörper**

Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten wurden mit 2x Lysis-Puffer A lysiert. Entweder wurde Syk mit anti-Syk IgG gekoppelter Agarose oder mit anti-Syk IgG und anschließender Zugabe von Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Es wurden Antikörperkonzentrationen zwischen 5  $\mu\text{g}$  und 40  $\mu\text{g}$  eingesetzt. Von den Syk-Immünpräzipitaten wurde ein anti-Syk Blot angefertigt.



**Abb. 6: Optimierung der Syk-Immünpräzipitation durch Variation des Lysat-Volumens, der Antikörpermenge und der Protein A-Sepharose Menge**

Durch Variation von Lysatmenge, Menge an Syk-Antikörper und Menge an Protein A-Sepharose wurde die optimale Kombination für eine hohe Proteinausbeute bei möglichst geringem Materialverbrauch ermittelt. (A) zeigt den Anti-Phosphotyrosin-Blot, (B) den anti-Syk Blot.

### 3.1.3 Expression von Syk bei verschiedenen Probanden

Die Expression von Syk wurde in humanen Thrombozyten sowohl bei verschiedenen Probanden als auch bei den gleichen Probanden an verschiedenen Tagen gemessen, um eventuelle inter- und intraindividuelle Schwankungen zu ermitteln. Es waren deutliche interindividuelle und z.T. auch intraindividuelle Variationen der Expression von Syk zu beobachten. In Tab. 1 sind die Resultate eines Vergleichs von 11 Blutspendern aufgelistet, wobei die Testperson Sp 1 an 3 Tagen (a, b, c) untersucht wurde. Bei Testperson 1 am Versuchstag a wurden die höchsten Werte ermittelt, welche 100% gesetzt wurden und auf welche sämtliche andere Werte bezogen wurden. Spender 7 liegt mit einem Durchschnittswert von 31% des Maximums am niedrigsten in der Höhe der Syk-Expression. Die Ergebnisse für die 3 Testtage von Spender 1 liegen zwischen 43% und 100%.

Zusammenfassend kann die Schwankung der Methode als gering bezeichnet werden, was aus dem Mittelwert +/- Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen, die bei vielen Spendern durchgeführt wurden, zu erkennen ist. Es bestehen jedoch interindividuelle Variationen der Syk-Expression und auch intraindividuelle Schwankungen der Syk-Expression (s. Spender 1).

**Tab. 1: Vergleich der Syk-Expression in Thrombozyten von verschiedenen Probanden**

Spender	Syk-Expression in Thrombozyten [%]
Sp 1a	100
Sp 1b	44,7 ± 16,2; n = 3
Sp 1c	43,0 ± 10,6; n = 3
Sp 2	88 / 76
Sp 3	55
Sp 4	77,7 ± 7,8; n = 3
Sp 5	60 / 56
Sp 6	48 / 54
Sp 7	22 / 40
Sp 8	43,7 ± 9,5; n = 3
Sp 9	39,7 ± 4,0; n = 3
Sp 10	46 / 60
Sp 11	57 / 43

Von verschiedenen Probanden (Sp 1-11) wurden Thrombozytenlysate (von  $4 \times 10^7$  Zellen) über Gelelektrophorese aufgetrennt, und in einem Syk-Immunoblot wurde die Expression von Syk gemessen. Die Ergebnisse sind Doppelwerte bzw. Mittelwerte ± SD von Mehrfachbestimmungen eines Versuchs bezogen auf einen internen Standard (Proband 1 am Versuchstag a = 1a = 100 %). Von Proband 1 liegen außerdem Ergebnisse von 2 weiteren Versuchstagen vor, welche mit den Nummern 1b und 1c bezeichnet wurden.

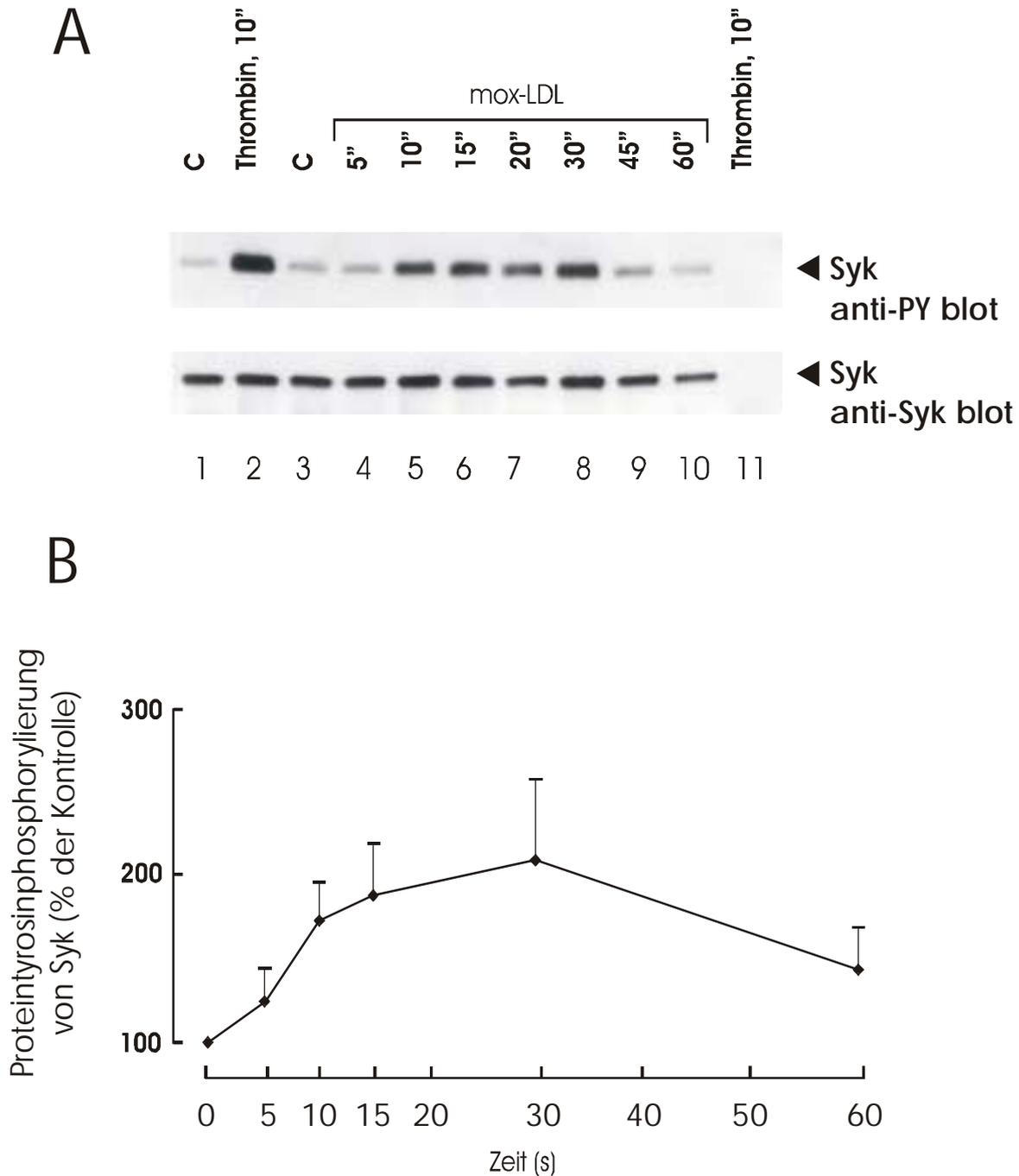
## 3.2 Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change*

### 3.2.1 Aktivierung nach Stimulation des Thrombin-Rezeptors PAR-1 und nach mox-LDL (milde oxidiertes LDL)

YFLLRNP, ein Heptapeptid, ist ein partieller Thrombinrezeptoragonist, der in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  einen *shape change* induziert, aber zu keiner detektierbaren Sekretion von ATP aus dichten Granula führt (Rasmussen et al., 1993). Als weiterer Agonist wurde mox-LDL untersucht, das in Aspirin-vorbehandelten Thrombozyten nur einen Formwandel, aber keine ATP-Sekretion oder Aggregation induziert (Weidtmann, 1996; Baumann-Siemons, 2000). Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß mox-LDL Lysophosphatidsäure enthält, welche für den Thrombozytenformwandel induziert durch mox-LDL verantwortlich ist, und diesen über die Aktivierung von LPA-Rezeptoren induziert (Siess et al., 1999). Um die Bildung von Mikroaggregaten zu verhindern, wurden die Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten mit RGDS (2 mM) für 2 min vorbehandelt.

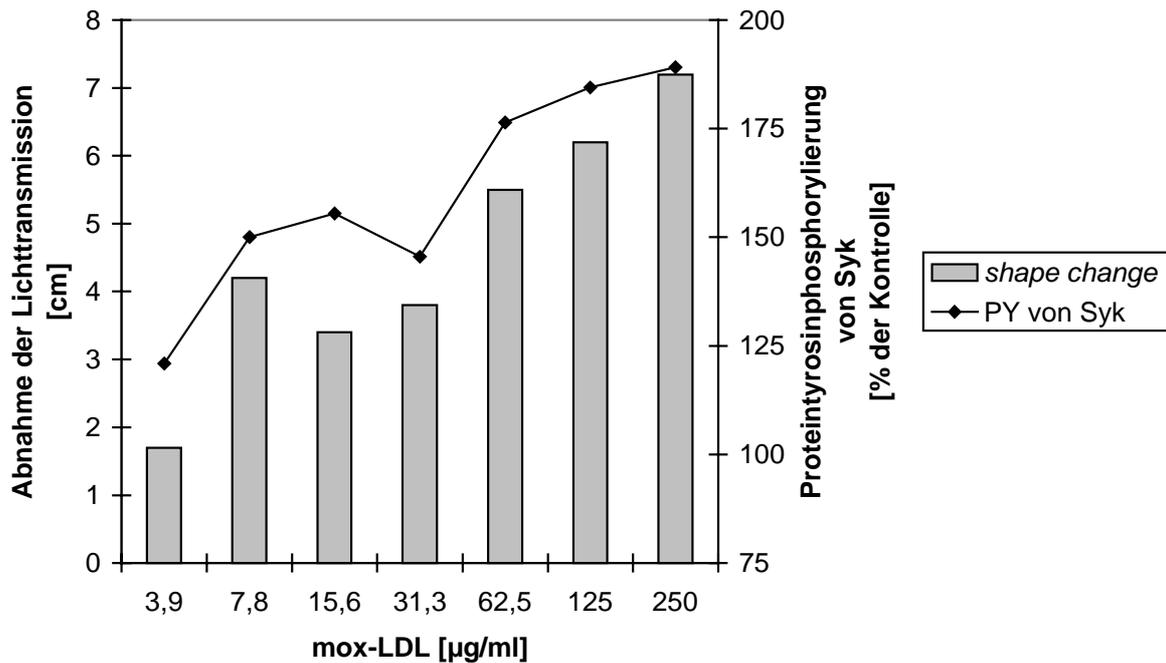
Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten, daß der *shape change* durch geringe Konzentrationen von mox-LDL von nur 10-15  $\mu\text{g/ml}$  induziert werden konnte. Es wurde gefunden, daß die Zugabe von YFLLRNP oder mox-LDL die Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change* stimulierte (Abb. 7A, B). Die Tyrosinphosphorylierung von Syk nahm nach YFLLRNP (300  $\mu\text{M}$ , 30 s) um das  $5,4 \pm 1,7$ -fache (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 8$ ,  $P < 0,0001$ ) und nach mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) um das  $2,5 \pm 1,0$ -fache (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 21$ ,  $P < 0,0001$ ) zu. Die relativ hohe Standardabweichung ist auf inter- und intraindividuelle Schwankungen zurückzuführen (s. 3.1.3) sowie in geringem Maß auch auf Abweichungen, die methodischen Ursprungs sind (s. 3.1.2).

In Kinetiken der Syk-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 7A, B) wurde gefunden, daß die Stimulierung der Tyrosinphosphorylierung 10 s nach Zugabe von mox-LDL zu beobachten war. Die maximalen Werte (2-3-fach) wurden 15-30 s nach Zugabe von mox-LDL (s. Abb. 7B) erreicht und nahmen dann wieder ab. Nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL zeigten der *shape change* und der Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von Syk ähnliche Dosiswirkungskurven (s. Abb. 8). Diese Korrelation könnte darauf hinweisen, daß die Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinkinase Syk für den *shape change* wichtig ist.



**Abb. 7: Kinetik der Tyrosinphosphorylierung nach mox-LDL (0,5 mg/ml)**

- (A) Western Blot von Syk-Immünpräzipitaten aus Thrombozyten. Die Tyrosinphosphorylierung von Syk wurde während des *shape change* zu verschiedenen Zeiten durch mox-LDL (0,5 mg/ml) induziert. Außerdem wurden Thrombozyten mit Thrombin (1 U/ml) aggregiert. Thrombozytenlysate wurden mit spezifischen Syk-Antikörpern (Spalten 1-10) oder mit Kaninchen IgG (Spalte 11) inkubiert.
- (B) Grafische Darstellung der Ergebnisse der Stimulation der Syk-Tyrosinphosphorylierung durch mox-LDL. Die Anti-Phosphotyrosinblots der Syk-Immünpräzipitate wurden densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis ist repräsentativ für 6 Experimente mit Thrombozyten von verschiedenen Spendern (Mittelwert $\pm$ SE).



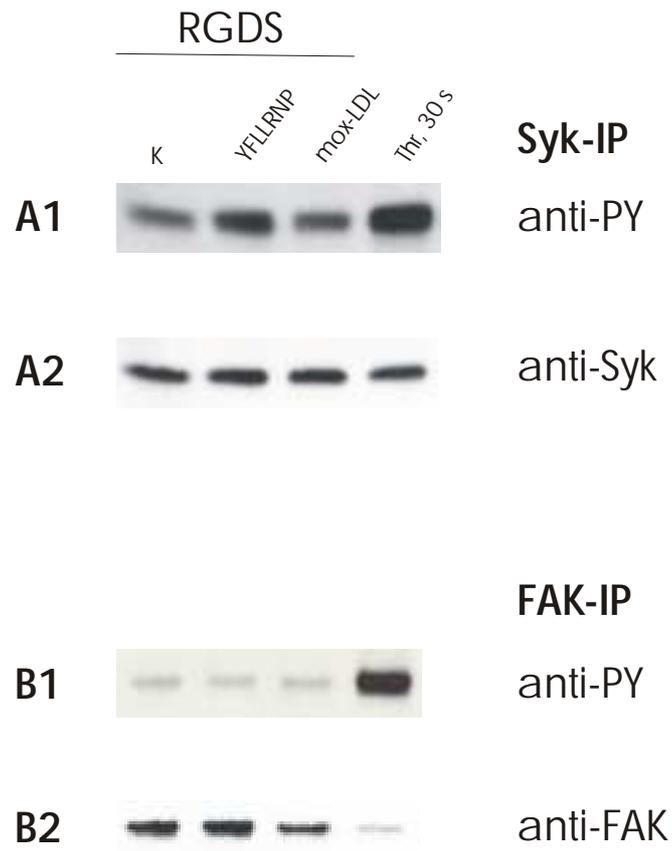
**Abb. 8: Dosis-Wirkungsbeziehung für *shape change* und Tyrosinphosphorylierung (PY) von Syk nach Stimulation mit mox-LDL**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten wurden mit mox-LDL im Konzentrationsbereich von 8 bis 250 µg/ml für 30 s in einem Aggregometer stimuliert. Mittels Messung der Abnahme der Lichttransmission wurde der *shape change* bestimmt. In der gleichen Probe wurde die Tyrosinphosphorylierung von Syk 30 s nach mox-LDL Stimulation gemessen. Der Versuch ist repräsentativ für zwei weitere Experimente.

Außer der Tyrosinkinase Syk wurde auch der Grad der Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinkinase FAK während des *shape change* untersucht.

Die Resultate (Abb. 9) zeigen, daß die fokale Adhäsionskinase FAK keine Veränderung der Tyrosinphosphorylierung während des entweder durch YFLLRNP oder mox-LDL induzierten *shape change* aufweist. Die Aggregation der Plättchen nach Zugabe von Thrombin (1 U/ml, 30 s) geht dagegen einher mit einer sehr ausgeprägten Tyrosinphosphorylierung von FAK. Die geringe Menge an immunpräzipitiertem FAK nach Thrombinaktivierung läßt sich durch die Bildung von Thrombozyten-Aggregaten erklären, welche offensichtlich nur einen Teil von FAK für die anschließende Immunpräzipitation zugänglich macht.

Im Gegensatz zu der Tyrosinkinase Syk ist FAK somit in der frühen Phase der Thrombozytenaktivierung, i.e. während des *shape change*, induziert entweder durch YFLLRNP oder mox-LDL nicht involviert.



**Abb. 9: Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinkinase Syk, aber nicht der fokalen Adhäsionskinase FAK während des *shape change***

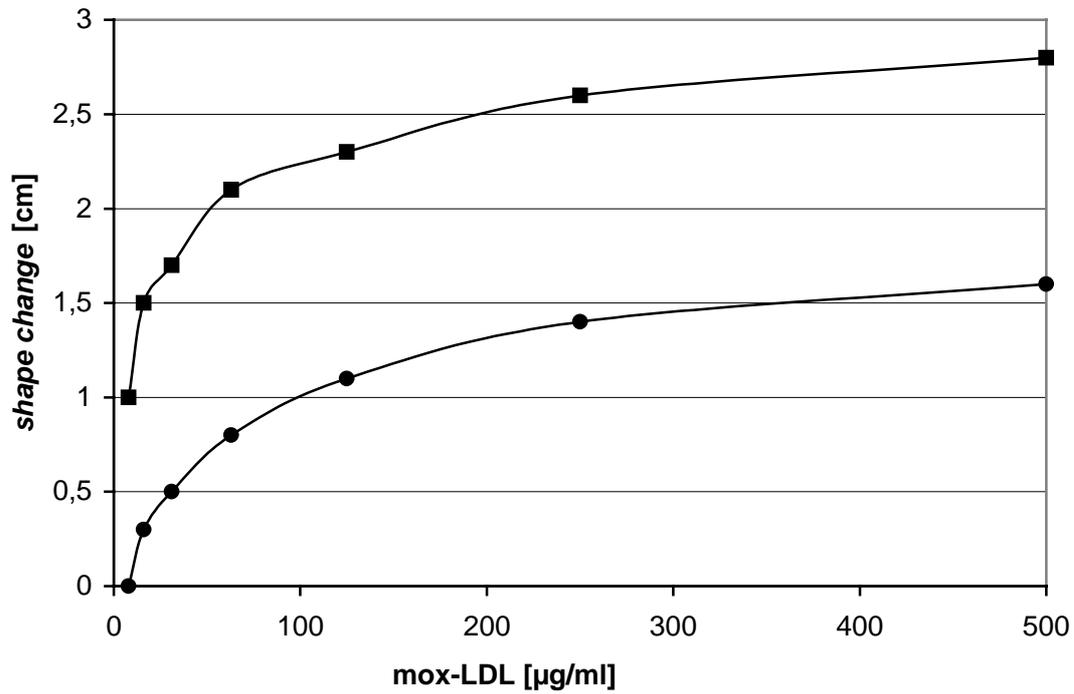
Suspensionen gewaschener Thrombozyten wurden mit YFLLRNP (300  $\mu$ M) oder mox-LDL (0,5 mg/ml) zur Auslösung des *shape change* für 30 s stimuliert, oder mit Thrombin (1 U/ml) für 30 s aggregiert. Die Zugabe von RGDS (2 mM, 3 min) zu den durch YFLLRNP oder mox-LDL stimulierten Proben verhinderte die mögliche Bildung von Mikroaggregaten. Die Tyrosinkinasen Syk (A) und FAK (B) wurden aus Thrombozytenlysaten immunpräzipitiert (IP) und mittels Immunoblot die Tyrosinphosphorylierung gemessen.

## 3.2.2 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unabhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change*

### 3.2.2.1 Thrombasthenia Glanzmann

Bei Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann ist die Expression des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Thrombozyten stark reduziert. Untersuchungen an Thrombozyten dieser Patienten wurden durchgeführt, (a) um zu bestätigen, daß Syk während des *shape change* unabhängig von dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aktiviert wird, und (b) um herauszufinden, ob bei der initialen Thrombozytenaktivierung durch mox-LDL das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine Rolle spielt. Frühere Untersuchungen wiesen darauf hin, daß natives LDL an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Koller et al., 1989, Hackeng et al., 1999) bindet. Es wurde daher die Frage untersucht, ob das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bei der Thrombozyten-Aktivierung durch mox-LDL beteiligt ist. Es wurden drei Patienten (A,B,C) mit Thrombasthenia Glanzmann untersucht.

Es wurde zunächst in Dosis-Wirkungskurven (Abb. 10) die Aktivierbarkeit (*shape change*) von thrombasthenischen Plättchen mit der von Kontrollplättchen nach mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) verglichen. Die  $EC_{50}$  betrug bei den Kontrollplättchen 0,063 mg/ml, während sie bei Plättchen des thrombasthenischen Patienten A bei 0,015 mg/ml lag. Letztere reagierten somit sogar sensitiver auf mox-LDL, was jedoch auch vom Blutspender abhängen kann. Desweiteren wurde bei allen drei Patienten A, B und C die Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68, P130 und von Syk (keine Syk-IP bei Patient A, da Aktivierung zu schwach) nach mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) mit der von Kontroll-Thrombozyten verglichen (Abb. 11, Daten Patient B). Bei allen Patienten war ein ähnliches Protein-Tyrosinphosphorylierungsmuster während des *shape change* zu finden, was darauf schließen läßt, daß das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bei der initialen Thrombozytenaktivierung durch mox-LDL nicht beteiligt ist. Weiterhin wurde die Tyrosinphosphorylierung von Syk in thrombasthenischen Plättchen (Patient B) nach Aktivierung mit YFLLRNP (300  $\mu$ m, 20 s) gemessen (Abb. 11). Auch hier war das Phosphorylierungsmuster vergleichbar mit dem der Kontrollplättchen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change* unabhängig vom Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  abläuft. Weiterhin ist das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  für den Gestaltwandel in der frühen Phase der Thrombozytenaktivierung nicht erforderlich.



**Abb. 10: Dosis-Wirkungskurven für den *shape change* eines Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann und von Kontrollplättchen nach Stimulation mit mox-LDL**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten eines Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann (Patient A, ■) und von Kontrollplättchen (●) wurden mit mox-LDL für 30 s stimuliert. Der *shape change* wurde über die Änderung der Lichttransmission im Aggregometer gemessen.

Kontroll-  
Thrombozyten

Thrombasthenische  
Thrombozyten



**Abb. 11: Vergleichbare Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 und Syk in Thrombozyten eines Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann und von Kontrollplättchen während des *shape change* induziert durch YFLLRNP und mox-LDL**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten eines Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann (Patient B) und eines gesunden Blutspenders wurden in Aggregometerküvetten nicht stimuliert (Kontrolle) oder mit YFLLRNP (300  $\mu$ M, 20 s) und mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) ein *shape change* induziert, der in beiden Proben maximal war. Die Tyrosinphosphorylierung (Anti-PY) von P62, P68 und P130 in Thrombozyten ist im oberen Blot, die von Syk im unteren Blot dargestellt (Syk-IP, Syk-Immünpräzipitate).

### 3.2.2.2 RGDS

Das Tetrapeptid RGDS verhindert die Bindung von Fibrinogen, Fibronectin und vWF an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Der *shape change* und die begleitende Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68, P130 und Syk induziert durch YFLLRNP (300  $\mu$ m) oder mox-LDL (0,5 mg/ml) blieb unbeeinflusst von einer RGDS (2 mM, 3 min) Vorbehandlung der Thrombozyten. Dies verdeutlicht weiter die Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -unabhängige Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Syk und der Proteine P62, P68 und P130 während des *shape change* (Resultate nicht gezeigt).

### 3.2.3 Regulation

#### 3.2.3.1 Proteinkinase C

Um den Einfluß der Proteinkinase C auf den *shape change* und die assoziierte Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 der Thrombozyten zu untersuchen, wurden die Thrombozytensuspensionen vor der Stimulation mit mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) bzw. YFLLRNP (300  $\mu$ M, 30 s) mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Ro-31-8220 (0,2  $\mu$ M, 20 min). Unter diesen Bedingungen war die Thrombozyten-Aggregation induziert durch den Phorbolster Phorbol 12,13-dibutyrat (200 nM) komplett gehemmt, was auf eine effektive und komplette Hemmung der Proteinkinase C schließen läßt. Der Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change* nach Stimulation mit YFLLRNP betrug  $240 \pm 14,1\%$ , nach mox-LDL  $244 \pm 197,8\%$  (n = 3), bezogen auf die Kontrolle vorinkubiert mit Ro-31-8220. Im Vergleich dazu die Werte ohne Vorinkubation mit Ro-31-8220 s. 3.2.1. Da durch den Inhibitor Ro-31-8220 keine Hemmeffekte auftraten, läßt dies auf eine Unabhängigkeit des Syk-Tyrosinphosphorylierung von der Proteinkinase C schließen.

### 3.2.3.2 Calcium

Es wurde der Einfluß der Regulation von Syk durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht. BAPTA-AM cheliiert zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ , wobei die kombinierte Behandlung von BAPTA-AM (20  $\mu\text{M}$ , 20 min) und EGTA (2 mM, 1 min) das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  in ruhenden Thrombozyten erniedrigt (Bauer et al., 1999). Nach dieser Vorbehandlung der Thrombozyten war der *shape change* nach mox-LDL und YFLLRNP verzögert und reduziert. Die BAPTA-AM und EGTA-Behandlung erniedrigte die basale Tyrosinphosphorylierung von Syk um  $64,8\% \pm 10,0$  ( $n = 4$ ). Eine Stimulation mit YFLLRNP (300  $\mu\text{M}$ ) führte zu keiner Erhöhung der Syk-Tyrosinphosphorylierung. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß für die Syk-Tyrosinphosphorylierung in ruhenden Thrombozyten und nach Stimulation mit YFLLRNP die normale zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (80 - 100 nM) erforderlich ist.

Während des *shape change* findet eine starke Neuorganisation des Zytoskeletts statt (Siess, 1989). Ruhende diskoidale Thrombozyten enthalten 3 – 5% tyrosinphosphoryliertes P62, 6 – 9% P68 und 10 – 20% P130 im Aktin-reichen Zytoskelett. Während des *shape change* induziert durch mox-LDL, steigt der Gehalt an tyrosinphosphoryliertem P62, P68 und P130 auf das 2,9-fache, 7,2-fache und 2,4-fache an (Tab. 2). Ein möglicher Mechanismus für die erhöhte Tyrosinphosphorylierung der Zytoskelettproteine ist die Translokation von Proteintyrosinkinasen zum Zytoskelett. Es wurde daher die zelluläre Verteilung von mehreren Tyrosinkinasen in ruhenden Thrombozyten und während des *shape change* induziert durch mox-LDL untersucht. Unstimulierte Plättchen enthielten 4 – 7% Fyn, 3 – 6% Src und 0,7 – 1,4% Syk im Zytoskelett. Während des *shape change* induziert durch mox-LDL stieg die Assoziation von Fyn mit dem Zytoskelett stärker (4,8-fach) an als die von Src (1,5-fach) und Syk (3,1-fach). Die Translokation von aktiven Tyrosinkinasen zum Zytoskelett könnte wichtig sein für die Phosphorylierung von spezifischen Zielproteinen im Zytoskelett.

Desweiteren wurde der Effekt der BAPTA-AM/EGTA Inkubation untersucht. Dies hatte kaum einen Effekt auf die Zytoskelettassoziation der Proteintyrosinkinasen Src, Fyn und Syk nach Stimulation mit mox-LDL. Sie führte jedoch zu einer Abnahme der tyrosinphosphorylierten Proteine P62, P68 und P130 im Zytoskelett von nicht-stimulierten Zellen. Die Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL erhöhte jedoch auch in BAPTA-AM/EGTA-vorbehandelten Zellen die Proteintyrosinphosphorylierung in ganzen Zellen (Daten nicht gezeigt) und im Zytoskelett (Tab. 2). Es scheint also, daß eine normale basale Höhe des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  (80 – 100 nM) erforderlich ist für die Tyrosinphosphorylierung

von P62, P68 und P130 in ruhenden Thrombozyten. In mit ox-LDL stimulierten Thrombozyten hingegen oder nach Thrombin-Rezeptoraktivierung ist die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 nicht von einem Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig. Dies ist im Gegensatz zu den Ergebnissen der Syk-Tyrosinphosphorylierung.

**Tab. 2: Assoziation der tyrosinphosphorylierten Proteine P62, P68 und P130 und der Tyrosinkinasen Src, Fyn und Syk mit dem Zytoskelett während des *shape change* induziert durch mox-LDL; Effekt der Chelierung von zytosolischem Ca<sup>2+</sup> durch BAPTA-AM/EGTA-Behandlung**

Gehalt im Zytoskelett (Einheit: Vielfaches der Kontrolle)

	<b>P62</b>	<b>P68</b>	<b>P130</b>
DMSO (Kontrolle)	1	1	1
+ mox-LDL, 20 s	2,8 ± 0,8	7,2 ± 4,2	2,4 ± 0,6
+ mox-LDL, 40 s	2,9 ± 0,9	5,1 ± 3,6	2,3 ± 0,9
BAPTA-AM + EGTA	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,2
+ mox-LDL, 20 s	0,9 ± 0,7	3,4 ± 1,0	1,5 ± 0,8
+ mox-LDL, 40 s	1,7 ± 1,1	4,0 ± 1,8	2,3 ± 0,9

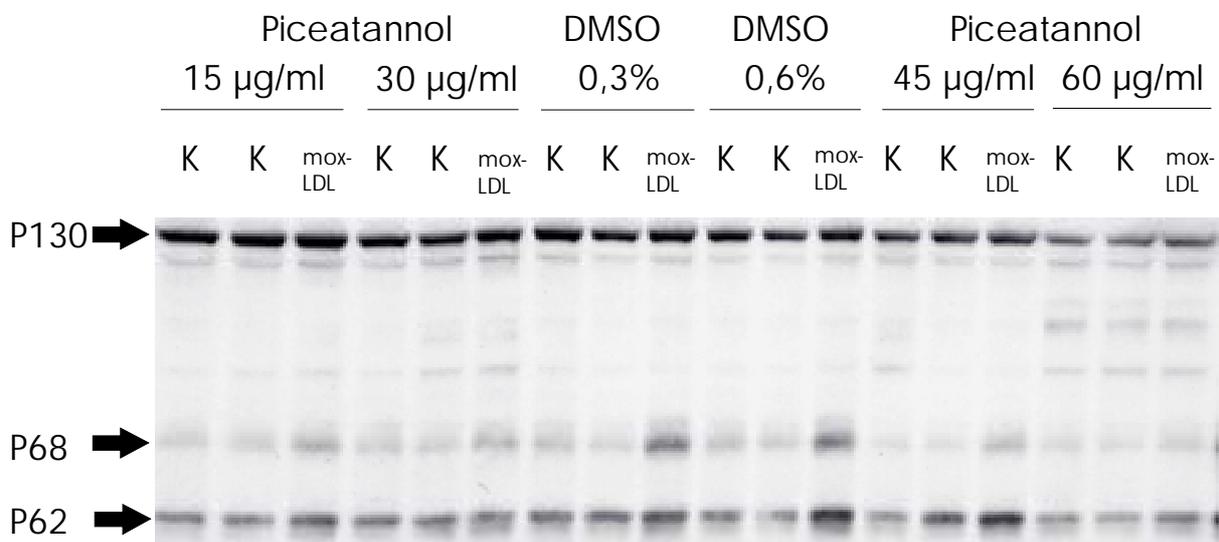
Gehalt der Proteine Src, Fyn und Syk im Zytoskelett (Einheit: Vielfaches der Kontrolle) bzw. Abnahme der Lichttransmission während des *shape change* [cm]

	<b>Src</b>	<b>Fyn</b>	<b>Syk</b>	<b><i>shape change</i></b>
DMSO (Kontrolle)	1	1	1	
+ mox-LDL, 20 s	1,5 ± 0,15	4,8 ± 1,8	2,8 ± 1,2	6,0 ± 0,7
+ mox-LDL, 40 s	1,5 ± 0,16	4,5 ± 2,0	3,1 ± 2,2	6,4 ± 0,3
BAPTA-AM + EGTA	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,5	
+ mox-LDL, 20 s	1,4 ± 0,1	3,6 ± 0,9	2,5 ± 1,2	3,4 ± 1,2
+ mox-LDL, 40 s	1,3 ± 0,1	3,8 ± 1,1	2,5 ± 1,4	5,4 ± 1,4

Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten ( $8 \times 10^5$  Zellen pro  $\mu\text{l}$ ) wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle) für 20 min, oder BAPTA-AM (20 $\mu\text{M}$ ) für 20 min und EGTA (1mM) für 1 min inkubiert, bevor mox-LDL (0,5 mg/ml) für 20 s oder 40 s zugesetzt wurde. Zytoskelettfractionen wurden isoliert und über Immunoblot untersucht. Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD von 6 Experimenten.

### 3.2.3.3 Piceatannol und weitere Proteintyrosinkinase-Hemmer, Iloprost

Desweiteren wurde die Wirkung des in der Literatur als Syk-selektiv beschriebenen Hemmstoffs Piceatannol untersucht (Keely und Parise, 1996). Es wurde gefunden, daß Piceatannol die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 während des *shape change* induziert durch mox-LDL hemmt. Die dosisabhängige Reduktion der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 nach Auftrennung über SDS-PAGE und Western Blot Analyse ist in Abb. 12 dargestellt. Die Reduktion der Tyrosinphosphorylierung erfolgte analog zur Abnahme des *shape change*. Vor allem für P68 ist die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung mit ansteigender Konzentration an Piceatannol ausgeprägt. In parallel dazu durchgeführten Syk-Immünpräzipitations-Experimenten (n = 3) wurde untersucht, ob Piceatannol die Tyrosinphosphorylierung von Syk hemmt. Es wurde jedoch keine Hemmung der Syk-Tyrosinphosphorylierung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die in der Literatur beschriebene Syk-selektive Hemmwirkung von Piceatannol konnte somit nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL nicht gefunden werden.



**Abb. 12: Dosisabhängige Reduktion der Tyrosinphosphorylierung in Thrombozytenlysaten durch Piceatannol**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten wurden mit DMSO (0,3%, bzw. 0,6%) oder ansteigenden Konzentrationen von Piceatannol (15 - 60 µg/ml in DMSO) 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit mox-LDL (0,5 mg/ml, 30 s) stimuliert. Gezeigt ist ein Antiphosphotyrosin-Blot der Thrombozytenlysate (repräsentativ für 3 Experimente).

Desweiteren wurden verschiedene generelle Tyrosinkinase-Hemmer auf ihren Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change* untersucht. Negrescu et al. konnten zeigen, daß die Proteintyrosinkinase-Inhibitoren Genistein und Tyrphostin A23 den YFLLRNP induzierten *shape change* sowie die Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 hemmen (Negrescu et al., 1995). Eine Vorinkubation der gewaschenen Thrombozytensuspension mit Tyrphostin A23 (250 µM, 20 min) hemmte den *shape change* induziert durch YFLLRNP und führte nur zu einer geringen Erhöhung der Syk-Tyrosinphosphorylierung (1,2-fach) im Vergleich zu 4,3-fach in den unbehandelten Proben, insgesamt zu einer Reduktion um 96%. Eine Vorbehandlung der gewaschenen Thrombozyten mit Genistein (150 µM, 3 min) zeigte nach Stimulation mit YFLLRNP eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierung von Syk um  $62,0 \pm 1,9\%$  (n = 3). Die inaktiven Strukturanaloga Daidzein (für Genistein) und Tyrphostin A1 (für Tyrphostin A23) zeigten keinen Effekt auf den *shape change* und die Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 und Syk nach Stimulation mit YFLLRNP.

Das Prostazyklin-Analog Iloprost erhöht den cAMP-Spiegel um das 5 - 7-fache, verhindert den Plättchen *shape change* und inhibierte die durch YFLLRNP induzierte Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 (Negrescu et al., 1995). Gewaschene Thrombozyten wurden mit Iloprost (2 nM, 2 min) vorinkubiert und anschließend mit YFLLRNP bzw. mox-LDL stimuliert. Neben einer Hemmung des *shape change* war auch die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinkinase Syk reduziert, nach YFLLRNP um  $74,7 \pm 17,5\%$  (n = 3) und nach mox-LDL um  $39,3 \pm 26,1\%$  (n = 3). Ohne Zusatz von Iloprost war der Anstieg der Tyrosinphosphorylierung nach YFLLRNP 3,4-fach und nach mox-LDL 2,7-fach.

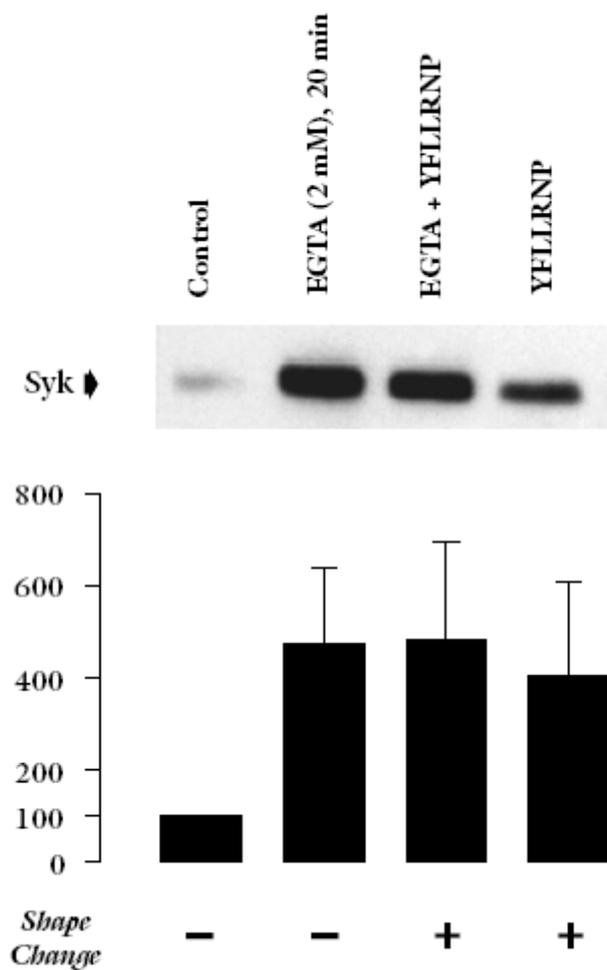
### **3.3 Funktion der Syk-Tyrosinphosphorylierung für den *shape change***

#### **3.3.1 Untersuchungen an mit EGTA vorbehandelten Thrombozyten**

Die Behandlung von Thrombozyten mit EGTA (5 mM, 20 min) führt zur Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68, P130 und zur Syk-Stimulierung, ohne daß die Thrombozyten aktiviert werden (Negrescu und Siess, 1996). Nach EGTA-Vorbehandlung kann ein unveränderter *shape change* durch YFLLRNP bzw. mox-LDL ausgelöst werden (Negrescu und Siess, 1996). In der folgenden Abbildung (Abb. 13) sind die Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung von Syk nach EGTA-Behandlung und einer anschließenden Stimulation durch YFLLRNP zusammengestellt.

Die EGTA-Vorinkubation allein führte zu einer nahezu 5-fachen Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von Syk. Nach einer auf eine EGTA-Vorinkubation folgenden Stimulation mit YFLLRNP wurde ein *shape change* induziert, es war jedoch kein weiterer signifikanter Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 (Daten nicht gezeigt) sowie von Syk festzustellen (Abb. 13).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Syk zwar aktiviert wird, aber funktionell für den *shape change* keine Rolle spielt.



**Protein-Tyrosinphosphorylierung von Syk**  
 [% der Kontrolle]

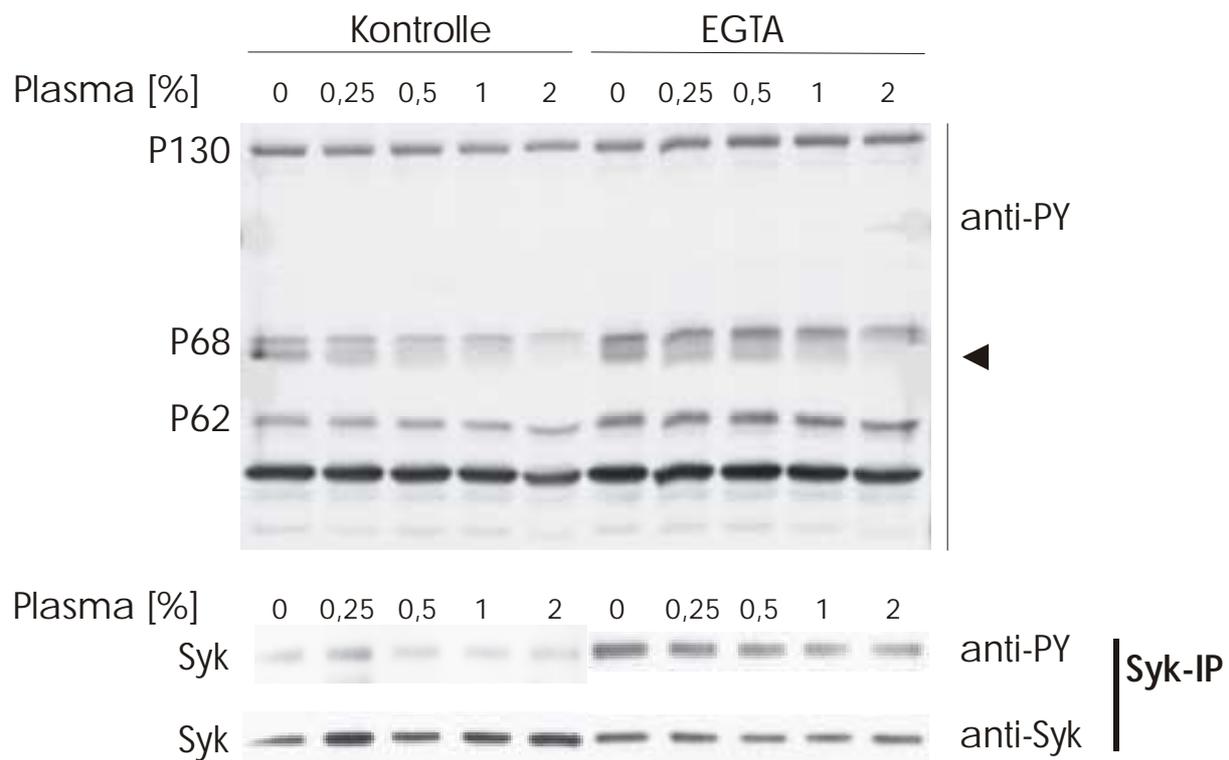
**Abb. 13: Tyrosinphosphorylierung von Syk nach EGTA-Inkubation von Thrombozyten und anschließender Induktion des *shape change* durch YFLLRNP**

Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten wurden mit EGTA (5 mM) für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben nicht aktiviert (Spur 2), oder mit YFLLRNP (300  $\mu$ M) für 30 s (Spur 3) stimuliert. Die Kontrollen ohne EGTA-Behandlung sind in Spur 1 bzw. Spur 4 (mit YFLLRNP-Stimulation) aufgetragen.

Die Tyrosinphosphorylierung von Syk wurde gemessen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Anti-Phosphotyrosin Blot von Syk-Immünpräzipitaten (oben) und die densitometrische Auswertung der Syk-Tyrosinphosphorylierung (unten). Darunter ist beschrieben, ob ein *shape change* ausgelöst wurde oder nicht. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE von 8 unabhängigen Experimenten.

Da die durch EGTA induzierte Tyrosinphosphorylierung von Syk Schwankungen unterlag, die eventuell durch die Gegenwart von Spuren von Plasma in der Suspension gewaschener Thrombozyten verursacht worden sein könnten, wurde die Wirkung von Plasma auf die Tyrosinphosphorylierung von Syk, P62, P68 und P130 untersucht. Es wurde vermutet, daß Plasma eine gewisse Schutzfunktion auf das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  ausübt.

Nach EGTA-Behandlung war zunächst in allen Proben (Plasma 0 - 2%) eine Stimulation von P62, P68 und Syk festzustellen (Abb. 14). Plasma bewirkte vor allem im Konzentrationsbereich von 0,5% - 2% eine Verminderung der Tyrosinphosphorylierung einer Bande unterhalb von P68 (s. Abb. 14 Pfeil) als auch eine leichte Abschwächung der Syk-Tyrosinphosphorylierung nach EGTA-Behandlung. Die Verminderung der Bande unterhalb von P68 ist wahrscheinlich durch eine Interferenz des Western Blots mit Albumin erklärbar. Albumin hat ebenfalls eine Molekülmasse von etwa 68 kD wie P68 und es ist wahrscheinlich, daß Albumin die tyrosinphosphorylierte Bande unterhalb von P68 auf dem Blot überlagert und eine Bindung des Antikörpers stört.



**Abb. 14: Einfluß von Plasma im Thrombozytensuspensionsmedium auf die basale und durch EGTA stimulierte Tyrosinphosphorylierung in Thrombozyten**

Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten wurden in Gegenwart von Plasma (0,25 - 2%) mit oder ohne 5 mM EGTA für 20 min bei 37 °C inkubiert und die Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 bzw. von Syk gemessen.

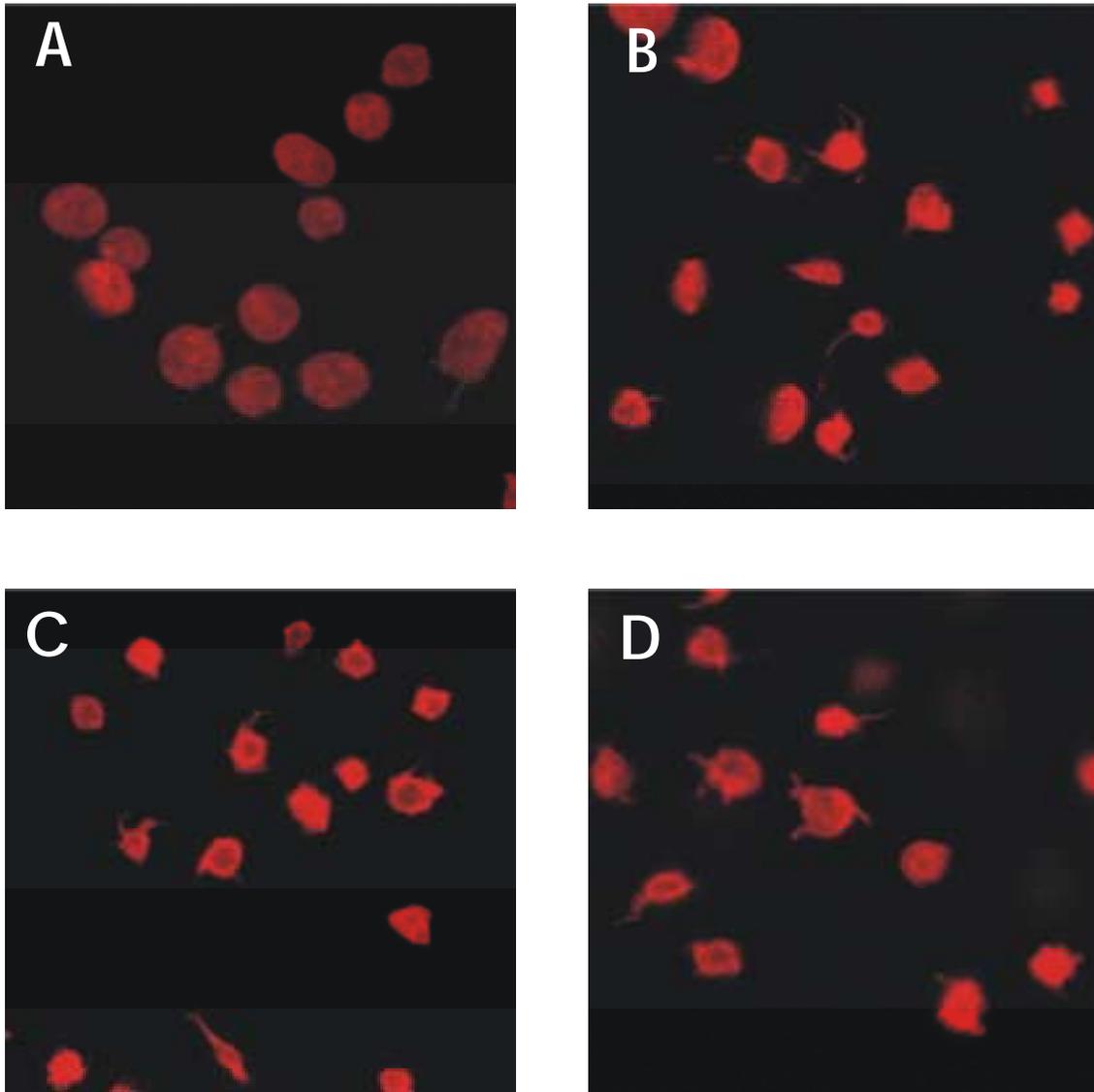
### **3.3.2 Einfluß von allgemeinen und spezifischen Inhibitoren der Src-Kinasen auf Syk-Tyrosinphosphorylierung und *shape change***

Es wurden zwei strukturell nicht verwandte spezifische Inhibitoren von Src-Kinasen PP1 und PD173956 (Hanke et al., 1996) eingesetzt. Mit den selektiven Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 wurden Untersuchungen zur Rolle der Tyrosinkinase Syk für den *shape change* durchgeführt. Wie Bauer et al. fanden, wird der *shape change* induziert durch Thrombinrezeptoraktivierung mit YFLLRNP oder ADP (gemessen im Aggregometer) durch diese Inhibitoren nicht gehemmt (Bauer et al., 2001).

Die folgenden Färbungen von F-Aktin in humanen Thrombozyten (s. Abb. 15) zeigen, daß auch der morphologisch gemessene Formwandel durch die Vorbehandlung der Thrombozyten mit Src-Kinase Inhibitoren unbeeinflußt blieb. Deutlich ist zunächst die Verkleinerung der diskoiden Thrombozyten, die unregelmäßige Oberfläche, einzelne Pseudopodien und die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz nach Stimulation der Thrombozyten mit YFLLRNP, was auf eine Zunahme und Umverteilung von F-Aktin während des Formwandels zurückzuführen ist (vgl. Abb. 15A, B). Diese morphologischen Veränderungen waren durch Vorbehandlung mit PP1 und PD 173956 unbeeinflußt (Abb. 15C, D).

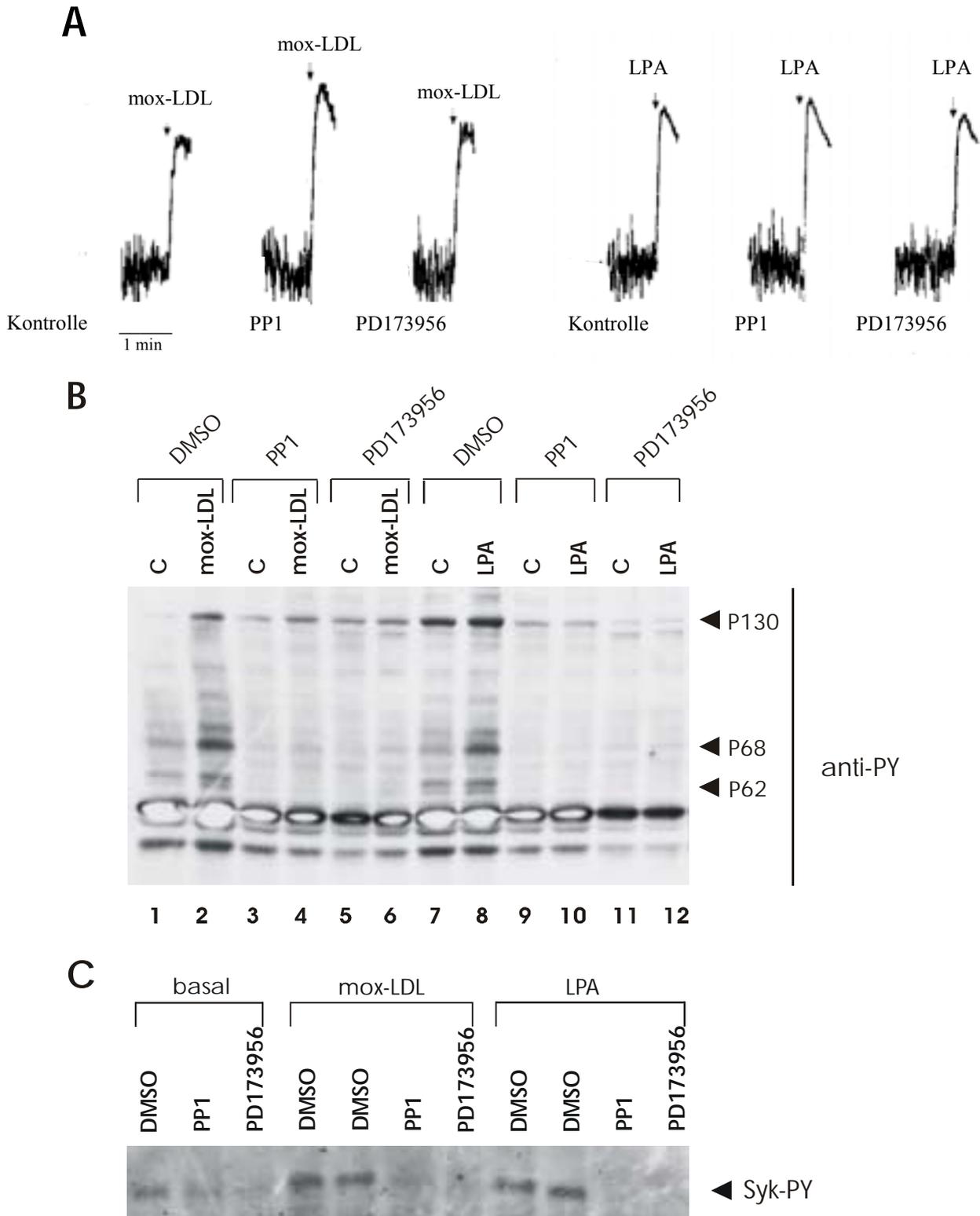
Bei einer Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL bzw. LPA war der *shape change* nach Zusatz der Src-Kinase Inhibitoren nicht gehemmt (Abb. 16A). Es wurde jedoch gefunden, daß die Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 (Abb. 16B) sowie von Syk (Abb. 16C) nach entsprechender Vorinkubation mit PP1 bzw. PD173956 komplett gehemmt war.

Trotz vollständiger Hemmung der Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Syk und der Proteine P62, P68 und P130 durch die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 kommt es zu einer vollständigen Ausbildung des *shape change*, induziert durch YFLLRNP, mox-LDL oder LPA. Syk wird zwar während des *shape change* vermehrt an Tyrosin phosphoryliert, diese Tyrosinphosphorylierung ist jedoch nicht essentiell für die Ausbildung dieser frühen Thrombozytenantwort.



**Abb. 15: Keine Hemmung des YFLLRNP induzierten *shape change* durch die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 in F-Aktin angefarbten Thrombozyten**

Im Aggregometer wurden Suspensionen gewaschener Thrombozyten nicht aktiviert (Bild A) oder nach Vorinkubation mit DMSO (0,25%, 10 min, Bild B) oder den Src-Kinase Inhibitoren PP1 (20  $\mu$ M, 10 min, Bild C) und PD173956 (2,5  $\mu$ M, 10 min, Bild D) vorinkubiert und dann mit YFLLRNP (300  $\mu$ M) für 30 s stimuliert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Fixierung der Proben mit Formaldehyd. Die fixierten Zellen wurden auf Deckgläschen zentrifugiert, mit Rhodamin-Phalloidin für F-Aktin angefarbt und mit dem konfokalen Lasermikroskop ausgewertet (5000-fache Vergrößerung).



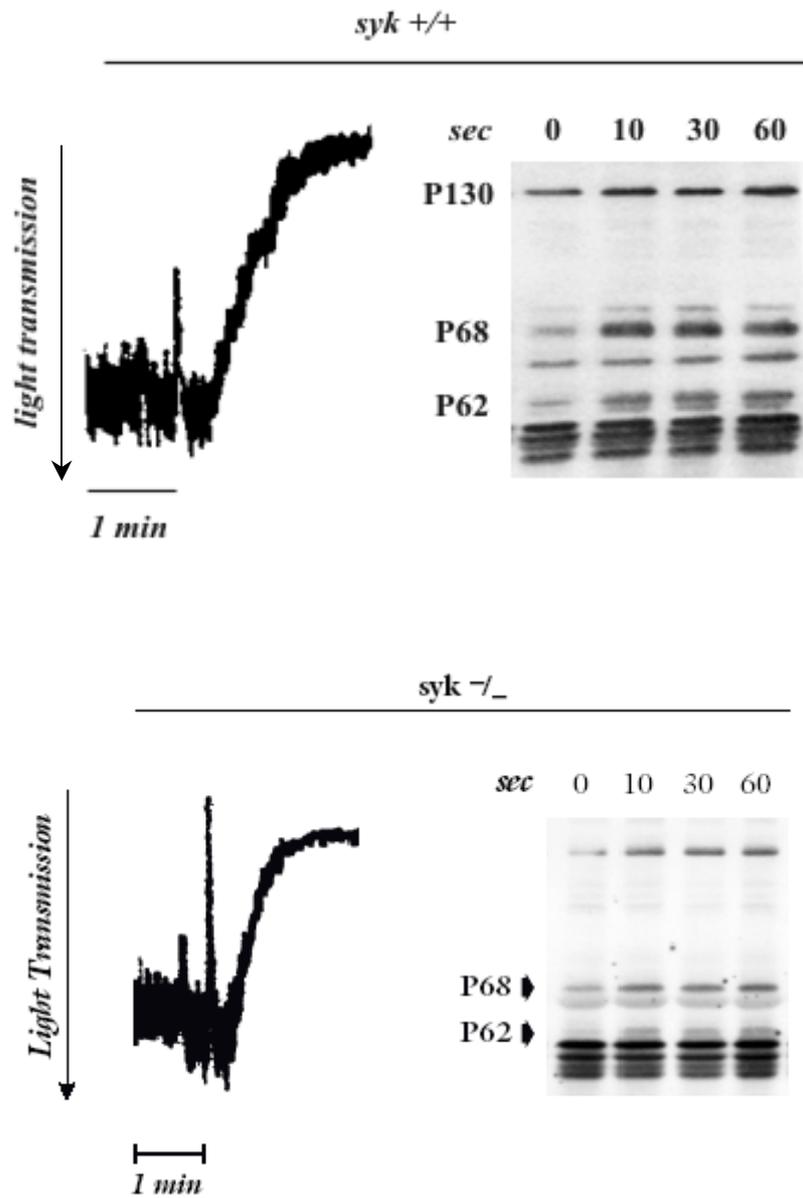
**Abb. 16: Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 sowie Syk, aber nicht des *shape change* durch die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten wurden mit DMSO (0,2%, Lösungsmittelkontrolle), PP1 (20  $\mu$ M, 10 min) bzw. PD173956 (2,5  $\mu$ M, 10 min) vorinkubiert und anschließend mit mox-LDL (100  $\mu$ g/ml) bzw. LPA (80 nM) stimuliert. Der *shape change* wurde im Aggregometer gemessen (A) und die Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 in denselben Proben via Western Blot bestimmt (B). Desweiteren wurde Syk immunpräzipitiert und dessen Tyrosinphosphorylierung gemessen (C).

### 3.3.3 Untersuchungen an Syk(-/-)-Maus-Thrombozyten

Um die funktionelle Rolle von Syk für den *shape change* definitiv aufzuklären, wurden Untersuchungen an Syk-defizienten Maus-Thrombozyten durchgeführt. Es wurde gefunden, daß in Syk-defizienten Maus-Thrombozyten ein normaler *shape change* auslösbar war und die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 vergleichbar war mit den Ergebnissen in Wildtypkontrollen (Abb. 17 und Bauer et al., 2001). Die Stimulation der Thrombozyten erfolgte mit dem Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten U46619 (100 nM).

Die beschriebenen Resultate zeigen, daß Syk zwar aktiviert wird, aber nicht funktionell während des *shape change* involviert ist. Darüberhinaus lassen die Experimente mit den Inhibitoren PP1 und PD173956 den Schluß zu, daß Syk *downstream* von Src-Kinasen aktiviert wird. Weiterhin zeigen Ergebnisse mit den Syk *knock-out* Maus-Thrombozyten, daß die Tyrosinkinase Syk nicht an der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 beteiligt ist.



**Abb. 17: Shape change (links) und assoziierte Proteintyrosinphosphorylierung (rechts) von Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen und Syk(-/-)-Mäusen stimuliert mit 100 nM U46619**  
 Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 weitere Experimente.

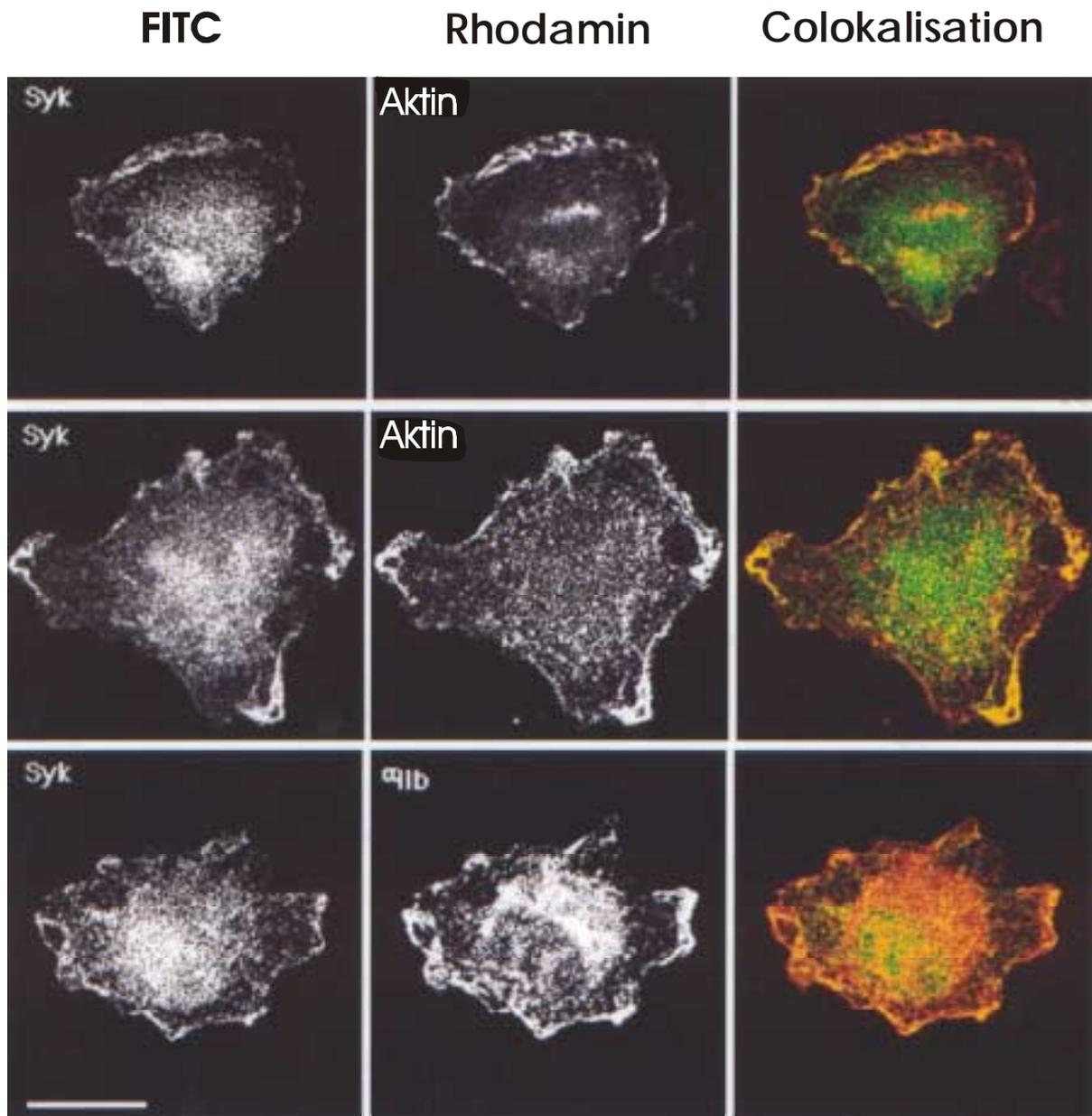
### 3.4 Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ abhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk

#### 3.4.1 Transfizierte CHO-Zellen als Modellsystem für einen ITAM unabhängigen Signalweg der Syk-Aktivierung

CHO-Zellen dienen als Modellsystem, um die Lokalisation der Tyrosinkinase Syk zu verschiedenen Zeiten während der Zellausbreitung zu untersuchen. In diesem Zelltyp konnte ein ITAM unabhängiger Signalweg beschrieben werden (Gao et al., 1997). CHO-Zellen (Zelllinie A5) waren stabil mit dem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  und transient mit der Tyrosinkinase Syk transfiziert. In Abhängigkeit von der Zeit breiteten sich die CHO-Zellen auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläschen nach Inkubation bei 37°C aus. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Lokalisation des Proteins Syk und eventuelle Colokalisationen mit anderen Proteinen zu verschiedenen Zeitpunkten des *spreading* bestimmt.

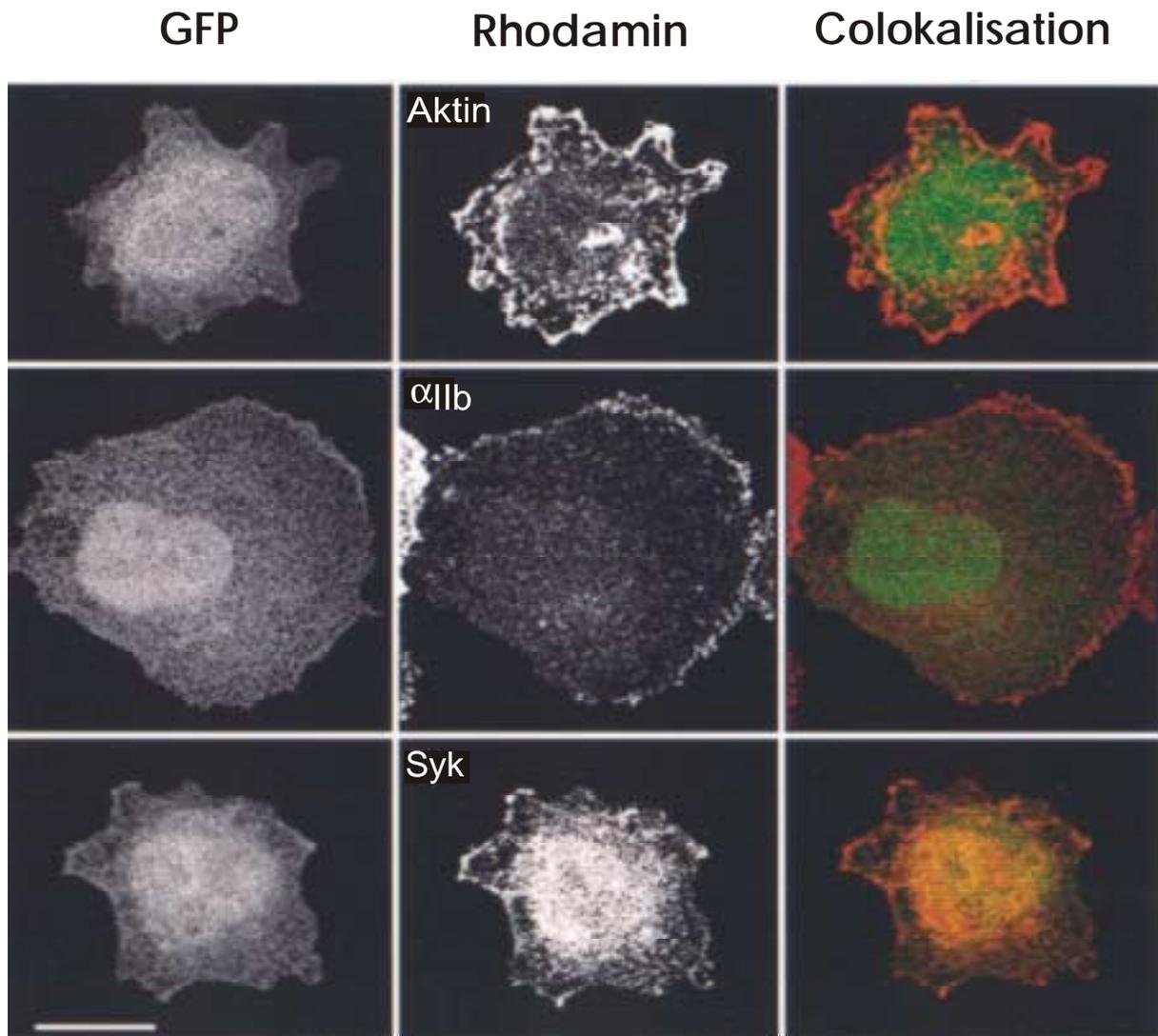
Abb. 18 zeigt die CHO-Zellen in einem frühen Stadium des *spreading*. Nach 15 min konnte Syk im Zytosol, aber vor allem auch an der Zellmembran detektiert werden, wobei es sowohl mit F-Aktin als auch dem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  colokalisierte. Da es an den Randbereichen von Zellen häufig zu Artefakterscheinungen aufgrund der Zellabrundungen kommt, wurde ein Kontrollversuch mit GFP (*green fluorescent protein*) transfizierten Zellen durchgeführt. Wie erwartet war das GFP über das gesamte Zytosol verteilt und das Überlagerungsbild zeigte keine Colokalisation an der Zellmembran (Abb. 19).

Nach vollständiger Ausbreitung der CHO-Zellen (60 min bei 37°C) kommt es zur Ausbildung von Streßfasern (Färbung von F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin) und fokalen Adhäsionsstellen, an denen sich das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  konzentriert (Antikörper gegen das  $\alpha\text{IIb}$ ) (Abb. 20). Das Protein Syk ist wieder über die gesamte Zelle verteilt und es sind keine Colokalisationen mit dem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  mehr zu beobachten. Die Resultate deuten also auf eine frühe Beteiligung der Tyrosinkinase Syk bei der  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelten Zellausbreitung hin, wobei das Protein zunächst an der Zellmembran konzentriert und später wieder diffus über die Zelle verteilt ist.



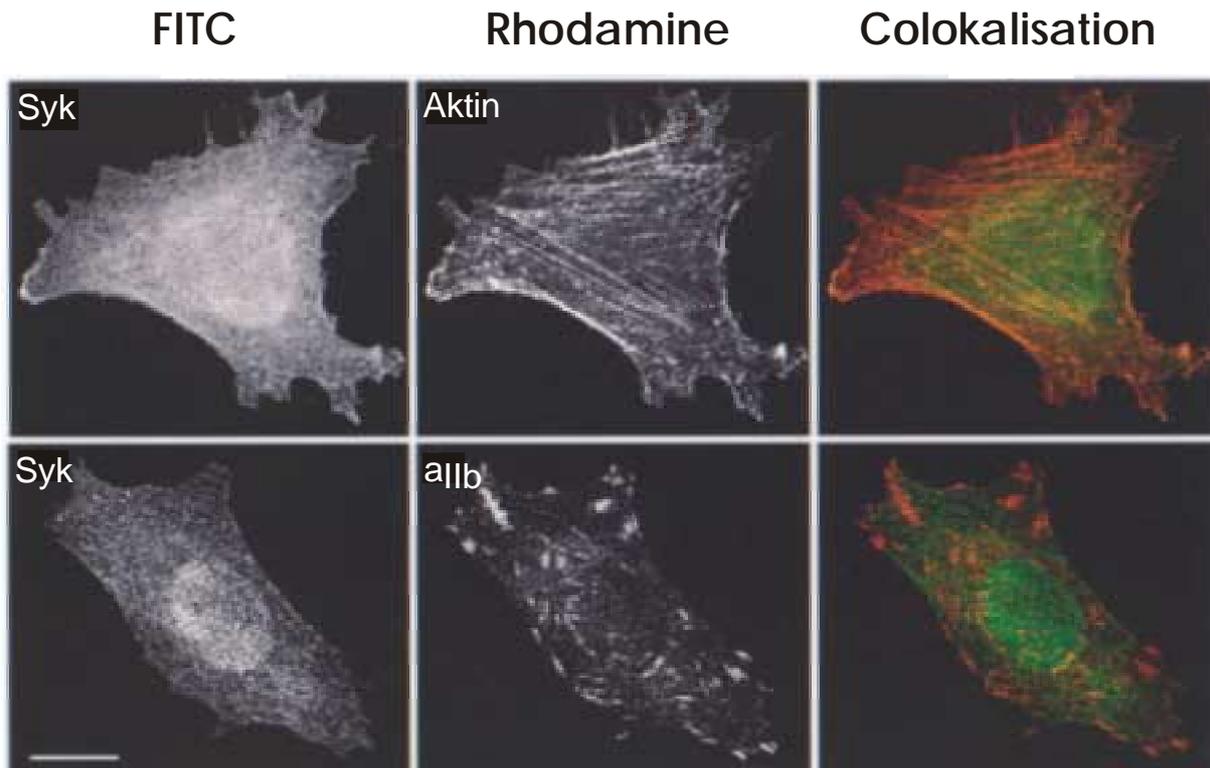
**Abb. 18: Syk colokalisiert mit F-Aktin und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Plasmamembran während des frühen CHO-Zellspreading.**

Stabil mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und transient mit Syk transfizierte CHO-Zellen (Zelllinie A5) wurden auf Fibrinogen-beschichtete Deckgläschen gebracht und für 15 min bei 37 °C inkubiert (frühe Phase des *spreading*). Die Lokalisation von Syk und dem Integrin  $\alpha_{IIb}$  erfolgte über spezifische polyklonale Primärantikörper, wobei die Sekundärantikörper mit dem entsprechenden Fluoreszenz-Farbstoff (FITC oder Rhodamin) markiert waren. Die Detektion von F-Aktin erfolgte durch Anfärbung mit Rhodamin-Phalloidin. Gezeigt sind von oben nach unten 3 verschiedene Zellen, bei denen eine Syk/Aktin bzw. Syk/ $\alpha_{IIb}$  Doppelfärbung durchgeführt wurde. Der Längsbalken entspricht einem 1  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 19: Keine Colokalisation von dem Green Fluorescent Protein (GFP) mit Syk, F-Aktin oder dem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 während der frühen CHO-Zellausbreitung**

Mit Syk oder dem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transfizierte CHO-Zellen wurden mit dem Green Fluorescent Protein cotransfiziert. Die Zellen wurden auf Fibrinogen-beschichteten Coverslips für 15 min bei 37°C ausgebreitet. Syk und das Integrin  $\alpha$ IIb wurden über Rhodamin-gekoppelte Sekundäntikörper und F-Aktin über Rhodamin-Phalloidin nachgewiesen (Längenbalken = 1  $\mu$ m).



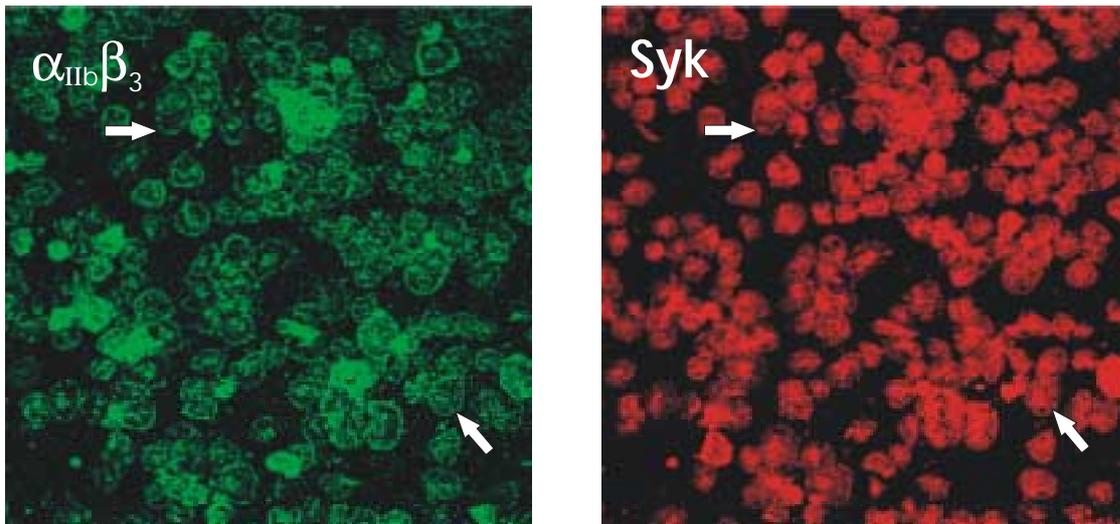
**Abb. 20: Keine Colokalisation von Syk mit Streßfasern und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an fokalen Adhäsionsstellen während des späten CHO-Zellspreading**

Mit Syk und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  transfizierte CHO-Zellen wurden 1h bei 37°C auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläschen ausgebreitet. Syk wurde über FITC-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen, F-Aktin über Rhodamin-Phalloidin und das Integrin  $\alpha_{IIb}$  über Rhodamin gekoppelte Sekundärantikörper. In der oberen Bildreihe sind Streßfasern zu erkennen, in der unteren Bildreihe fokale Adhäsionsstellen.

### 3.4.2 Thrombozyten

Nachdem Syk in transfizierten CHO-Zellen lokalisiert werden konnte, wurden Untersuchungen in Thrombozyten zur Lokalisation von Syk durchgeführt. Syk konnte während des Formwandels wegen der kleinen und kompakten Form der Thrombozyten nicht mit Immunfluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Jedoch war dies an Thrombozyten, die sich auf Deckgläschen ausgebreitet hatten (Thrombozyten-*spreading*) möglich. Hier konnten ebenfalls Colokalisationsbereiche von Syk und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 21). Da Syk sehr viel geringer in Thrombozyten exprimiert ist als das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , mußte eine höhere Syk-Antikörperkonzentration eingesetzt werden im

Vergleich zur Antikörperkonzentration gegen das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Um nachzuweisen, daß die Syk-Anfärbung spezifisch war, wurden Kontrollen mit IgG (0,5  $\mu$ g) bzw. beim anti-Syk (C-20) Peptid-Antikörper mit dem entsprechenden Peptid (5  $\mu$ g) durchgeführt, welche kein Signal bzw. nur ein schwaches Hintergrundsignal aufwiesen.



**Abb. 21: Colokalisation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und von Syk in ausgebreiteten Thrombozyten**

Thrombozyten wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen zentrifugiert und bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Lokalisation des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und von Syk wurde über Immunfluoreszenz ermittelt. Es sind Doppelfärbungen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und von Syk gezeigt. Die Pfeile zeigen beispielhaft Bereiche der Colokalisation beider Proteine an der Zellmembran.

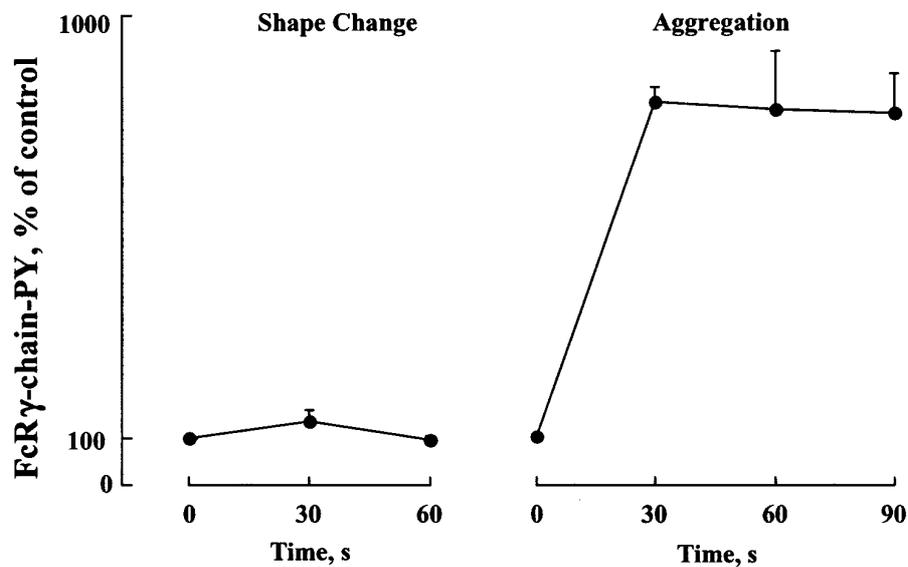
### 3.4.2.1 Thrombozyten-Aggregation: FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung, Syk- und PLC $\gamma$ 2-Aktivierung

Um der Frage der Regulation von Syk nach Aktivierung des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 nachzugehen, werden Untersuchungen an aggregierenden Thrombozyten durchgeführt. Die Thrombozytenaggregation wird über die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 vermittelt, welche zu *outside-in* Signalen wie Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk führt. Eine Auftrennung von Syk-Immunpräzipitaten von Thrombin-aggregierten Thrombozyten auf einem Gradientengel zeigte, daß die ITAM-enthaltende FcR $\gamma$ -Kette vermehrt tyrosinphosphoryliert wird und mit Syk assoziiert. Dabei zeigte die tyrosinphosphorylierte FcR $\gamma$ -Kette eine Doppelbande bei etwa 15 kDa Molekülmasse. Identifiziert wurde die FcR $\gamma$ -Kette durch *stripping* der Membran und durch einen Immunoblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die FcR $\gamma$ -Kette. Es wurde gefunden, daß bei der Verwendung des EDTA enthaltenden Lysis-Puffers für die Syk-Immunpräzipitation, der für die Pull-down Assays mit dem GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein verwendet wurde (2.2.6), die Tyrosinphosphorylierung deutlich besser nachweisbar war. Die Tyrosinphosphorylierung von Syk und der assoziierten FcR $\gamma$ -Kette war 10 s nach Induktion der Aggregation durch Thrombin detektierbar und war nach 30 s maximal (Abb. 22). Als Positivkontrolle diente Kollagen, ein starker Stimulus der Tyrosinphosphorylierung von Syk und der FcR $\gamma$ -Kette (Gibbins et al., 1996).

Nach einer Vorbehandlung der Blutplättchen mit RGDS, welches die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und die Thrombin-induzierte Aggregation hemmt, konnte keine Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette in den Syk-Immunpräzipitaten beobachtet werden (Abb. 22). Ebenfalls kam es unter diesen Bedingungen bei Pull-down Assays zu keiner Zunahme an phosphorylierter FcR $\gamma$ -Kette (Zugabe von RGDS und kein Rühren; Daten nicht gezeigt). Syk war jedoch tyrosinphosphoryliert, allerdings schwächer als in den aggregierten Proben (s. Abb. 23, Spur 2 im Vergleich zu Spuren 6 bis 8). Die Anwesenheit der tyrosinphosphorylierten FcR $\gamma$ -Kette in den Syk-Immunpräzipitaten war also abhängig von der Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und der Thrombozytenaggregation.

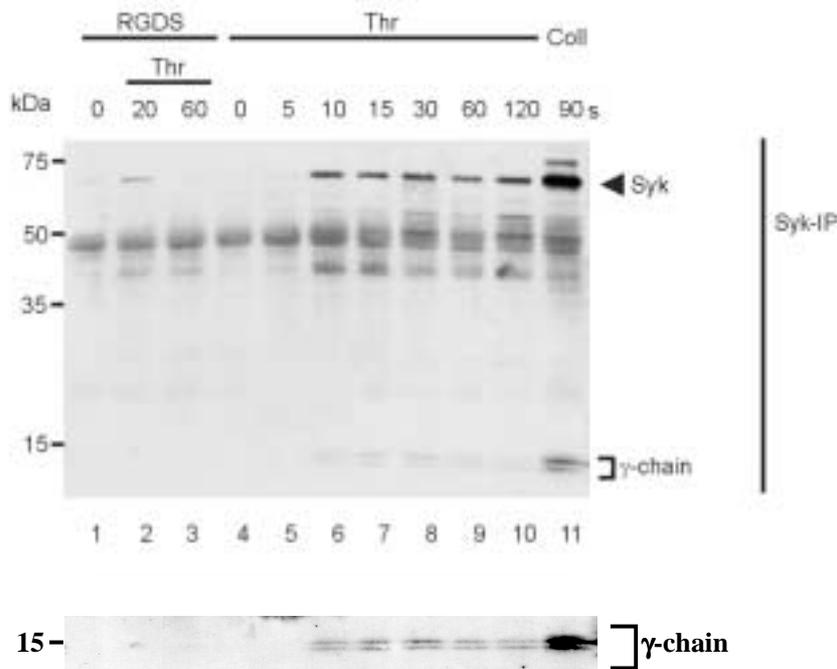
Die Stimulus-induzierte Assoziation von Syk und der FcR $\gamma$ -Kette in aggregierenden

Thrombozyten konnte auch in Pull-down Assays mit einem GST-Fusionsprotein, das die Tandem-SH2-Domäne von Syk enthielt, gefunden werden (Abb. 24). Zeitabhängig assoziierte in Thrombin-aggregierten Blutplättchen die tyrosinphosphorylierte FcR $\gamma$ -Kette mit dem GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein. Das Maximum war 30 s nach der Zugabe von Thrombin erreicht. GST allein diente als Kontrolle und zeigte keine FcR $\gamma$ -Doppelbande (Abb. 26B, Spur 6).



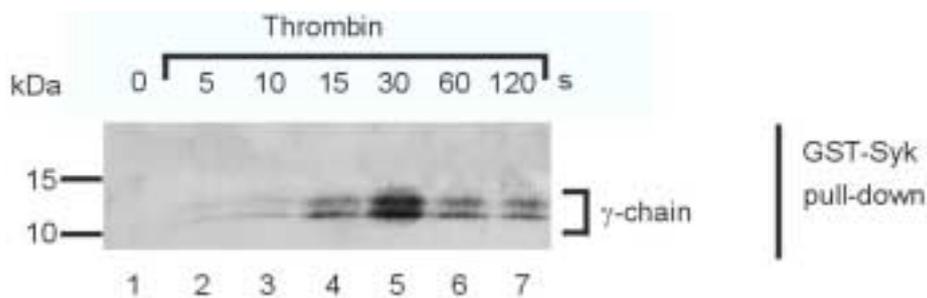
**Abb. 22: Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette während *shape change* und Aggregation in Abhängigkeit von der Zeit**

Suspensionen von gewaschenen humanen Thrombozyten wurden mit Thrombin (1U/ml) aktiviert; zum einen nach Vorinkubation mit RGDS (1mM) ohne Rühren um einen *shape change* zu induzieren (links), oder zum anderen mit Rühren um eine Aggregation der Thrombozyten auszulösen (rechts). Plättchen wurden lysiert, Syk wurde immunpräzipitiert und die Phosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette wurde über einen Immunoblot und dessen densitometrische Auswertung analysiert. (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 4)



**Abb. 23: Coimmunpräzipitation der tyrosinphosphorylierten FcR $\gamma$ -Kette mit Syk während der Thrombin-induzierten Thrombozyten-Aggregation**

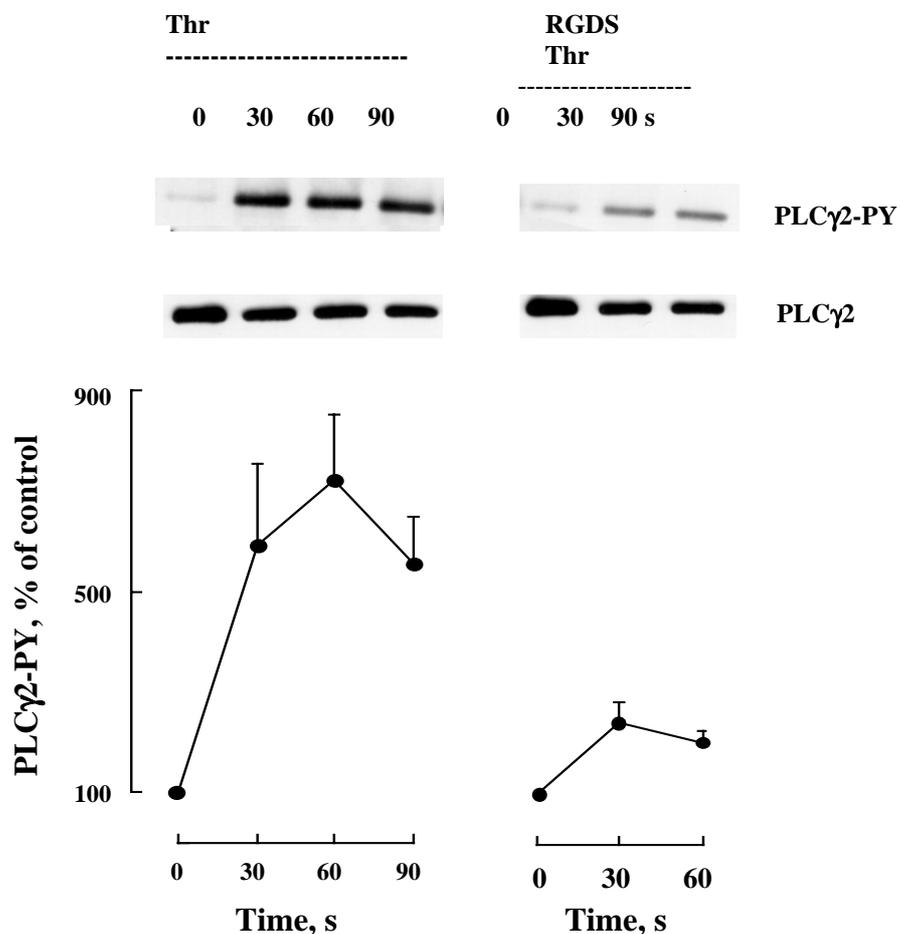
Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten wurden bei 37°C für 3 min ohne oder mit RGDS (1 mM, Spur 1-3) inkubiert. Thrombin (1 U/ml, Spuren 2 bis 10) und Kollagen (100  $\mu$ g/ml, 90 s, lane 11) wurden zugegeben und für die angegebene Zeitdauer inkubiert. In den Proben 1-3 erfolgte die Aktivierung der Thrombozyten ohne Rühren, um zusätzlich zu der RGDS-Vorbehandlung eine Thrombozyten-Aggregation zu verhindern. Die Thrombozyten wurden lysiert und Syk wurde immunpräzipitiert. Die Abbildung zeigt einen Anti-Phosphotyrosin Blot (unten: längere Exposition der FcR $\gamma$ -Kette) der Anti-Syk Immunpräzipitate und ist repräsentativ für 5 weitere Experimente.



**Abb. 24: Assoziation der tyrosinphosphorylierten FcR $\gamma$ -Kette mit dem GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein in Thrombin-aggregierten Thrombozyten**

Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten wurden mit Thrombin (1 U/ml) für verschiedene Zeiten stimuliert. Die Thrombozyten wurden lysiert, die Proteine in einem Pull-down Assay mit 10  $\mu$ g GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein aus den Zellysaten präzipitiert. Die Abbildung zeigt einen Anti-Phosphotyrosin Blot und ist repräsentativ für 2 weitere Experimente.

Desweiteren wurde die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 untersucht, welche ein Zielprotein der Syk-Aktivierung in Kollagen-stimulierten Thrombozyten darstellt. Die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 stieg um das 8-fache in Thrombin-aggregierten Thrombozyten an, aber nur zu einem geringeren Ausmaß in Thrombin-stimulierten Thrombozyten während des *shape change* in Abwesenheit von Aggregation (Abb. 25).



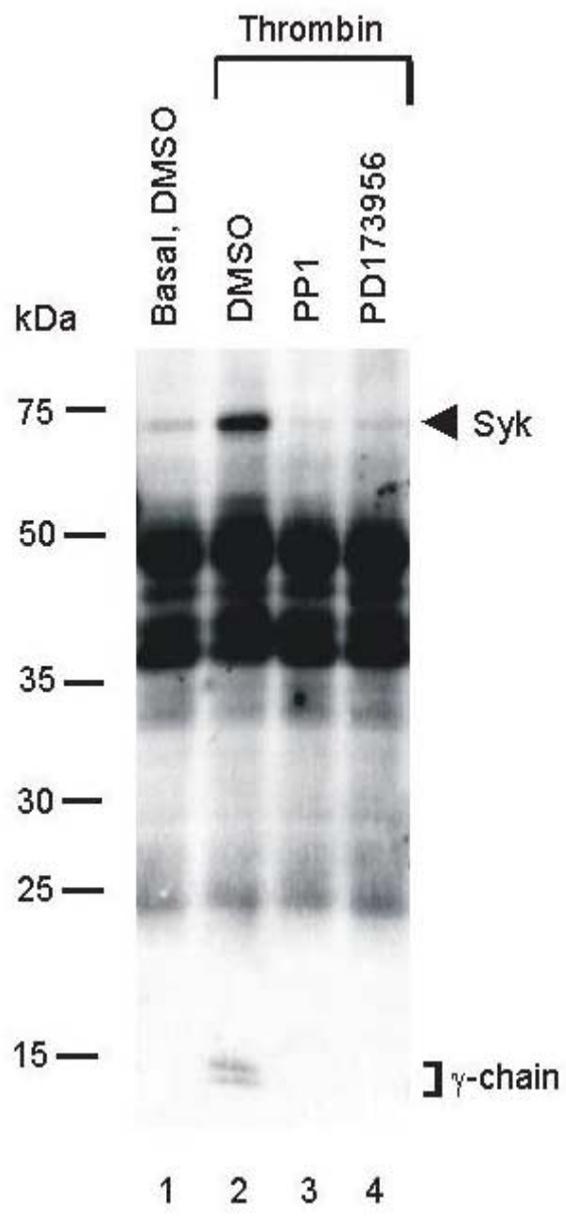
**Abb. 25: Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 in Thrombin-stimulierten Thrombozyten**

Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten wurden mit Thrombin (1 U/ml) aktiviert, entweder unter Rühren, um eine Aggregation hervorzurufen (links), oder nach Vorinkubation mit RGDS (1 mM) ohne Rühren, um den *shape change* zu induzieren (rechts). Die Thrombozyten wurden lysiert und die PLC $\gamma$ 2 wurde immunpräzipitiert. Gezeigt sind repräsentative anti-Phosphotyrosin Blots und anti-PLC $\gamma$ 2 Blots der PLC $\gamma$ 2 Immunpräzipitate (oben) und die Ergebnisse der densitometrischen Messungen der PLC $\gamma$ 2 Tyrosinphosphorylierung (unten).

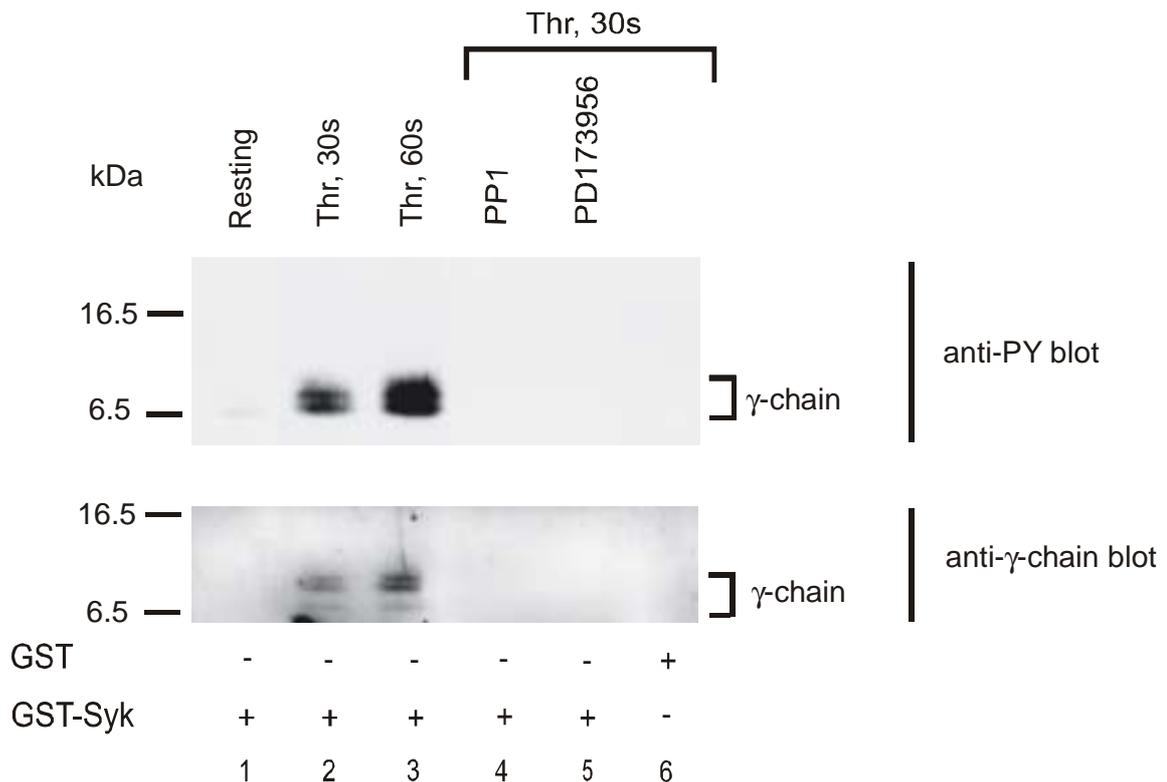
Um die Tyrosinkinase zu identifizieren, welche verantwortlich sind für die Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette und der Syk-Aktivierung, wurden die spezifischen Inhibitoren der Src-Kinasen PP1 und PD173956 verwendet. Es wurde gefunden, daß diese zwei Inhibitoren die Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette in Thrombin-stimulierten Thrombozyten hemmen. Die Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette war in Syk-Immunpräzipitaten und in GST-Syk Tandem-SH2 Pull-down Assays nachweisbar (Abb. 26A, B). Außerdem hemmen die Src-Kinase Inhibitoren die Assoziation der FcR $\gamma$ -Kette mit der Syk Tandem-SH2-Domäne (Abb. 26B unten), was darauf schließen läßt, daß die Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette erforderlich ist für die Assoziation mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk. Weiterhin war die Tyrosinphosphorylierung von Syk ebenfalls inhibiert (Abb. 26A).

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die Aktivierung des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 durch Fibrinogen in Thrombin-aggregierten Thrombozyten zur Src-Kinase vermittelten Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette führt, welche dann mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk assoziiert. Anschließend kommt es zu einer vermehrten Syk-Tyrosinphosphorylierung, Syk-Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2. Dagegen wird während des *shape change* ohne Aggregation die Tyrosinphosphorylierung von Syk und der PLC $\gamma$ 2 nur gering stimuliert, und zwar durch einen Signalweg, der unabhängig von der FcR $\gamma$ -Kette ist.

**A**



## B



**Abb. 26: Inhibierung der Tyrosinphosphorylierung von Syk und der assoziierten Fc $\gamma$ -Kette durch die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 in Thrombin-stimulierten Thrombozyten**

(A) Anti-Phosphotyrosin Blot der Syk-Immunpräzipitate

Suspensionen von humanen Thrombozyten wurden mit DMSO (Spuren 1, 2), PP1 (20 $\mu$ M, Spur 3) und PD173956 (2,5  $\mu$ M, Spur 4) für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor sie mit Thrombin (1 U/ml) für 30 s aggregiert wurden. Das Experiment ist repräsentativ für 3 Experimente.

(B) Anti-Phosphotyrosinblot von Pull-down Assays mit GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein

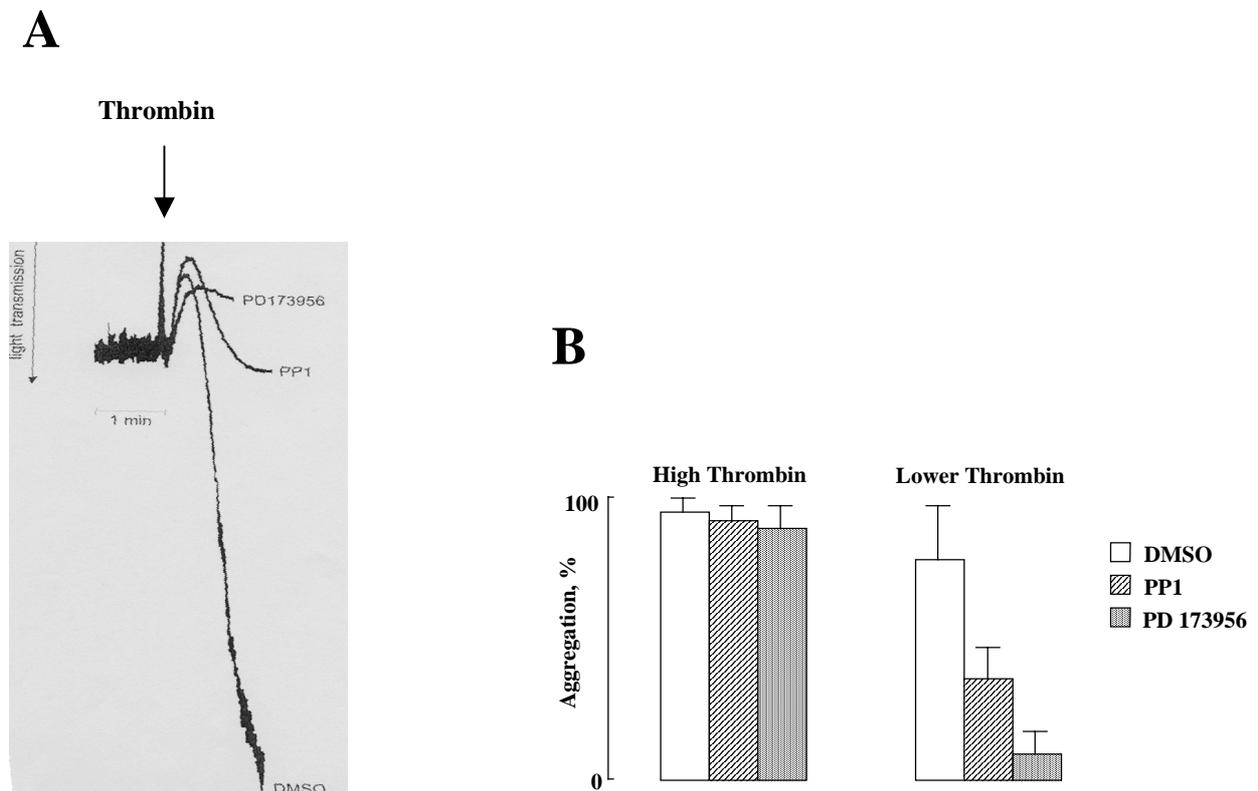
Thrombozyten wurden mit DMSO (Spuren 1-3, 6), PP1 (20  $\mu$ M, Spur 4) oder PD173956 (2,5  $\mu$ M, Spur 5) für 10 min inkubiert, bevor sie mit Thrombin (1 U/ml) für 30 s oder 60 s aggregiert wurden. Die Proteine wurden mit 10  $\mu$ g GST-Syk Tandem-SH2 Fusionsprotein (Spuren 1-5) oder einem molaren Äquivalent an GST (Spur 6) aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und es wurde ein Phosphotyrosin-Blot erstellt (oben). Der Blot wurde *gestrippt* und mit anti-Fc $\gamma$ -Ketten Antikörpern behandelt (unten).

Um die funktionelle Relevanz des beschriebenen Signalwegs zu untersuchen, wurden Aggregationsstudien mit den Src-Familie Kinase spezifischen Inhibitoren PP1 und PD173956 durchgeführt.

Die Src-Kinase Inhibitoren hatten eine hemmende Wirkung auf die Thrombin-induzierte Aggregation. Sowohl PP1 (20  $\mu$ M) als auch PD173956 (2,5  $\mu$ M) hemmten die Aggregation nach niedrigen Thrombin-Konzentrationen (0,05-0,15 U/ml) (Abb. 27). Die Hemmung betrug  $40 \pm 11\%$  nach Vorinkubation der Plättchen mit 20  $\mu$ M PP1 und  $71 \pm 16\%$  nach Vorbehandlung mit 2,5  $\mu$ M PD 173956 (Mittelwert  $\pm$  SD, n=4 Experimente mit Thrombozyten verschiedener Spender). Der *shape change*, wie bereits in 3.3.2 ausführlich beschrieben, war unbeeinflusst von der Inkubation mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956. Wurden hohe Konzentrationen an Thrombin eingesetzt, verhinderten PP1 und PD173956 die Plättchenaggregation nicht (Abb. 27B).

Die Ergebnisse legen nahe, daß das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 *outside-in signaling* zu einer durch die Src-Familie Kinasen vermittelten Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette und deren Assoziation mit Syk führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Syk und zur Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2. Dieser Signalweg scheint eine Rolle bei der Thrombozytenaggregation zu spielen, welche durch niedrige, nicht aber hohe Thrombin-Konzentrationen ausgelöst wird.

Diese Schlußfolgerung wird durch Studien an Thrombozyten von Syk und FcR $\gamma$ -Ketten defizienten Mäusen unterstützt. In drei Experimenten wurden die Aggregationkurven nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Thrombin (0,01 – 0,3 U/ml) in FcR $\gamma$ -Ketten (-/-) und Wildtyp-Maus-Thrombozyten verglichen. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse in einer Übersicht. In Abb. 28 A sind die Aggregationskurven von Versuch 3 abgebildet. Die FcR $\gamma$ -Ketten(-/-) und auch Syk (+/-) (Abb. 28B) Maus-Thrombozyten zeigten eine verzögerte und verringerte Aggregation nach Stimulation mit niedrigen im Vergleich zu höheren Konzentrationen an Thrombin.



**Abb. 27: Die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 inhibieren die Aggregation von humanen Thrombozyten induziert durch niedrige Konzentrationen von Thrombin.**

Suspensionen von Aspirin-vorbehandelten gewaschenen humanen Thrombozyten wurden in Aggregometer-Küvetten gegeben und 10 min mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 (20  $\mu$ M) und PD173956 (2,5 $\mu$ M) inkubiert, bevor sie mit Thrombin aktiviert wurden.

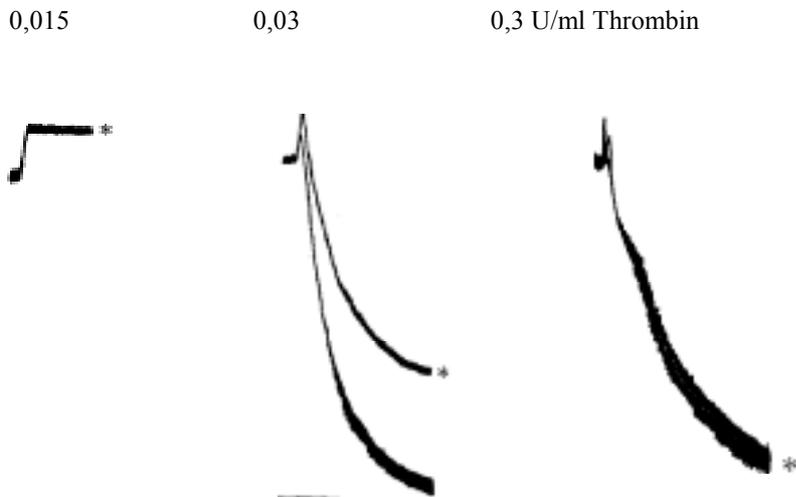
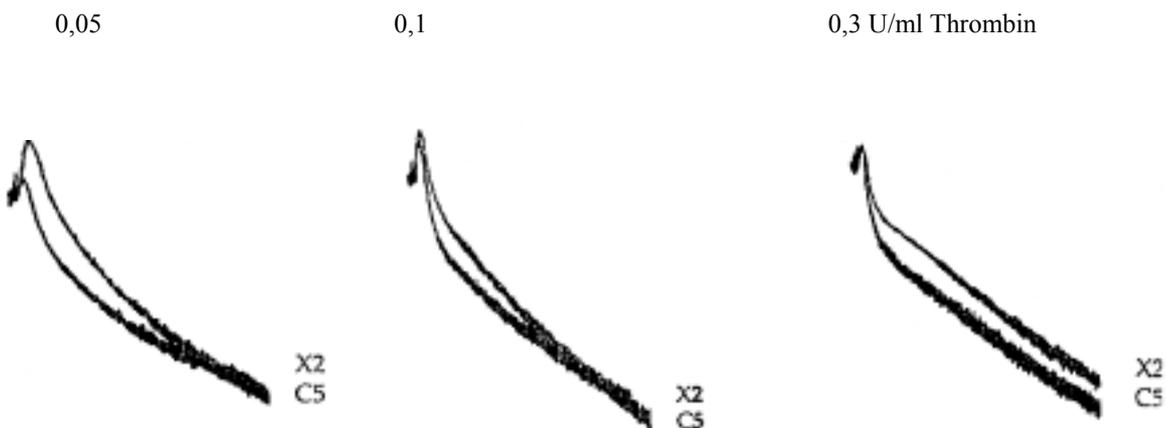
(A) Repräsentative Aggregationskurven von Thrombozyten stimuliert mit 0,04 U/ml Thrombin.

(B) Balkendiagramm. Hohe Thrombinkonzentrationen: 0,2 - 1 U/ml; niedrige Thrombinkonzentrationen: 0,05 - 0,15 U/ml.

**Tab. 3: Aggregation in FcR $\gamma$ -Ketten defizienten Maus-Thrombozyten (-/-) im Vergleich zu Wildtyp-Maus-Thrombozyten (+/+)**

<b>Versuchs-Nr.</b>	<b>1</b> +/+	<b>1</b> -/-	<b>2</b> +/+	<b>2</b> -/-	<b>3</b> +/+	<b>3</b> -/-
Thrombin [U/ml]						
<b>0,01</b>	<b>s.c.</b>	<b>s.c.</b>	-	-	-	-
<b>0,015</b>	-	-	-	-	<b>s.c.</b>	<b>s.c.</b>
<b>0,03</b>	<b>15,6</b>	<b>3,2</b>	<b>81,3</b>	<b>68,8</b>	<b>100</b>	<b>75</b>
<b>0,06</b>	<b>64,9</b>	<b>43,5</b>	<b>53,1</b>	<b>71,9</b>	-	-
<b>0,1</b>	<b>100</b>	<b>75,3</b>	<b>84,4</b>	<b>100</b>	-	-
<b>0,3</b>	-	-	-	-	<b>90,9</b>	<b>90,9</b>

Gewaschene Wildtyp-Maus-Thrombozyten (+/+) und FcR $\gamma$ -Ketten (-/-)-Maus-Thrombozyten wurden mit Thrombin (0,01 – 0,3 U/ml) stimuliert und die Aggregationskurven im Aggregometer aufgezeichnet. Die Maximalaggregation jedes Versuchs wurde auf 100% gesetzt. (s.c. = *shape change*)

**A****B**

**Abb. 28: Erniedrigung der thrombin-induzierten Aggregation von defizienten Maus-Thrombozyten ohne FcR $\gamma$ -Kette (A) oder Syk (B)**

(A) *Shape change* und Aggregation von Thrombozyten, welche aus Wildtyp- und FcR $\gamma$ -Ketten (-/-) Mäusen isoliert wurden, wurden durch verschiedene Konzentration von Thrombin (0,015 U/ml bis 0,3 U/ml) induziert. Die Kurven der FcR $\gamma$ -Ketten knock-out Maus-Thrombozyten sind mit (\*) gekennzeichnet.

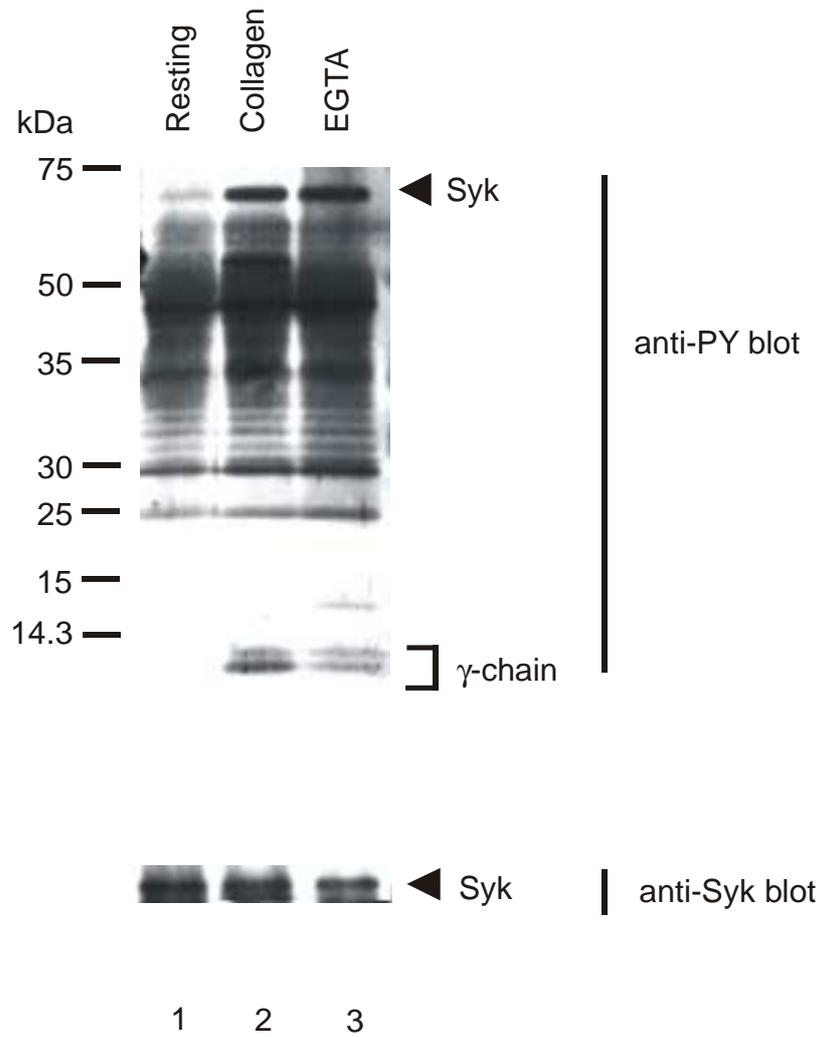
(B) Thrombozyten wurden aus Wildtyp(C5)- und Syk-defizienten(X2, Syk+/-)-Mäusen isoliert und die Aggregation der Thrombozyten durch verschiedene Konzentrationen an Thrombin (0,05 U/ml bis 0,3 U/ml) induziert.

### **3.4.2.2 Dissoziation des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ : FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung, Syk- und PLC $\gamma$ 2-Aktivierung**

Da die Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch EGTA-Behandlung der Thrombozyten (5 mM, 20 min) die Tyrosinphosphorylierung von Syk stimuliert (s. 3.3.1 und Negrescu und Siess, 1996), war die Frage, ob hier auch die FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung involviert ist.

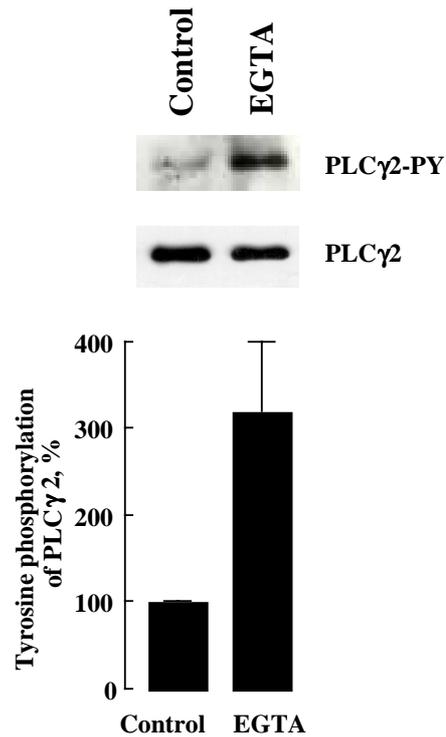
Es wurde gefunden, daß nach EGTA-Behandlung der Thrombozyten (5 mM, 20 min) die FcR $\gamma$ -Kette tyrosinphosphoryliert wird und mit Syk coimmunpräzipitiert (Abb. 29). Dabei war bei Verwendung des EDTA enthaltenden Lysispuffers C (s. 2.2.6) mit Triton X-100 anstelle von NP-40 für die Syk-Immunpräzipitation die Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette deutlich besser nachweisbar.

Desweiteren bewirkte die durch EGTA induzierte Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine Stimulation der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 (Abb. 30).



**Abb. 29: Coimmunpräzipitation der tyrosinphosphorylierten FcR $\gamma$ -Kette mit Syk nach Dissoziation des Integrins  $\alpha$ <sub>IIb</sub> $\beta$ <sub>3</sub> mit EGTA**

Suspensionen gewaschener menschlicher Thrombozyten wurden mit Puffer (ruhende Thrombozyten, Spur 1), Kollagen (100  $\mu$ g/ml, 90 s, Spur 2) oder EGTA (5 mM, 20 min, Spur 3) inkubiert. Syk wurde aus den Thrombozytenlysaten immunpräzipitiert. Es ist ein Antiphosphotyrosin-Blot der Anti-Syk Immunpräzipitate gezeigt (oben). Der Anti-Syk Blot (unten) zeigt, daß vergleichbare Mengen Syk immunpräzipitiert wurden.

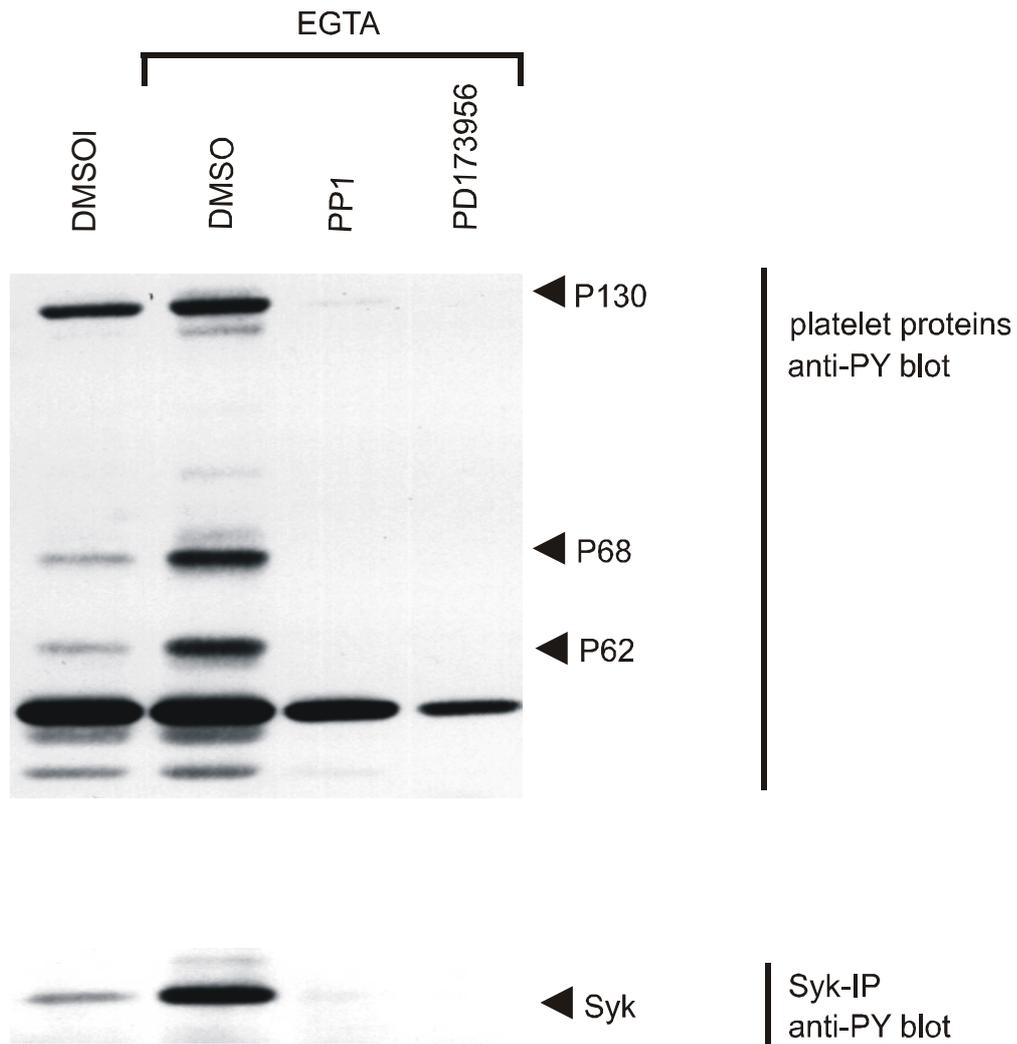


**Abb. 30: Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit EGTA stimuliert die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2.**

Thrombozyten wurden mit Puffer oder EGTA (5 mM) für 20 min inkubiert. Oben: anti-Phosphotyrosin Blot und anti-PLC $\gamma$ 2 Blot der PLC $\gamma$ 2 Immunpräzipitate; unten: Balkendiagramm.

Eine Vorbehandlung der Thrombozyten mit den zwei selektiven Inhibitoren der Src-Familie der Tyrosinkinasen (Src-Tyrosinkinasen) PP1 (20  $\mu$ M, 10 min) oder PD173956 (2,5  $\mu$ M, 10 min) führte zu einer kompletten Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 und Syk (s. Abb. 31) und der FcR $\gamma$ -Kette (nicht gezeigt). Die Resultate zeigen eine Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine von der Aktivität der Src-Tyrosinkinasen.

Die Ergebnisse nach Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch EGTA weisen auf folgende Signalkaskade hin: Src-Kinasen  $\rightarrow$  FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung  $\rightarrow$  Syk-Aktivierung und PLC $\gamma$ 2 Tyrosinphosphorylierung. Hervorzuheben ist, daß es nach dieser Behandlung der Thrombozyten mit EGTA zu keiner Aktivierung der Thrombozyten kommt.



**Abb. 31: Die Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 inhibieren die Tyrosinphosphorylierung von Syk, P62, P68, P130 induziert durch Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Dissoziation.**

Thrombozyten wurden mit DMSO, PP1 (20  $\mu$ M) oder PD173956 (2,5  $\mu$ M) für 10 min behandelt und anschließend mit EGTA (5 mM) für 20 min inkubiert, um das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu dissoziieren. Gezeigt sind Antiphosphotyrosin-Blots von Thrombozytenproteinen und von Syk-Immunpräzipitaten.

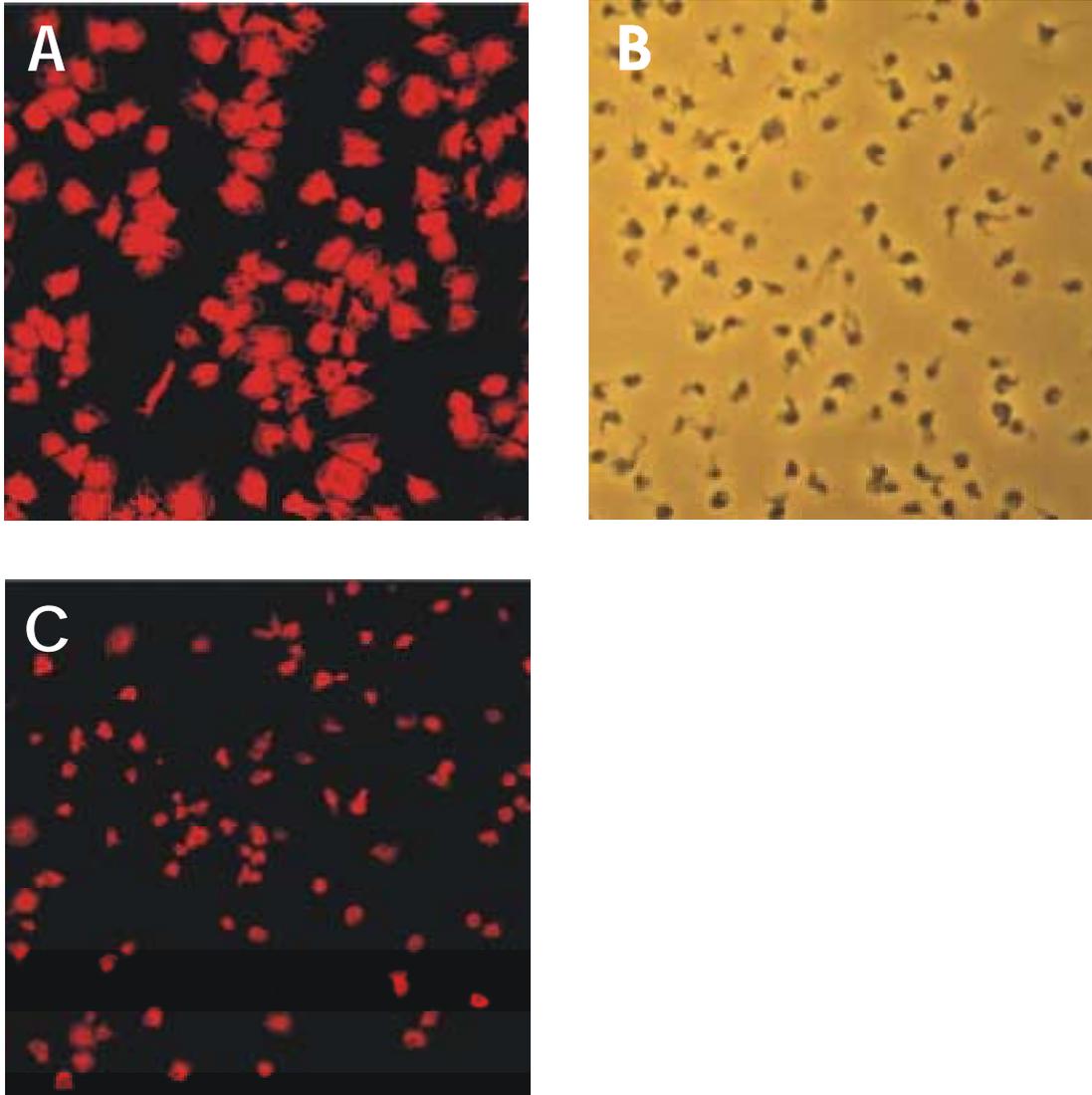
### 3.4.2.3 Ausbreitung

#### *Spreading* von humanen Thrombozyten

Thrombozyten, die durch Zentrifugation auf Glas aktiviert und anschließend bei 37°C inkubiert werden, breiten sich aus (*spreading*). Dabei ist die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  essentiell für diesen Prozeß.

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem Fibrinogen-Rezeptor Antagonisten RGDS war eine deutliche Hemmung des *spreading* zu erkennen (Abb. 32A, C; F-Aktin-Färbung). Auch zeigten Versuche mit Thrombozyten von Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann, welchen das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  fehlt, kein *spreading* (Abb. 32B, Phasenkontrast). Hier breiteten sich diese Thrombozyten nicht aus, sondern verblieben im *shape change* Stadium, zeigten also kugelige, sphärische Gestalt und Pseudopodien.

Es wurde mittels spezifischer Inhibitoren (Tab. 4) untersucht, ob für die Regulation der Thrombozyten-Ausbreitung Tyrosinkinase wichtig sind. Weiterhin wurde die Wirkung von Hemmern der Proteinkinase C und Rho-Kinase getestet. Dabei wurden sowohl das *spreading* fluoreszenzmikroskopisch als auch die Protein-Tyrosinphosphorylierung während des *spreading* biochemisch gemessen. Als Kontrolle dienten unstimulierte Thrombozyten in Suspension.



**Abb. 32: Hemmung des *spreading* bei Thrombasthenia Glanzmann Thrombozyten bzw. nach RGDS-Behandlung**

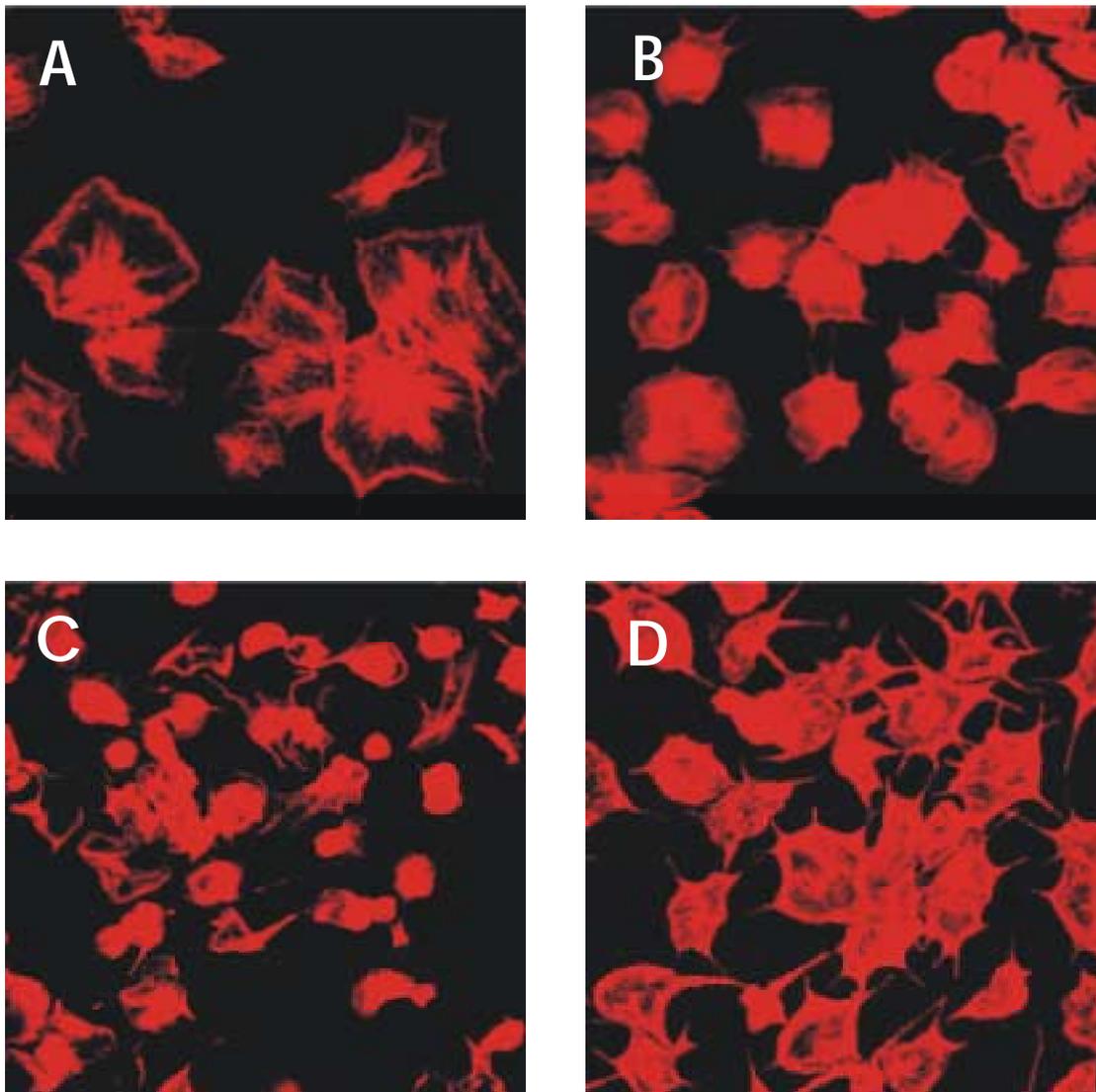
Suspensionen von gewaschenen humanen Thrombozyten eines normalen Blutspenders (A, Aktinfärbung) und von einem Patienten mit Thrombasthenia Glanzmann (B, Phasenkontrast-Bild) wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (250 x g, 5 min) und für 15 min bei 37°C inkubiert. C: Vorinkubation der Thrombozyten für 3 min mit RGDS (1mM) (Aktinfärbung).

**Tab. 4: Agentien, deren Effekt auf das *spreading* von humanen Thrombozyten untersucht wurde, und die jeweils im Experiment eingesetzte Konzentration und Einwirkzeit**

Agentien	Eigenschaften	Konzentration	Zeit
FR-1	Fibrinogenrezeptor Antagonist	15 $\mu\text{M}$	3 min
PD 173956	Src-Kinase Hemmer	2,5 $\mu\text{M}$	10 min
PP1	Src-Kinase Hemmer	20 $\mu\text{M}$	10 min
Ro-31-8220	Protein Kinase C Hemmer	0,2 $\mu\text{M}$ , 2 $\mu\text{M}$	20 min
BAPTA-AM EGTA	Hemmung des zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$	20 $\mu\text{M}$ 1 mM	20 min 1 min
Y-27632	Rho-Kinase Hemmer	20 $\mu\text{M}$	30 min
Genistein	allgemeiner Tyrosinkinasehemmer	150 $\mu\text{M}$	3 min

Die verschiedenen Hemmsubstanzen wurden mit Suspensionen gewaschener Thrombozyten (400000 Zellen /  $\mu\text{l}$ ) wie in der Tabelle 4 beschrieben bei 37°C inkubiert. Vor dem *spreading*-Versuch wurden Proben abgenommen und die Tyrosinphosphorylierung der Thrombozytenproteine gemessen. Anschließend wurde die Thrombozytensuspension auf eine Konzentration von 15000 /  $\mu\text{l}$  verdünnt und auf mit Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (24 x 32mm) 5 min zentrifugiert.

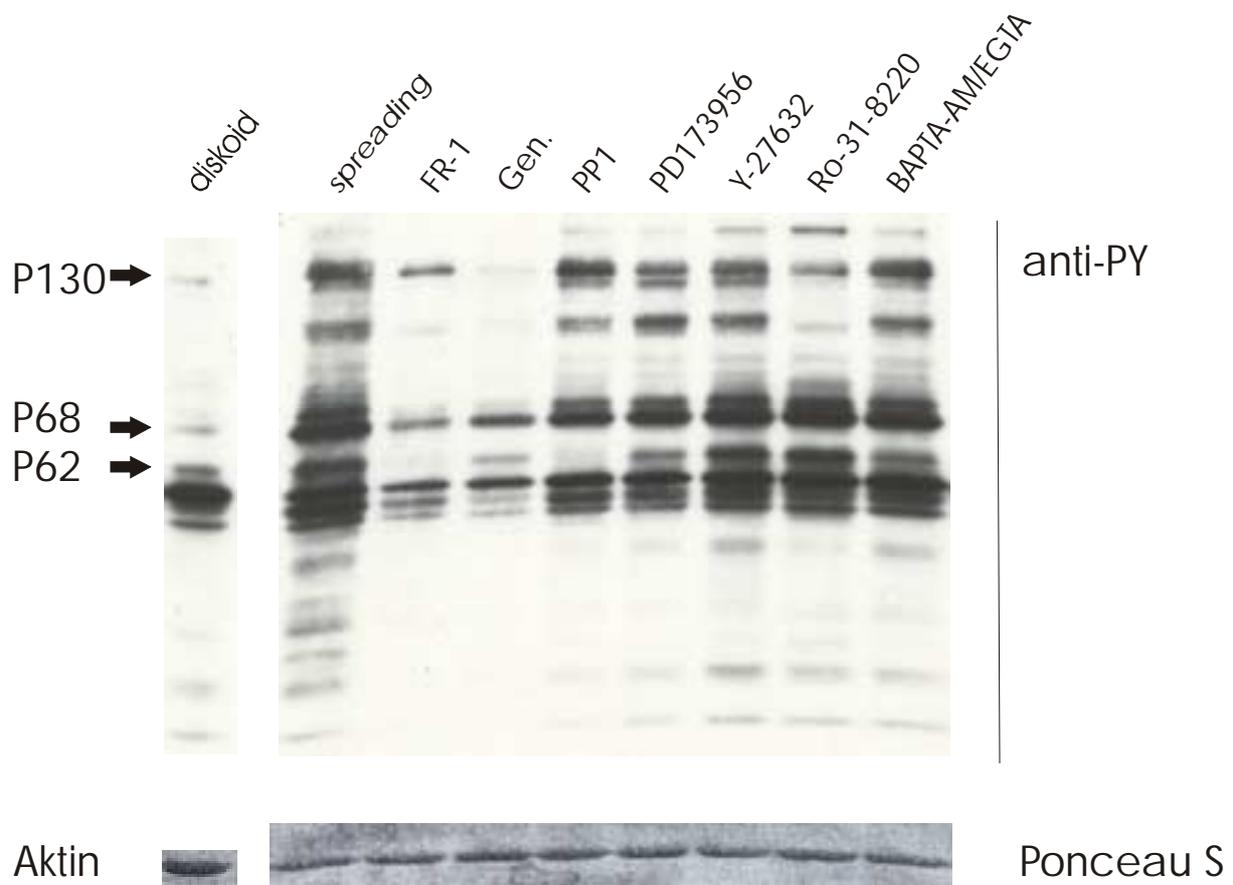
Den Einfluß mancher der verschiedenen in Tab. 4 beschriebenen Agentien auf die Morphologie der Thrombozyten während des *spreading* ist in Abb. 33 gezeigt. Die Proteintyrosinphosphorylierung ist in Abb. 34 dargestellt.



**Abb. 33: Einfluß von Src-Kinase Hemmern (PP1, PD173956) und dem PKC-Hemmer Ro-31-8220 auf das *spreading* von adhärenenten Thrombozyten**

Suspensionen gewaschener Thrombozyten (400000 Zellen /  $\mu\text{l}$ ) wurden mit den verschiedenen Inhibitoren bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert, verdünnt auf eine Konzentration von 15000 /  $\mu\text{l}$  und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert, fixiert, permeabilisiert und anschließend einer Färbung mit Rhodamin-Phalloidin gegen F-Aktin unterzogen (5000-fache Vergrößerung).

Inkubationsbedingungen: A: Kontrolle, B: PP1 (20  $\mu\text{M}$ ), C: PD173956 (2,5  $\mu\text{M}$ ), D: PKC-Hemmer Ro-31-8220 (0,2  $\mu\text{M}$ ). Vergrößerung: etwa 5000-fach.



**Abb. 34: Einfluß eines Fibrinogenrezeptorantagonisten (FR-1), verschiedener Proteinkinase-Inhibitoren und von BAPTA-AM/EGTA auf die Proteintyrosinphosphorylierung adhärenter Thrombozyten**

Thrombozytensuspensionen (400000 Zellen /  $\mu\text{l}$ ; 600  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 0,25% DMSO (Spur 2, *spreading*), FR-1 (15  $\mu\text{M}$ , 3 min; Spur 3), Genistein (150  $\mu\text{M}$ , 3 min; Spur 4), PP1 (20  $\mu\text{M}$ , 10 min; Spur 5), PD173956 (2,5  $\mu\text{M}$ , 10 min; Spur 6), Y-27632 (20  $\mu\text{M}$ , 30 min; Spur 7), Ro-31-8220 (2  $\mu\text{M}$ , 20 min; Spur 8) und BAPTA-AM (20  $\mu\text{M}$ , 20 min) / EGTA (1 mM, 1 min; Spur 9) vorinkubiert. Anschließend wurden Aliquots (50  $\mu\text{l}$ ) auf 1,4 ml (15000 Zellen /  $\mu\text{l}$ ) verdünnt, die Zellen ( $21 \times 10^6$  Zellen) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (24 x 32 mm) zentrifugiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 2x Laemmli-Puffer lysiert, über ein Gradientengel (5 - 20%) aufgetrennt und ein Phosphotyrosin-Immunoblot angefertigt. Probe 1 zeigt die Tyrosinphosphorylierung nicht-adhärenter diskoider Thrombozyten ( $20 \times 10^6$  Zellen). Die Membran wurde *gestrippt* und anschließend mit einem polyklonalen Antikörper gegen die FcR $\gamma$ -Kette erneut inkubiert. Die Ponceau S Färbung der Membran zeigt, daß die in den verschiedenen Spuren aufgetragene Proteinmenge (gemessen an Aktin) vergleichbar ist.

Während des *spreading* von Thrombozyten wird eine Reihe von Proteinen vermehrt tyrosinphosphoryliert (s. Abb. 34). Am auffälligsten sind dies die Proteine P62, P68, P130, desweiteren mehrere Banden im Bereich von 50 - 60 kDa, bei welchen es sich um

Tyrosinkinase der Src-Familie handelt, sowie eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa. Die fokale Adhäsionskinase FAK konnte mit einem monoklonalen Antikörper identifiziert werden. Sie läuft direkt unterhalb der P130 Bande. Desweiteren war auch eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette (15 kDa Molekülmasse) während des *spreading* zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Die ausgebreiteten Kontrollthrombozyten zeigten ein deutliches *spreading*. Es sind „Radspeichen“-förmige Strukturen zu erkennen, die von einem mehr oder weniger kreisförmigen Saum umgeben sind (s. Aktin-Färbung Abb. 33A). Die diversen Inhibitoren hatten folgende Einflüsse auf das *spreading* und die damit verbundene Stimulation der Protein-Tyrosinphosphorylierung: Der Fibrinogenrezeptor-Antagonist FR-1 verhinderte durch Hemmung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  das *spreading*, nicht jedoch den Gestaltwandel (Ausbildung von Pseudopodien) der adhärenen Thrombozyten (nicht gezeigt), und reduzierte drastisch die Tyrosinphosphorylierung. Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist somit essentiell für das *spreading* von Thrombozyten.

Der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein hatte einen starken Hemmeffekt auf die Ausbreitung der Thrombozyten (nicht gezeigt) und auf die durch das *spreading* hervorgerufene Tyrosinphosphorylierung. Auffallend war die komplette Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von P130. Eine Vorinkubation mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 zeigte morphologisch eine partielle Hemmung der Thrombozytenausbreitung (Abb. 33B, C). Parallel dazu war eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierung zu beobachten. Auffallend war die komplette Hemmung der Tyrosinphosphorylierung des Proteins P62 nach Behandlung der Thrombozyten mit PP1.

Nach einer Vorinkubation mit dem Rho-Kinase Hemmer Y-27632 fiel bei den morphologischen Untersuchungen auf, daß häufiger Spätstadien der Ausbreitung zu finden waren (Aktinverdichtungen, häufig in Form von kreisförmigen Strukturen am Zellrand; Daten nicht gezeigt), was auf eine Beschleunigung des *spreading* durch Y-27632 hindeutet. Die Tyrosinphosphorylierung blieb unbeeinflusst.

Desweiteren wurde der Einfluß des PKC-Hemmers Ro-31-8220 untersucht. Das *spreading* nach einer Vorbehandlung mit Ro-31-8220 war nicht so stark ausgeprägt wie bei den Kontrollthrombozyten (Abb. 33D). Beim Tyrosinphosphorylierungsmuster nach dem *spreading* fiel auf, daß die fokale Adhäsionskinase FAK bei 125 kDa und die beschriebene Doppelbande bei 95 kDa nicht mehr phosphoryliert waren.

Nach BAPTA-AM (20  $\mu$ M, 20 min), EGTA (1mM, 1 min) waren keine signifikanten

Änderungen beim *spreading* als auch bei der Tyrosinphosphorylierung zu erkennen.

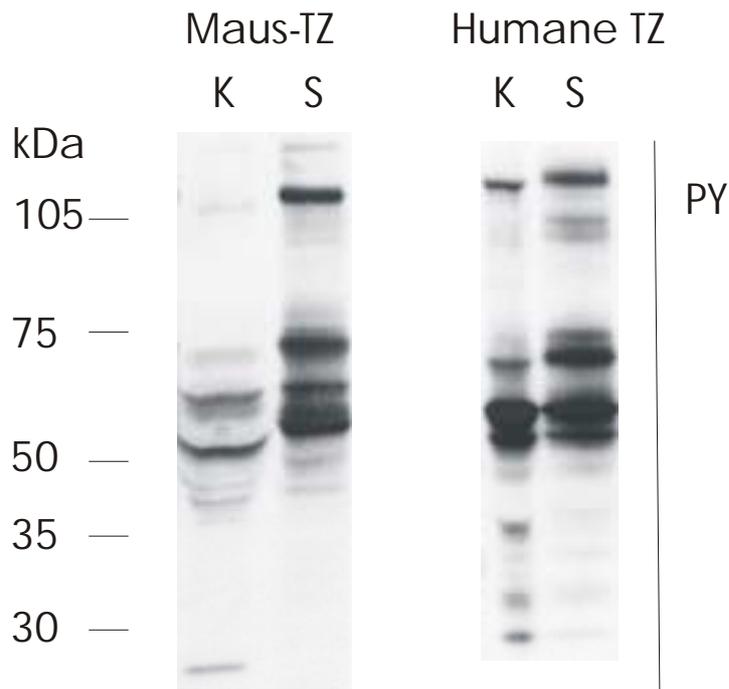
Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, daß Src-Kinasen für das *spreading* erforderlich sind. Desweiteren scheint auch die Proteinkinase C wichtig zu sein, wovon in der weiteren Signalkette auch die Tyrosinphosphorylierung der fokalen Adhäsionkinase FAK abhängt. Nach Hemmung der Rho-Kinase und nach Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels durch BAPTA-AM, EGTA-Behandlung waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

### **Maus-Thrombozyten**

Zur Klärung der Rolle der Src-Kinasen Fyn und Lyn sowie der Tyrosinkinase Syk für das *spreading*, wurden Fyn(-/-)-und FcR $\gamma$ -Ketten(-/-)-Maus-Thrombozyten untersucht. Diese waren über eine Kooperation mit dem Institute of Pharmacology, University of Oxford, UK, zugänglich.

Um bei Maus-Thrombozyten ein vergleichbares *spreading*-Verhalten und einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung wie bei humanen Thrombozyten beobachten zu können, mußten die Versuchsbedingungen modifiziert werden. Dafür wurden die Thrombozyten im wesentlichen nicht mit Aspirin vorbehandelt. Desweiteren wurden die Zentrifugationszeiten erniedrigt und die Drehzahlen modifiziert (2.2.1). Die gewaschenen Thrombozyten wurden auf mit Fibrinogen beschichtete Deckgläschen aufzentrifugiert und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert.

Während des *spreading* konnte dann in Maus-Thrombozyten ebenso wie in humanen Thrombozyten eine ähnliche Erhöhung des Musters der Proteintyrosinphosphorylierung beobachtet werden (s. Abb. 35).



**Abb. 35: Tyrosinphosphorylierung von Maus-Thrombozyten im Vergleich zu humanen Thrombozyten**

Die *spreading*-Experimente wurden für die Maus-Thrombozyten optimiert, um eine starke Ausbreitung der Maus-Thrombozyten zu sehen (2.2.1). Die Abbildung zeigt das Tyrosinphosphorylierungsmuster nach Auftrennung des Thrombozytenproteine über ein Gradientengel (5 – 20%). Es werden ruhende Thrombozyten (Kontrolle) und ausgebreitete Maus-Thrombozyten (*spreading*) den entsprechenden Resultaten von humanen Thrombozyten gegenübergestellt.

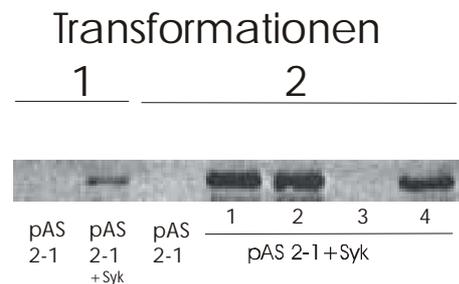
Wurden nun Maus-Wildtypthrombozyten mit Fyn(-/-)-Thrombozyten in ihrer Morphologie und ihrem Tyrosinphosphorylierungsmuster während des *spreading* verglichen, so waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen läßt, daß Fyn, eine Kinase der Src-Familie, zumindest für das *spreading* von murinen Thrombozyten nicht von entscheidender Bedeutung ist bzw. in ihrer Funktion von anderen Kinasen ersetzt werden kann.

Ebenso verhielt es sich bei *spreading* Versuchen, die mit FcR $\gamma$ -Ketten(-/-)-Maus-Thrombozyten durchgeführt wurden. Auch hier waren die Morphologie und die Änderung der Tyrosinphosphorylierung vergleichbar mit den Befunden in Wildtyp-Maus-Thrombozyten (Daten nicht gezeigt).

### 3.5 Yeast Two-Hybrid System zur Identifikation von Interaktions-partnern von Syk

Das Yeast Two-Hybrid System wurde eingesetzt, um Interaktionspartner des Proteins Syk zu identifizieren.

Die Syk kodierende Sequenz lag in Baculovirus (PacG2T Baculovirus Transfer Vector, humanes Syk kloniert als BamH1 Fragment; Geschenk Dr. S.P. Watson, Oxford) vor. Syk (wild type, full length) konnte erfolgreich in den *bait*-Vektor kloniert und im Hefestamm *S. cerevisiae* Y190 exprimiert werden (Abb. 36).



**Abb. 36: Expression von Syk im Hefestamm *S. cerevisiae* Y190**

Syk wurde in den DNA-bindenden Vektor pAS2-1 kloniert (*bait*). Es erfolgte eine chemische Transformation des Hefestamms *S. cerevisiae* Y190 mit dem Vektor und nach Inkubation der Nachweis von Syk mittels Western Blot. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei verschiedenen Transformationen. Bei Transformation 2 sind die Proteinextrakte von 4 verschiedenen Transformanten aufgetragen worden.

Anschließend wurde ein Screen mit einer menschlichen Knochenmarks-cDNA Bank (250 µg; Zahl der unabhängigen Klone:  $3,0 \times 10^6$ ) durchgeführt. Der Screen mit dem *bait*, pAS2-1, das Syk full-length enthielt, und der menschlichen Knochenmarks-cDNA Bank lieferte einen positiven Klon, welcher beim  $\beta$ -Galaktosidasetest blau wurde. Als Kontrolle dienten hierbei die Interaktionspartner GP3a und Endonexin. Eine Isolation des *prey* Plasmids und anschließende erneute Transformation konnte den positiven Befund jedoch nicht bestätigen. Desweiteren wurde ein Screen des *bait* Vektors pGBT9/Syk full-length in Y190 mit der menschlichen Knochenmarks-cDNA Bank (250 µg) unternommen. Auch dieser Versuch lieferte kein positives Ergebnis. Schließlich wurde eben genannter *bait* Vektor mit einer Mischung aus zwei cDNA-Banken gescreent: 200 µg menschliche Knochenmarks-cDNA-Bank und 175 µg fötale Leberzellen cDNA-Bank ( $2,0 \times 10^6$  unabhängige Klone). Dieser Screen lieferte zwei blaue Kolonien, die jedoch auch nicht verifiziert werden konnten.

Desweiteren wurde die Subklonierung der Kinase-inaktiven Syk-Mutante in den Vektor pGBT9 durchgeführt. Da die Umsetzung der Substrate durch die Kinase in der Regel sehr schnell erfolgt, reicht der Kontakt der interagierenden Proteine möglicherweise nicht aus, um die Transkription der  $\beta$ -Galaktosidase im Yeast Two-Hybrid System anzuschalten. Diese Schwierigkeit wird mit der Kinase-inaktiven Mutante umgangen. Sie enthält eine Mutation in der Kinase-Domäne des Proteins. Das Substrat wird zwar gebunden, aber nicht umgesetzt, woraus eine längere Kontaktzeit resultiert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ unabhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk während des *shape change*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivierung von Syk und dessen Regulation während des Formwandels, der Ausbreitung und Aggregation von humanen Thrombozyten untersucht. Dabei wurden Unterschiede gefunden, die in der Folge einzeln diskutiert werden.

Die Untersuchungen wurden an isolierten Thrombozyten durchgeführt. Die Expression der Tyrosinkinase Syk mittels Western Blot war in humanen Thrombozyten gut nachweisbar, während Syk in humanen Endothelzellen nicht gefunden wurde. Entgegen der beschriebenen Befunde konnte die Expression von Syk in Endothelzellen von der Arbeitsgruppe um Yamamura (Yanagi et al., 2001a) nachgewiesen werden. In dieser Untersuchung war Syk sowohl in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) als auch in BAECs (*bovine aortic endothelial cells*), wenn auch relativ schwach im Vergleich zu Wildtyp-Mausleberzellen, zu finden. Unter den in 3.1.1 beschriebenen Bedingungen mit dem verwendeten Antikörper war es nicht möglich, Syk in Endothelzellen zu detektieren. Eine Expression von Syk wurde auch in weiteren nicht-hämatopoetischen Zellen gezeigt, so z.B. in Fibroblasten, Epithelzellen, Brustgewebe, Hepatozyten und neuronalen Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß Syk funktionell wichtig ist für diese Zelltypen (Yanagi et al., 2001b). Tsuchida et al. berichten über die Rolle von Syk in menschlichen Hepatozyten durch dessen Beteiligung an einem Signalweg, der zur MAP-Kinase Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren führt (Tsuchida et al., 2000). Yanagi et al. vermuten, daß Syk in Endothelzellen eine wichtige regulatorische Funktion für die Organisation des Zytoskeletts hat (Yanagi et al., 2001a). Außerdem ist Syk bei der Differenzierung von embryonalen Karzinom-P19-Zellen im Maushirn beteiligt (Tsujumura et al., 2001).

Während des *shape change* in humanen Thrombozyten ausgelöst durch das Heptapeptid YFLLRNP oder durch mox-LDL werden die Proteine P62, P68 und P130 tyrosinphosphoryliert (Negrescu et al., 1995; Baumann-Siemons, 2000). In der vorliegenden

Arbeit wurde gezeigt, daß während des Formwandels, ausgelöst durch YFLLRNP und mox-LDL, auch Syk vermehrt an Tyrosin phosphoryliert wird.

Um Syk von möglichen anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen im Bereich 68 - 72 kDa abzugrenzen, war eine Immunpräzipitation von Syk notwendig. Die Immunpräzipitation zeigte tatsächlich, daß die im Western Blot von Thrombozytenlysaten bei 68 kDa laufende tyrosinphosphorylierte Proteinbande nicht mit Syk identisch ist. Da die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Syk nur nach vorheriger Immunpräzipitation nachweisbar war, war es wichtig, die Methode der Syk-Immunpräzipitation zu optimieren (s. 3.1.2). In diesen methodischen Versuchen wurden inter- und intraindividuelle Schwankungen der Expression von Syk festgestellt. Weiterhin wurden beim Vergleich von Experimenten mit Thrombozyten verschiedener Spender erhebliche Unterschiede der Syk-Tyrosinphosphorylierung in ruhenden Thrombozyten beobachtet (Abb. 4). Da die Syk-Tyrosinphosphorylierung in ruhenden Thrombozyten nicht konstant war, fiel die Stimulation der Syk-Tyrosinphosphorylierung während des *shape change* unterschiedlich aus. Schließlich war der Anstieg der Syk-Tyrosinphosphorylierung vor allem nach Stimulation mit mox-LDL sehr variabel. Dies könnte möglicherweise auf den unterschiedlichen Oxidationszustand von mox-LDL zurückzuführen sein und/oder auf die unterschiedliche Antwort der Thrombozytenpräparationen auf mox-LDL. Nach Thrombin-Rezeptor Aktivierung mittels YFLLRNP nahm die Syk-Tyrosinphosphorylierung um das 5,4-fache zu, während nach mox-LDL ein Anstieg um das 2,5-fache zu verzeichnen war (s. 3.2.1). Möglicherweise werden nach Thrombin-Rezeptor-Aktivierung mehr Signalwege als nach Stimulation mit mox-LDL aktiviert, so daß daraus eine stärkere Syk-Tyrosinphosphorylierung resultiert.

Auch Clark et al. stellen eine Aktivierung von Syk während der frühen Aktivierung von Thrombozyten fest (Clark et al., 1994). Wichtig ist zu beachten, daß in diesen Experimenten der *shape change* mit der Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen assoziiert war, während in den Studien unserer Arbeitsgruppe allein der *shape change* (ohne Sekretion) untersucht wurde. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben auch Gallet et al. die Aktivierung von Syk während des *shape change* ohne Sekretion (Gallet et al., 1999). Desweiteren fand diese Arbeitsgruppe eine Assoziation von Syk mit dem Zytoskelettprotein Cortactin nach Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptoraktivierung. Die Syk-Kinaseaktivierung und Tyrosinphosphorylierung von Cortactin korrelierten in ihrer Kinetik mit dem *shape change*. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß Cortactin möglicherweise ein Substrat von Syk

darstellt und wichtig für die Zytoskelettorganisation während des *shape change* ist. Diese Schlußfolgerung unterstützend beschrieben Maruyama et al. in der humanen leukämischen Zelllinie K562 nach Aktivierung die Translokation von Syk vom Zytosol zum Zytoskelett und die Tyrosinphosphorylierung von Cortactin durch Syk. Cortactin ist ein an F-Aktin bindendes Protein, das für die Reorganisation von Mikrofilamenten wichtig zu sein scheint (Maruyama et al., 1996).

Überraschenderweise zeigten die eigenen Versuche, daß Syk keine Rolle für die dem *shape change* zugrundeliegenden Zytoskelettveränderungen spielt. Syk(-/-) Maus-Thrombozyten zeigten bei den Lichttransmissionsmessungen im Aggregometer einen den Wildtyp-Maus-Thrombozyten vergleichbaren *shape change* und einen vergleichbaren Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 während des Formwandels. Syk ist also nicht für den *shape change* und den Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 während des Formwandels verantwortlich. Die Untersuchungen an Syk(-/-) Mäusen wurden durch Experimente mit humanen Thrombozyten unterstützt. Die Inkubation der Thrombozyten mit EGTA, welches das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  dissoziiert, aktivierte Syk, ohne eine Plättchenaktivierung zu induzieren (Negrescu und Siess, 1996 und Abb. 13 der vorliegenden Arbeit). Eine weitere Zugabe von YFLLRNP führte zum *shape change*, der aber keinen weiteren Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von Syk verursachte. Studien mit spezifischen Src-Kinase Hemmern und mit Fyn und Lyn defizienten Maus-Thrombozyten zeigten, daß die Tyrosinkinase der Src-Familie und die Phosphorylierung ihrer Substrate auch nicht funktionell in den *shape change* involviert sind (Bauer et al., 2001). Aus diesen Untersuchungen ist zu schließen, daß zwar Syk wie die Tyrosinkinase der Src-Familie während des *shape change* aktiviert werden, daß aber Syk und die Src-Kinasen keine Rolle für die Zytoskelettveränderungen während des *shape change* spielen.

Die Versuche mit dem vermeintlich spezifischen Hemmer der Syk-Tyrosinkinase Piceatannol zeigten eine dosisabhängige Reduzierung der Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130, aber keine Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von Syk. In einer früheren Untersuchung fanden Keely und Parise in Thrombozyten eine Hemmung der Syk-Tyrosinphosphorylierung und Kinaseaktivität durch Piceatannol, aber keinen Effekt auf die Src-Kinase Aktivität (Keely und Parise, 1996). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben Law et al. ebenfalls Probleme beim Einsatz von Piceatannol als Syk-selektiven Hemmer. Auch andere Kinasen wurden gehemmt, sogar bei sehr geringen Konzentrationen an

Piceatannol (Law et al., 1999). Da Piceatannol also nicht selektiv für die Tyrosinkinase Syk ist, ist es unbrauchbar für Funktionsuntersuchungen in Thrombozyten. Frühere Untersuchungen der Inhibierung des *shape change* durch "Breitband"-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Genistein oder Tyrphostin A23 (Negrescu et al., 1995), die in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurden (s. 3.2.3.3), zeigten, daß möglicherweise eine nicht-identifizierte Tyrosinkinase beim *shape change* beteiligt ist.

Was die Regulation der Syk-Aktivierung während des *shape change* betrifft, führten die Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen: Da die beiden strukturell nicht verwandten Src-Kinase Hemmstoffe PP1 und PD173956 die Aktivierung von Syk während des *shape change* induziert durch mox-LDL bzw. LPA komplett gehemmt haben (s. Abb. 16), liegt die Vermutung nahe, daß die Syk-Aktivierung sekundär zur Aktivierung der Kinasen der Src-Familie erfolgt. Eine Aktivierungskaskade von zunächst Src-Kinasen und anschließend Syk wurde bereits für die Kollagen-induzierte Signaltransduktion in Thrombozyten beschrieben (Poole et al., 1997; Briddon und Watson, 1999). Beim Kollagen-vermittelten Signalweg kommt es zur Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette durch Src-Familie Kinasen und zur Assoziation der FcR $\gamma$ -Kette mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk. Letzteres führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Syk. Während des *shape change* wurde die FcR $\gamma$ -Kette jedoch nicht vermehrt an Tyrosin phosphoryliert, was Coimmunpräzitationsstudien zeigten (s. 3.4.2.1). Daraus ist zu schließen, daß bei der Src-Kinase-abhängigen Stimulation von Syk während des *shape change* die FcR $\gamma$ -Kette nicht beteiligt ist.

YFLLRNP, welches zu einer Thrombinrezeptor-Aktivierung führt, aber weder Ca<sup>2+</sup> erhöht noch die Proteinkinase C aktiviert (Rasmussen et al., 1993; Bauer et al., 1999), führte zur Syk-Aktivierung während des *shape change*. Gleichmaßen induzieren in der Gegenwart von EGTA mox-LDL und niedrige Konzentrationen von LPA keine Erhöhung des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> in Thrombozyten, aber eine Syk-Aktivierung (Abb. 16 und Maschberger et al., 2000). Daraus ist zu schließen, daß weder ein Anstieg des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> noch die Proteinkinase C für die Syk-Aktivierung während des *shape change* verantwortlich sind. Dies unterstützend zeigten die Ergebnisse mit dem PKC-Hemmer Ro-31-8220, daß dieser während des *shape change* sowohl nach Stimulation mit YFLLRNP als auch mit mox-LDL die Syk-Tyrosinphosphorylierung nicht hemmte.

Untersuchungen zur Regulation der Syk-Aktivierung durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  ergaben, daß nach einer Vorbehandlung der Thrombozyten mit BAPTA-AM/EGTA, welches das basale zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  erniedrigt, der *shape change*, induziert durch mox-LDL und YFLLRNP, jedoch verzögert abläuft und reduziert ist. Desweiteren war die basale Tyrosinphosphorylierung von Syk erniedrigt und es kam auch nach Aktivierung zu keiner Erhöhung. Dies zeigt, daß normale basale Werte von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  (80 - 100 nM) erforderlich sind für eine Tyrosinphosphorylierung von Syk sowohl in ruhenden Thrombozyten als auch nach Stimulation mit mox-LDL und YFLLRNP. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen induzierte mox-LDL auch nach einer Behandlung mit BAPTA-AM/EGTA die Translokation von tyrosinphosphoryliertem P62, P68, P130, Src, Fyn und Syk zum Zytoskelett (s. 3.2.3.2). Die durch mox-LDL induzierte Translokation von tyrosinphosphorylierten Proteinen und Tyrosinkinase zum Zytoskelett und der durch Src-Kinasen vermittelte Anstieg der Proteintyrosinphosphorylierung sind somit unabhängig von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ . In einer früheren Studie wurde ebenfalls gefolgert, daß die Proteintyrosinphosphorylierung nicht sekundär zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach Plättchenstimulation mit LPA erfolgt (Torti et al., 1996). Ebenfalls wie die Syk-Tyrosinphosphorylierung erfordert der Rho/Rho-Kinase Signaltransduktionsweg, welcher über die Phosphorylierung der *myosin light chain* (MLC) zum *shape change* führt, für eine optimale Aktivität die Basalkonzentration von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in ruhenden Thrombozyten. Er wird jedoch nicht durch den Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  während des *shape change* reguliert (Bauer et al., 1999; Bauer, 2003).

Weiterhin zeigt die Arbeit, daß die Syk-Aktivierung während des *shape change* von dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  unabhängig ist. Dies ist zu erwarten, weil während des *shape change* kein Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  *outside-in signaling* erfolgt. Jedoch war zu Beginn der Arbeit die Frage offen, ob für die Wirkung von mox-LDL auf die Thrombozyten das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  wichtig ist. Andere Arbeitsgruppen hatten gefunden, daß in Thrombozyten LDL und ox-LDL mit hoher Affinität an spezifische Stellen binden, welche sich vom klassischen LDL-Rezeptor unterscheiden (Pedreno et al., 1992; Pedreno et al., 1994), und hatten die Glycoproteine IIb und IIIa (das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ) als Bindestellen für LDL auf Plättchenmembranen, aber nicht auf intakten Plättchen identifiziert (Koller et al., 1989; Pedreno et al., 1997). Eine neuere Studie zeigte, daß das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  bei der Thrombozytensensibilisierung durch LDL beteiligt ist (Hackeng et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden Plättchen von Patienten mit

Thrombasthenia Glanzmann, denen das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  fehlt, untersucht (s. 3.2.2). In diesen Thrombozyten war die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 und von Syk während des *shape change* vergleichbar zu der in Kontrollthrombozyten. Desweiteren war auch der *shape change* nach mox-LDL in Thrombasthenischen und normalen Plättchen ähnlich. Die gleichen Ergebnisse erhielt man auch nach Vorbehandlung von normalen humanen Thrombozyten mit RGDS, einem Fibrinogenrezeptor Antagonisten (s. 3.2.2). Daraus ist zu schließen, daß mox-LDL nicht über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  den Thrombozyten-*shape change*, die Proteintyrosinphosphorylierung und Syk stimuliert.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß mox-LDL über die Aktivierung des LPA-Rezeptors den *shape change* induziert. Vergleicht man die Wirkung von mox-LDL mit der von LPA, der aktiven Substanz in mox-LDL (Siess et al., 1999), so wurde festgestellt, daß mox-LDL und LPA einen ähnlichen Anstieg der Syk-Tyrosinphosphorylierung während des *shape change* hervorrufen (Abb. 16). Nach niedrigen Konzentrationen an LPA werden Src- und Syk-Tyrosinkinase während des *shape change* aktiviert, während nach hohen LPA Konzentrationen das zytosolische  $Ca^{2+}$  erhöht wird (Maschberger et al., 2000). Mox-LDL und hohe Konzentrationen an LPA induzieren hauptsächlich einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran und relativ wenig  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern, ein Befund, der ausschließlich für diese Stimuli zutrifft und für andere Agonisten nicht beobachtet wurde (Siess, 1989; Siess et al., 1999). Yang et al. fanden, daß LPA und Sphingosin 1-phosphat (S1-P) die Tyrosinphosphorylierung von Thrombozytenproteinen, darunter auch Syk, stimulieren und zur Syk-Aktivierung führen. Zu bemerken ist, daß hier sehr große Mengen an LPA, nämlich 40  $\mu$ M zur Stimulation eingesetzt wurden (Yang et al., 1996) im Vergleich zu nur 80 nM in unseren Versuchen. Auch Torti et al. zeigten die schnelle Tyrosinphosphorylierung von mehreren intrazellulären Proteinen inklusive Syk nach Plättchenaktivierung mit LPA (Torti et al., 1996). In keiner dieser Studien wurde die Aktivierung von Syk zu spezifischen Thrombozytenantworten korreliert.

Aus der Sicht des heutigen Standes der Forschung ist unklar, ob der Plättchen-LPA-Rezeptor zu den drei Siebentransmembranomänen-Rezeptoren für LPA (LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub>) gehört (Goetzl und An, 1998). Es liegt nahe zu spekulieren, daß die Aktivierung der zwei voneinander unabhängigen Signalwege, Src-Kinase und Syk-Aktivierung einerseits und zytosolische  $Ca^{2+}$ -Erhöhung andererseits, durch die Aktivierung von zwei verschiedenen LPA-Rezeptoren vermittelt wird. Alternativ könnte ein LPA-Rezeptor verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. So wurde gezeigt, daß ein LPA-Rezeptor an mehrere

heterotrimere G-Proteine wie  $G_i$  und  $G_q$  koppeln kann (Moolenaar et al., 1997). Analog zu Arbeiten in anderen Zelltypen könnten in Thrombozyten die Tyrosinkinase Src und Syk durch  $G_i$ -Aktivierung stimuliert werden, während die  $G_q$ -Aktivierung zu einer  $Ca^{2+}$ -Antwort führt. Tatsächlich wurde eine  $G_i$ -vermittelte Src-Kinase und Syk-Aktivierung in anderen Zelltypen wie Fibroblasten (Hordijk et al., 1994) und Avian B-Zellen (DT40 Zellen) (Wan et al., 1996) beschrieben. In Thrombozyten von  $G_q$ -defizienten Mäusen konnte die Aktivierung von Src-Familiencytosinkinase und Syk, unabhängig von einem zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg, beobachtet werden (Klages et al., 1999).

Welche mögliche Bedeutung hat nun die Syk Aktivierung während des *shape change*? Mittels des monoklonalen Antikörpers PAC-1, der spezifische Epitope der aktiven Konformation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf der Plättchenmembran erkennt, konnte festgestellt werden, daß während des *shape change* ein beträchtlicher Teil des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aktiviert wird. Desweiteren wurde gefunden, daß die Bindung von PAC-1 während des durch YFLLRNP induzierten *shape change* nach Vorbehandlung mit den Src-selektiven Hemmern vollständig unterdrückt war (Bauer et al., 2001 und Abb. 16). Diese Src-selektiven Hemmer inhibierten die Proteintyrosinphosphorylierung und die Aktivierung von Syk während des *shape change* (Bauer et al., 2001). Neben den Src-Kinasen, könnte also auch die Kinase Syk am Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *inside-out signaling* beteiligt sein. Dies unterstützend konnte gezeigt werden, daß Syk bei der Stimulus-induzierten Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Maus-Thrombozyten beteiligt ist. Versuche in Syk(-/-) Maus-Thrombozyten, in denen die Aktivierbarkeit des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  über die Bindung von FITC-gekoppeltem Fibrinogen gemessen wurde, zeigten, daß die Fibrinogenbindung nach Stimulation mit ADP  $\pm$  Epinephrin im Vergleich zu Kontrollthrombozyten erniedrigt war (Law et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen die Resultate, daß die Aktivierung von Syk während des raschen Formwandels der Thrombozyten über einen Mechanismus, der abhängig von der Aktivierung von Src-Kinasen, aber ohne Beteiligung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und unabhängig von der ITAM-Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette erfolgt. Für den *shape change* selbst hat Syk jedoch keine Funktion, es könnte jedoch für die Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wichtig sein, welche für die sich an den Formwandel anschließende Thrombozyten-Aggregation bzw. -Ausbreitung (*spreading*) wichtig ist.

## 4.2 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängige Tyrosinphosphorylierung von Syk

Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelt die Thrombozytenaggregation und das *spreading* in vaskulären Wunden durch Interaktionen mit löslichen oder Matrix-assoziierten Liganden. Diese Funktionen kommen bei der Hämostase und bei der arteriellen Thrombose zum Tragen.

Die Untersuchungen der Arbeit zeigten, daß die Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Thrombin-aggregierten Thrombozyten die Stimulierung eines ähnlichen Signalwegs bewirkt wie die Aktivierung des Glykoproteins VI durch Kollagen: es wurde eine Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette durch Src-Familie Kinasen gefunden. Diese bewirkt eine Assoziation der FcR $\gamma$ -Kette mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk, was zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Syk führt, und in der Folge zur Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C $\gamma_2$ . RGDS, welches die Bindung von Fibrinogen und anderen Liganden an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  blockiert, inhibierte die Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette komplett, ebenso deren Assoziation mit Syk, und reduzierte drastisch die Tyrosinphosphorylierung von Syk und PLC $\gamma_2$  in Thrombin-stimulierten Thrombozyten. Zwei strukturell unterschiedliche spezifische Hemmer der Tyrosinkinase der Src-Familie (PP1 und PD173956) führten zu einer Reduktion der Tyrosinphosphorylierung von Syk und einer kompletten Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette in Thrombin-aggregierten Thrombozyten. Die Bedeutung der FcR $\gamma$ -Kette für die Stimulation der Syk-Tyrosinphosphorylierung in Thrombin-aggregierten Thrombozyten wird durch eine Studie von Poole et al. unterstützt. Diese fanden, daß die Syk-Tyrosinphosphorylierung in FcR $\gamma$ -Ketten-defizienten Maus-Thrombozyten stark reduziert war, wenn sie mit niedrigen Thrombinkonzentrationen aggregiert wurden (Poole et al., 1997).

Es zeigte sich weiter, daß dieser durch das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelte Signalweg funktionell für die Thrombozytenaggregation induziert durch niedrige Thrombinkonzentrationen relevant ist. Diese Schlußfolgerungen beruhen auf den Ergebnissen mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 und den Studien an FcR $\gamma$ -Ketten- und Syk-defizienten Mausthrombozyten, welche eine Verminderung der Plättchenaggregation nach Stimulation mit niedrigen Thrombinkonzentrationen zeigten. Die Inhibierung der Thrombozytenaggregation war nach der Vorbehandlung der Thrombozyten mit den Src-Kinase Inhibitoren stärker als in FcR $\gamma$ -Ketten- oder Syk-defizienten Mäusen. Das liegt

möglicherweise daran, daß Src-Kinasen auch unabhängig von Syk bei dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *inside-out signaling* und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *outside-in signaling* beteiligt sind. Src Kinasen wie Src selbst und Lyn sind konstitutiv mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Thrombozyten assoziiert (Dorahy et al., 1995; Oberfell et al., 2002). Eine derartige Assoziation könnte die Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelte Aktivierung von Src-Kinasen bewirken sowie die anschließende Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette.

Im Unterschied zu älteren Veröffentlichungen (Blake et al., 1994; Poole et al., 1997) ergaben die Untersuchungen der Arbeit eine eindeutige Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 in Thrombin-stimulierten Thrombozyten. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen erklärt werden. In den genannten Studien wurden die Experimente ohne Aggregation durchgeführt (kein Rühren), was in der vorliegenden Arbeit auch zu keiner Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette führte. Die Thrombozytenaggregation war Voraussetzung für einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette. Wonerow et al. berichten über eine Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Stimulation der PLC $\gamma$ 2 Tyrosinphosphorylierung in Thrombozyten, welche auf Fibrinogen adhärerten (Wonerow et al., 2002). Die Kinasen (Kinase), welche die PLC $\gamma$ 2 in stimulierten Thrombozyten tyrosinphosphorylieren, sind nicht bekannt. In Kollagen-stimulierten Thrombozyten scheint Syk die verantwortliche Kinase zu sein, da die PLC $\gamma$ 2 in Syk-defizienten Mausthrombozyten nach Stimulation mit Kollagen nicht tyrosinphosphoryliert wird (Poole et al., 1997). Jedoch kann Syk im Gegensatz zu Src-Kinasen die PLC $\gamma$ 2 nicht *in vitro* tyrosinphosphorylieren (Rodriguez et al., 2001).

Der gleiche Signalweg wie nach Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Thrombin-aggregierten Thrombozyten wurde durch eine längere Behandlung der Thrombozyten mit EGTA beobachtet. Die durch das EGTA induzierte Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Dissoziation bewirkte ebenfalls eine Src-Kinasen vermittelte FcR $\gamma$ -Ketten Tyrosinphosphorylierung, deren Assoziation mit tyrosinphosphoryliertem Syk sowie eine vermehrte Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 2. Allerdings wird durch die Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Dissoziation keine Thrombozytenaktivierung verursacht (Negrescu und Siess, 1996). Die Aktivierung dieses Signalwegs allein ist also noch nicht ausreichend, um eine physiologische Antwort zu induzieren. Ein *silent pathway* von der Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette zu Syk und der PLC $\gamma$ 2 wurde kürzlich auch in Thrombozyten nach Aktivierung des Glykoproteins Ib von einigen, aber nicht allen

Arbeitsgruppen beschrieben (Falati et al., 1999, Wu et al., 2001, Marshall et al., 2002). Auch in Lymphozyten wurde ein *silent pathway* der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 beobachtet (Fluckiger et al., 1998). Erklärt wird die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 2 in Abwesenheit einer Zellaktivierung durch eine Studie, die zeigt, daß die Tyrosinphosphorylierung nur bestimmter, spezifischer Tyrosinreste der PLC $\gamma$ 2 notwendig ist, um eine Aktivierung des Enzyms zu verursachen (Ozdener et al., 2002).

Die Beobachtungen in Thrombozyten stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen in CHO-Zellen, welche stabil mit dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  und transient mit Syk transfiziert wurden (Gao et al., 1997). In diesem Zellmodell wurde eine von ITAMs unabhängige Aktivierung von Syk durch das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  gefunden. Der Unterschied der beiden Studien liegt vor allem an den zwei verschiedenen Zelltypen, die untersucht wurden: zum einen Thrombozyten mit der physiologischen Expression an Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , FcR $\gamma$ -Kette und Syk gegenüber den transfizierten CHO-Zellen mit möglicherweise überexprimierter Menge an Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  und Syk, und unbekanntem Mengen an ITAM enthaltenden Proteinen. Im Modellsystem CHO-Zellen konnte klar gezeigt werden, daß Syk nach Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Stimulierung über einen ITAM-unabhängigen Weg aktiviert werden kann. Möglicherweise hängt die Regulation der Syk-Aktivierung in stimulierten Thrombozyten vom Ausmaß der Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Aktivierung ab: eine schwache Aktivierung nach Stimulation der Aggregation mit niedrigen Thrombin-Konzentrationen führt zu einer funktionell relevanten ITAM-abhängigen Aktivierung von Syk, während eine starke Aktivierung zur Syk-Aktivierung (z.B. *spreading*, siehe Diskussion im folgenden) unabhängig von tyrosinphosphorylierten ITAMs in der FcR $\gamma$ -Kette führen könnte.

Das *spreading*, welches im Anschluß an den *shape change* erfolgt, ist essentiell für die Adhäsion von Thrombozyten an geschädigtes Endothel. Während der *shape change* unabhängig vom Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  erfolgt, erfordert das *spreading* die Anwesenheit und das *signaling* über das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Die Ergebnisse der Arbeit und anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß das *spreading* Src-Familie Kinasen und die Tyrosinkinase Syk involviert.

Zellbiologische Analysen in der vorliegenden Arbeit ergaben, daß Syk in adhärierenden, ausgebreiteten Thrombozyten sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran lokalisiert war. Hier war teilweise eine Colokalisation mit dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  erkennbar. Untersuchungen von auf Fibrinogen ausgebreiteten CHO-Zellen zeigten eine Colokalisation

von Syk und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der frühen Phase, jedoch nicht in der Spätphase des *spreading*. In aggregierenden und adhärenen, ausgebreiteten Thrombozyten sowie in CHO-Zellen ist Syk ein proximales Glied in der Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  abhängigen Signaltransduktionskette.

Außerdem zeigte sich in eigenen Versuchen eine vermehrte Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette während des *spreading* von humanen Thrombozyten, was eine anschließende Assoziation an die Tandem-SH2-Domäne von Syk und damit eine Syk-Aktivierung ermöglichen kann. Bei der Vorbehandlung von humanen Thrombozyten mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 waren sowohl das *spreading* partiell gehemmt als auch die Proteintyrosinphosphorylierung reduziert. Die Src-Kinasen sind somit für die Thrombozytenausbreitung erforderlich. In mehreren erst kürzlich veröffentlichten Artikeln wurden Ergebnisse zum Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Signalweg in Thrombozyten, die sich auf immobilisiertem Fibrinogen ausbreiteten (*spreading*), dargestellt. Unter diesen Bedingungen, unter welchen das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *outside-in signaling* maximal stimuliert ist, wurde ein Signalweg gefunden, welcher die Aktivierung der Kinase Src, welche konstitutiv an das  $\beta_3$ -Integrin gebunden ist, bewirkt. Anschließend wird Syk an das  $\beta_3$ -Integrin gebunden und aktiviert (Oberfell et al., 2002). Tatsächlich kann die N-terminale SH2-Domäne von Syk direkt an den zytoplasmatischen Teil des  $\beta_3$ -Integrins binden (Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002). Allerdings waren in Untersuchungen von Law et al. keine Unterschiede in der Adhäsion von Syk-defizienten zu Wildtyp-Mausthrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen feststellbar, woraus zu schließen ist, daß die Tyrosinkinase Syk für das *spreading* nicht erforderlich ist (Law et al., 1999).

Mit dem Yeast Two-Hybrid System sollten Interaktionspartner der Tyrosinkinase Syk ermittelt werden. Das Projekt wurde in den Labors von S.J. Shattil, La Jolla, USA begonnen. Das Protein Syk konnte in Hefe exprimiert werden und es wurden eine Knochenmarks-cDNA-Bank sowie eine fötale Leberzellen-cDNA-Bank nach möglichen Interaktionspartnern gescreent. Es konnten jedoch keine positiven Klone identifiziert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Resultate zum ersten Mal zeigen, daß Integrine nach Aktivierung über einen ITAM-abhängigen *pathway* Signale an die Syk-Kinase und PLC $\gamma$ 2 weiterleiten, welcher dem Signalweg von Immunrezeptoren in Lymphozyten und Monozyten, und dem des Kollagenrezeptors in Thrombozyten ähnlich ist. Die Aktivierung von Syk nach Integrin-Aktivierung wurde auch in anderen hämatopoetischen Zellen

(Lymphozyten, Monozyten, Myeloidzellen und Neutrophilen) beschrieben. Hier wurde eine Funktion von Syk bei der Adhäsion, dem *spreading*, bei zytoskelettalen Veränderungen und für die NF-kappa B Aktivierung gefunden (Lin et al., 1995; Gotoh et al., 1997; Yan et al., 1997; Miller et al., 1999; Stupack et al., 1999; Yan et al., 1999). Es ist möglich, daß die Adhäsion von Matrixproteinen und die Aktivierung von  $\beta_1$ -Integrinen und  $\beta_2$ -Integrinen in diesen Zellen zur Syk-Aktivierung über einen Mechanismus führt, welcher von der Tyrosinphosphorylierung von ITAMs abhängig ist.

### 4.3 Perspektive

Oxidativ modifiziertes LDL, vor allem mm-LDL oder mox-LDL, könnte über ähnliche Mechanismen, wie in der vorliegenden Arbeit für Thrombozyten gezeigt wurde, auch andere Zellen wie Monozyten, Endothelzellen oder glatte Muskelzellen stimulieren, welche bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielen. Die Beobachtung, daß Genistein den *shape change* und die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von Syk induziert durch mox-LDL hemmt, könnte eine mögliche Relevanz für eine diätetische Prävention arteriosklerotischer Erkrankungen haben. Genistein ist ein natürlicher "Breitband"-Inhibitor von Tyrosinkinase und gehört zu den Isoflavonoiden, die vor allem in Soja in hoher Konzentration vorhanden sind. So wurde bei Untersuchungen von Japanern nach sojareicher Diät eine 30-fach höhere Ausscheidung von Genistein im Vergleich zu Menschen mit Normalkost nachgewiesen (Gooderham et al., 1996). Genistein ist ein kompetitiver Inhibitor von Adenosintriphosphat (ATP) in Kinasereaktionen und wirkt nicht-kompetitiv mit dem Proteinsubstrat. Da die ATP-Bindungsdomäne unter allen Tyrosinkinase sehr stark konserviert ist, wirkt Genistein nicht auf eine spezifische Tyrosinkinase. Eine Alternative zu Genistein stellen synthetische Tyrophostine (tyrosine phosphorylation inhibitors) wie z.B. Tyrphostin A23 und A47 dar. Dies sind Tyrosinkinase-Hemmer, die in Konkurrenz mit dem Proteinsubstrat treten. Inhibitoren von Tyrosinkinase wie das natürlich vorkommende Isoflavonoid Genistein oder synthetische Tyrophostine könnten die pathologische Überstimulation von Zellen durch oxidativ modifiziertes LDL erniedrigen.

## 5. Zusammenfassung

Oxidativ modifiziertes *low-density lipoprotein* (LDL) und Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Thrombozytenaktivierung führt abhängig von der Art der Stimulation zu einer raschen Formänderung (*shape change*), Ausbreitung (*spreading*) oder zur Aggregation begleitet von einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von Tyrosinkinase und deren Aktivierung. Die Untersuchung der Regulation und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk stand in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt.

Milde oxidiertes LDL (mox-LDL) führt zum *shape change*. Dabei werden zwei unabhängige Signalwege, zum einen die Tyrosinphosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 sowie der Tyrosinkinase Syk und zum anderen die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung durch einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom stimuliert. Desweiteren kommt es zur Translokation von Fyn und Syk zum Aktin-reichen Zytoskelett. Wie in der Diskussion ausgeführt, erfolgt die Stimulation dieser Signalwege über die Aktivierung des LPA-Rezeptors, mit LPA als der aktiven Substanz im mox-LDL. Das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  war in die Stimulation dieser frühen Signaltransduktionswege durch mox-LDL nicht involviert. Die Stimulation der Proteintyrosinphosphorylierung und Syk-Aktivierung wurde durch die Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein und Tyrphostin A23 und zwei spezifische Inhibitoren der Src-Familie Kinasen PP1 und PD173956 gehemmt. Im Gegensatz zu PP1 und PD173956 unterdrückten Genistein und Tyrphostin A23 auch den *shape change* durch mox-LDL. Die Aktivierung von Syk während des raschen Formwandels der Thrombozyten erfolgt über einen Mechanismus, der abhängig von der Aktivierung von Src-Tyrosinkinase, aber unabhängig vom Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  und von der ITAM-Tyrosinphosphorylierung der  $\text{Fc}\gamma$ -Kette ist. Für die Zytoskelettveränderungen, die dem *shape change* zugrunde liegen, spielt die Syk-Aktivierung keine Rolle. Die Syk-Aktivierung während des Formwandels könnte jedoch für die Aktivierung des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  wichtig sein, welche für die anschließende Thrombozyten-Aggregation bzw. -Ausbreitung (*spreading*) wichtig ist.

Die Aktivierungsmechanismen von Syk während *shape change* und Aggregation waren unterschiedlich. In Thrombin-aggregierten Thrombozyten war die Syk-Aktivierung von dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  abhängig. Hier zeigten die Untersuchungen der Arbeit, daß die Aktivierung des

Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die Stimulierung eines ähnlichen Signalwegs bewirkt wie die Aktivierung des Glykoproteins VI durch Kollagen: Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette durch Src-Familie Kinasen  $\rightarrow$  Assoziation der FcR $\gamma$ -Kette mit der Tandem-SH2-Domäne von Syk  $\rightarrow$  Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Syk  $\rightarrow$  Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C $\gamma$ 2. Es zeigte sich weiter, daß dieser durch das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelte Signalweg funktionell für die Thrombozytenaggregation, induziert durch niedrige Thrombinkonzentrationen, relevant ist. Diese Schlußfolgerungen beruhen auf den Ergebnissen mit den Src-Kinase Inhibitoren PP1 und PD173956 und den Studien an FcR $\gamma$ -Ketten- und Syk-defizienten Maus-Thrombozyten, welche eine Verminderung der Plättchenaggregation nach Stimulation mit niedrigen Thrombinkonzentrationen zeigten. Der gleiche Signalweg wie nach Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Thrombin-aggregierten Thrombozyten wurde durch Dissoziation des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mittels EGTA beobachtet. Allerdings bewirkte die Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Dissoziation keine Thrombozytenaktivierung, woraus zu schliessen ist, daß die Stimulierung dieses Signalwegs (Src-Kinasen Aktivierung  $\rightarrow$  Tyrosinphosphorylierung der FcR $\gamma$ -Kette  $\rightarrow$  Syk- und PLC $\gamma$ 2-Tyrosinphosphorylierung) nicht ausreicht, um Thrombozyten physiologisch zu aktivieren.

Die Resultate zeigen zum ersten Mal, daß Integrine nach Aktivierung über einen ITAM-abhängigen *pathway* Signale an die Syk-Kinase und PLC $\gamma$ 2 weiterleiten, welcher dem Signalweg von Immunrezeptoren in Lymphozyten und Monozyten, und dem des Kollagenrezeptors in Thrombozyten ähnlich ist.

## 6. Literaturverzeichnis

Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H. and Shattil, S. J. (2003) Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 100, 13298-13302.

Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A. and Roifman, C. M. (1994) Defective T cell receptor signaling and CD8<sup>+</sup> thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76, 947-958.

Asselin, J., Gibbins, J. M., Achison, M., Lee, Y. H., Morton, L. F., Farndale, R. W., Barnes, M. J. and Watson, S. P. (1997) A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C $\gamma$ 2 in platelets independent of the integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Blood* 89, 1235-1242.

Avogaro, P., Cazzolato, G. and Bittolo-Bon, G. (1991) Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis* 91, 163-171.

Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J. I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S. P. and Siess, W. (1999) Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 94, 1665-1672.

Bauer, M., Maschberger, P., Quek, L., Briddon, S. J., Dash, D., Weiss, M., Watson, S. P. and Siess, W. (2001) Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin alphaIIb beta3 inside-out signalling during shape change. *Thromb.Haemost.* 85, 331-340.

Bauer, M. (2003) Funktion der Kinasen der Src-Familie, der Tyrosinkinase Btk, sowie der Rho-abhängigen Kinase für die frühe Plättchenaktivierung. Dissertation, LMU München.

Baumann-Siemons, J. (2000) Milde oxidiertes LDL stimuliert die Proteintyrosinphosphorylierung während des Gestaltwandels menschlicher Thrombozyten. Dissertation, LMU München.

Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D. and Lusis, A. J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91, 2488-2496.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Blake, R. A., Schieven, G. L. and Watson, S. P. (1994) Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett.* 353, 212-216.

Bobe, R., Wilde, J. I., Maschberger, P., Venkateswarlu, K., Cullen, P. J., Siess, W. and Watson, S. P. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of phospholipase Cgamma2 in mouse megakaryocytes is independent of Bruton tyrosine kinase translocation. *Blood* 97, 678-684.

BORN, G. V. and CROSS, M. J. (1963) Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature* 197:974-6., 974-976.

Bridson, S. J. and Watson, S. P. (1999) Evidence for the involvement of p59<sup>fyn</sup> and p53/56<sup>lyn</sup> in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochem.J.* 338, 203-209.

Cantrell, D. (1998) The real LAT steps forward. *Trends Cell Biol.* 8, 180-182.

Chacko, G. W., Duchemin, A. M., Coggeshall, K. M., Osborne, J. M., Brandt, J. T. and Anderson, C. L. (1994) Clustering of the platelet Fc gamma receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72syk. *J.Biol.Chem.* 269, 32435-32440.

Chan, A. C., Pritchard, E. T., Gerrard, J. M., Man, R. Y. and Choy, P. C. (1982) Biphasic modulation of platelet phospholipase A2 activity and platelet aggregation by mepacrine (quinacrine). *Biochim.Biophys.Acta* 713, 170-172.

Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D. and Weiss, A. (1991) The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a

70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 88, 9166-9170.

Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. and Weiss, A. (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.

Clark, E. A., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Bolen, J. and Brugge, J. S. (1994) Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *J.Biol.Chem.* 269, 28859-28864.

Clark, E. A. and Brugge, J. S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.

Coffey, M. D., Cole, R. A., Colles, S. M. and Chisolm, G. M. (1995) In vitro cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxy, lipid, and peroxy radicals. *J.Clin.Invest.* 96, 1866-1873.

Coughlin, S. R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258-264.

Couture, C., Deckert, M., Williams, S., Russo, F. O., Altman, A. and Mustelin, T. (1996) Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck. *J Biol.Chem* 271, 24294-24299.

Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T. and Altman, A. (1996) Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 5, 591-604.

Dorahy, D. J., Berndt, M. C. and Burns, G. F. (1995) Capture by chemical crosslinkers provides evidence that integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  forms a complex with protein tyrosine kinases in intact platelets. *Biochem.J.* 309, 481-490.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7, 555-569.

El Hillal, O., Kurosaki, T., Yamamura, H., Kinet, J. P. and Scharenberg, A. M. (1997) syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 94, 1919-1924.

Ezumi, Y., Takayama, H. and Okuma, M. (1995) Differential regulation of protein-tyrosine phosphatases by integrin alpha IIb beta 3 through cytoskeletal reorganization and tyrosine phosphorylation in human platelets. *J.Biol.Chem.* 270, 11927-11934.

Falati, S., Edmead, C. E. and Poole, A. W. (1999) Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. *Blood* 94, 1648-1656.

Falk, E., Shah, P. K. and Fuster, V. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657-671.

Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., Weng, D., Shah, P. K. and Badimon, L. (1994) Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J.Am.Coll.Cardiol.* 23, 1562-1569.

Ferrell, J. E., Jr., Noble, J. A., Martin, G. S., Jacques, Y. V. and Bainton, D. F. (1990) Intracellular localization of pp60c-src in human platelets. *Oncogene* 5, 1033-1036.

Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 20;340, 245-246.

Fluckiger, A. C., Li, Z., Kato, R. M., Wahl, M. I., Ochs, H. D., Longnecker, R., Kinet, J. P., Witte, O. N., Scharenberg, A. M. and Rawlings, D. J. (1998) Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> following B-cell receptor activation. *EMBO J.* 17, 1973-1985.

Gallet, C., Rosa, J. P., Habib, A., Lebret, M., Levy-Toledano, S. and Maclouf, J. (1999) Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J.Biol.Chem.* 274, 23610-23616.

- Gao, J., Zoller, K. E., Ginsberg, M. H., Brugge, J. S. and Shattil, S. J. (1997) Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J* 16, 6414-6425.
- Gibbins, J., Asselin, J., Farndale, R., Barnes, M., Law, C. L. and Watson, S. P. (1996) Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J.Biol.Chem.* 271, 18095-18099.
- Goetzl, E. J. and An, S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* 12, 1589-1598.
- Golden, A., Nemeth, S. P. and Brugge, J. S. (1986) Blood platelets express high levels of the pp60c-src-specific tyrosine kinase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 83, 852-856.
- Golden, A. and Brugge, J. S. (1989) Thrombin treatment induces rapid changes in tyrosine phosphorylation in platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 86, 901-905.
- Gooderham, M. H., Adlercreutz, H., Ojala, S. T., Wahala, K. and Holub, B. J. (1996) A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr* 126, 2000-2006.
- Gotoh, A., Takahira, H., Geahlen, R. L. and Broxmeyer, H. E. (1997) Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells. *Cell Growth Differ.* 8, 721-729.
- Hackeng, C. M., Huigsloot, M., Pladet, M. W., Nieuwenhuis, H. K., van Rijn HJ and Akkerman, J. W. (1999) Low-density lipoprotein enhances platelet secretion via integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated signaling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 239-247.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. and Connelly, P. A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation.

*J.Biol.Chem.* 271, 695-701.

Hers, I., Donath, J., van Willigen, G. and Akkerman, J. W. (1998) Differential involvement of tyrosine and serine/threonine kinases in platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 exposure.

*Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18, 404-414.

Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F. and Collen, D. (1998) Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98, 1487-1494.

Hordijk, P. L., Verlaan, I., van Corven, E. J. and Moolenaar, W. H. (1994) Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J.Biol.Chem.* 269, 645-651.

Hornstein, I., Alcover, A. and Katzav, S. (2004) Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal.* 16, 1-11.

Hughes, H., Mathews, B., Lenz, M. L. and Guyton, J. R. (1994) Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic smooth muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arterioscler.Thromb.* 14, 1177-1185.

Ichinohe, T., Takayama, H., Ezumi, Y., Arai, M., Yamamoto, N., Takahashi, H. and Okuma, M. (1997) Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* 272, 63-68.

Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Salem, H. H. and Cooray, P. (1996) Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb.Haemost.* 76, 640-650.

Jennings, L. K., Fox, J. E., Edwards, H. H. and Phillips, D. R. (1981) Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J.Biol.Chem.* 256,

6927-6932.

Keely, P. J. and Parise, L. V. (1996) The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol.Chem* 271, 26668-26676.

Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E. and Siraganian, R. P. (1996) Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol.Cell Biol.* 16, 1471-1478.

Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. and Offermanns, S. (1999) Activation of G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub> results in shape change and Rho/Rho-kinase- mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J.Cell Biol.* 144, 745-754.

Koller, E., Koller, F. and Binder, B. R. (1989) Purification and identification of the lipoprotein-binding proteins from human blood platelet membrane. *J.Biol.Chem.* 264, 12412-12418.

Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H. and Cambier, J. C. (1995) Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med.* 182, 1815-1823.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Law, C. L., Sidorenko, S. P., Chandran, K. A., Draves, K. E., Chan, A. C., Weiss, A., Edelhoff, S., Disteche, C. M. and Clark, E. A. (1994) Molecular cloning of human Syk. A B cell protein-tyrosine kinase associated with the surface immunoglobulin M-B cell receptor complex. *J Biol.Chem* 269, 12310-12319.

Law, C. L., Chandran, K. A., Sidorenko, S. P. and Clark, E. A. (1996) Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol.Cell Biol.* 16, 1305-1315.

Law, D. A., Nannizzi-Alaimo, L., Ministri, K., Hughes, P. E., Forsyth, J., Turner, M., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Tybulewicz, V. L. and Phillips, D. R. (1999) Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Blood* 93, 2645-2652.

Leong, L., Hughes, P. E., Schwartz, M. A., Ginsberg, M. H. and Shattil, S. J. (1995) Integrin signaling: roles for the cytoplasmic tails of alpha IIb beta 3 in the tyrosine phosphorylation of pp125FAK. *J.Cell Sci.* 108, 3817-3825.

Lin, T. H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J. B., Haskill, S. and Juliano, R. L. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* 270, 16189-16197.

Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal.Biochem.* 87, 206-210.

Marshall, S. J., Asazuma, N., Best, D., Wonerow, P., Salmon, G., Andrews, R. K. and Watson, S. P. (2002) Glycoprotein IIb-IIIa-dependent aggregation by glycoprotein Ibalpha is reinforced by a Src family kinase inhibitor (PP1)-sensitive signalling pathway. *Biochem.J.* 361, 297-305.

Maruyama, S., Kurosaki, T., Sada, K., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. and Yamamura, H. (1996) Physical and functional association of cortactin with Syk in human leukemic cell line K562. *J Biol.Chem* 271, 6631-6635.

Maschberger, P., Bauer, M., Baumann-Siemons, J., Zangl, K. J., Negrescu, E. V., Reininger, A. J. and Siess, W. (2000) Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca<sup>2+</sup> influx in human platelets. *J.Biol.Chem.* 275, 19159-19166.

Meraji, S., Moore, C. E., Skinner, V. O. and Bruckdorfer, K. R. (1992) The importance of oxidation or glycosylation of low-density lipoproteins in relation to platelet activation.

*Platelets* 3, 155-162.

Miller, L. A., Hong, J. J., Kinch, M. S., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L. (1999) The engagement of beta1 integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and beta1 integrin. *Eur.J.Immunol.* 29, 1426-1434.

Miranti, C. K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J. S. and Shattil, S. J. (1998) Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr.Biol.* 8, 1289-1299.

Moolenaar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R. and Zondag, G. C. (1997) Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 168-173.

Negrescu, E. V., Lubert de Quintana, K. and Siess, W. (1995) Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation of novel protein substrates through an integrin- and  $Ca^{2+}$ -independent mechanism. *J.Biol.Chem.* 270, 1057-1061.

Negrescu, E. V. and Siess, W. (1996) Dissociation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin by EGTA stimulates the tyrosine kinase pp72<sup>syk</sup> without inducing platelet activation. *J.Biol.Chem.* 271, 26547-26553.

Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S. L., Brugge, J. S., Lowell, C. A. and Shattil, S. J. (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with  $[\alpha]_{IIb}[\beta]_3$  initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J.Cell Biol.* 157, 265-275.

Ota, Y. and Samelson, L. E. (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276, 418-420.

Ozdener, F., Dangelmaier, C., Ashby, B., Kunapuli, S. P. and Daniel, J. L. (2002) Activation of phospholipase Cgamma2 by tyrosine phosphorylation. *Mol.Pharmacol* 62, 672-679.

Parhami, F., Fang, Z. T., Fogelman, A. M., Andalibi, A., Territo, M. C. and Berliner, J. A.

(1993) Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J.Clin.Invest.* 92, 471-478.

Pedreno, J., de Castellarnau, C., Cullare, C., Sanchez, J., Gomez-Gerique J., Ordonez-Lianos, J. and Gonzalez-Sastre, F. (1992) LDL binding sites on platelets differ from the "classical" receptor of nucleated cells. *Arterioscler.Thromb.* 12, 1353-1362.

Pedreno, J., de Castellarnau, C., Cullare, C., Ortin, R., Sanchez, J. L., Llopart, R. and Gonzalez-Sastre F. (1994) Platelet LDL receptor recognizes with the same apparent affinity both oxidized and native LDL. Evidence that the receptor-ligand complexes are not internalized. *Arterioscler.Thromb.* 14, 401-408.

Pedreno, J., Fernandez, R., Cullare, C., Barcelo, A., Elorza, M. A. and de Castellarnau, C. (1997) Platelet integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) is not implicated in the binding of LDL to intact resting platelets. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17, 156-163.

Perlmutter, R. M. (1994) Immunodeficiency. Zapping T-cell responses. *Nature* 370, 249-250.

Poole, A., Gibbins, J. M., Turner, M., van Vugt, M. J., van de Winkel, J. G., Saito, T., Tybulewicz, V. L. and Watson, S. P. (1997) The Fc receptor  $\gamma$ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 16, 2333-2341.

Rasmussen, U. B., Gachet, C., Schlesinger, Y., Hanau, D., Ohlmann, P., Van-Obberghen-Schilling, E., Pouyssegur, J., Cazenave, J. P. and Pavirani, A. (1993) A peptide ligand of the human thrombin receptor antagonizes alpha-thrombin and partially activates platelets. *J.Biol.Chem.* 268, 14322-14328.

Rezaul, K., Yanagi, S., Sada, K., Taniguchi, T. and Yamamura, H. (1994) Protein-tyrosine kinase p72syk is activated by platelet activating factor in platelets. *Thromb.Haemost.* 72, 937-941.

Rodriguez, R., Matsuda, M., Perisic, O., Bravo, J., Paul, A., Jones, N. P., Light, Y., Swann, K., Williams, R. L. and Katan, M. (2001) Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. *J.Biol.Chem.* 276, 47982-47992.

Ross, R. and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N.Engl.J Med.* 295, 369-377.

Ross, R. and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N.Engl.J Med.* 295, 420-425.

Ross, R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N.Engl.J Med.* 20;314, 488-500.

Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.

Ross, R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 340, 115-126.

Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R. and Bolen, J. B. (1995) Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* 270, 11590-11594.

Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166, 368-379.

Schiestl, R. H., Dominska, M. and Petes, T. D. (1993) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Mol Cell Biol* 13, 2697-2705.

Schulz, T., Schifffl, H., Scheithe, R., Hrboticky, N. and Lorenz, R. (1995) Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 25, 564-571.

Sevanian, A., Bittolo, B. G., Cazzolato, G., Hodis, H., Hwang, J., Zamburlini, A., Maiorino, M. and Ursini, F. (1997) LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein.

*J.Lipid Res.* 38, 419-428.

Shattil, S. J. and Brass, L. F. (1987) Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol.Chem* 262, 992-1000.

Shattil, S. J., Cunningham, M., Wiedmer, T., Zhao, J., Sims, P. J. and Brass, L. F. (1992) Regulation of glycoprotein IIb-IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J Biol.Chem* 267, 18424-18431.

Shattil, S. J., O'Toole, T., Eigenthaler, M., Thon, V., Williams, M., Babior, B. M. and Ginsberg, M. H. (1995) Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol.* 131, 807-816.

Shattil, S. J. and Ginsberg, M. H. (1997) Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 100, 1-5.

Shattil, S. J., Kashiwagi, H. and Pampori, N. (1998) Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91, 2645-2657.

Sidorenko, S. P., Law, C. L., Chandran, K. A. and Clark, E. A. (1995) Human spleen tyrosine kinase p72Syk associates with the Src-family kinase p53/56Lyn and a 120-kDa phosphoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 92, 359-363.

Siess, W. (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 69, 58-178.

Siess, W. (1990) Platelets in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv.Exp.Med.Biol.* 273, 119-127.

Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. and Aepfelbacher, M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 6931-6936.

Slyper, A. H. (1994) Low-density lipoprotein density and atherosclerosis. Unraveling the

connection [see comments]. *JAMA* 272, 305-308.

Stupack, D. G., Li, E., Silletti, S. A., Kehler, J. A., Geahlen, R. L., Hahn, K., Nemerow, G. R. and Cheresch, D. A. (1999) Matrix valency regulates integrin-mediated lymphoid adhesion via Syk kinase. *J. Cell Biol.* 144, 777-788.

Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S. and Yamamura, H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol.Chem* 266, 15790-15796.

Taniguchi, T., Kitagawa, H., Yasue, S., Yanagi, S., Sakai, K., Asahi, M., Ohta, S., Takeuchi, F., Nakamura, S. and Yamamura, H. (1993) Protein-tyrosine kinase p72<sup>syk</sup> is activated by thrombin and is negatively regulated through Ca<sup>2+</sup> mobilization in platelets. *J.Biol.Chem.* 268, 2277-2279.

Torti, M., Tolnai, F. E., Bertoni, A., Sinigaglia, F. and Balduini, C. (1996) Activation of human platelets by lysophosphatidic acid. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 7, 253-255.

Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N. and Yamamura, H. (2000) Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem.(Tokyo)* 127, 321-327.

Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S. and Yamamura, H. (2001) Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett.* 489, 129-133.

Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. and Tybulewicz, V. J. (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302.

Wagner, C. L., Mascelli, M. A., Neblock, D. S., Weisman, H. F., Coller, B. S. and Jordan, R. E. (1996) Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human

platelets. *Blood* 88, 907-914.

Wan, Y., Kurosaki, T. and Huang, X. Y. (1996) Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein- coupled receptors. *Nature* 380, 541-544.

Watson, S. P. and Gibbins, J. (1998) Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today* 19, 260-264.

Watson, S. P. (1999) Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. *Thromb.Haemost.* 82, 365-376.

Weidtmann, A. (1996) Wirkungen von nativem und unterschiedlich stark oxidiertem LDL auf Thrombozyten. Dissertation, LMU München.

Weidtmann, A., Scheithe, R., Hrboticky, N., Pietsch, A., Lorenz, R. and Siess, W. (1995) Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15, 1131-1138.

Wonerow, P., Obergefell, A., Wilde, J. I., Bobe, R., Asazuma, N., Brdicka, T., Leo, A., Schraven, B., Horejsi, V., Shattil, S. J. and Watson, S. P. (2002) Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cgamma2 regulation in platelets. *Biochem.J.* 364, 755-765.

Woodside, D. G., Obergefell, A., Leng, L., Wilsbacher, J. L., Miranti, C. K., Brugge, J. S., Shattil, S. J. and Ginsberg, M. H. (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr.Biol.* 11, 1799-1804.

Woodside, D. G., Obergefell, A., Talapatra, A., Calderwood, D. A., Shattil, S. J. and Ginsberg, M. H. (2002) The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J.Biol.Chem.*

Wu, Y., Suzuki-Inoue, K., Satoh, K., Asazuma, N., Yatomi, Y., Berndt, M. C. and Ozaki, Y. (2001) Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood* 97, 3836-3845.

Yamada, T., Taniguchi, T., Yang, C., Yasue, S., Saito, H. and Yamamura, H. (1993) Association with B-cell-antigen receptor with protein-tyrosine kinase p72syk and activation by engagement of membrane IgM. *Eur.J Biochem.* 213, 455-459.

Yan, S. R., Huang, M. and Berton, G. (1997) Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J.Immunol.* 158, 1902-1910.

Yan, S. R. and Novak, M. J. (1999) Beta2 integrin-dependent phosphorylation of protein-tyrosine kinase Pyk2 stimulated by tumor necrosis factor alpha and fMLP in human neutrophils adherent to fibrinogen. *FEBS Lett.* 451, 33-38.

Yanaga, F., Poole, A., Asselin, J., Blake, R., Schieven, G. L., Clark, E. A., Law, C. L. and Watson, S. P. (1995) Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor [published erratum appears in *Biochem J* 1996 Feb 1;313(Pt 3):1047]. *Biochem.J.* 311, 471-478.

Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Kitaguchi, H., Tybulewicz, V. L. and Yamamura, H. (2001a) Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood* 98, 2869-2871.

Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T. and Yamamura, H. (2001b) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 288, 495-498.

Yang, L., Yatomi, Y., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Igarashi, Y., Ozaki, Y. and Kume, S. (1996) Activation of protein-tyrosine kinase Syk in human platelets stimulated with lysophosphatidic acid or sphingosine 1-phosphate. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 229, 440-444.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Amidotriazol
BAECs	<i>bovine aortic endothelial cells</i>
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosin 3', 5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin 3', 5'-monophosphat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EtOH	Ethanol
FKS (FCS)	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HMG-CoA	Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Ig	Immunglobulin
Ilo	Iloprost
IP	Immunpräzipitation
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine activation motif</i>
LB	Luria-Bertani (-Medium)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LiAc	Lithiumacetat
LPA	Lysophosphatidsäure

MCS	<i>multiple cloning site</i>
MG	Molekulargewicht
MLC	<i>myosin light chain</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PPP	<i>platelet poor plasma</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
PY	Tyrosinphosphorylierung (Y = Tyrosin)
NO	Stickstoffmonoxid
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate
S1-P	Sphingosin 1-phosphat
ss-DNA	<i>single-stranded DNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Protein
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü/N	über Nacht

# Anhang

## Eigene Veröffentlichungen

### 1. Originalarbeiten

Miranti, C., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J.S., Shattil, S.J.: Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 8(24):1289-1299(1998).

Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J.I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S., Siess, W.: Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 94(5):1665-72(1999)

Maschberger, P., Bauer, M., Baumann-Siemons, J., Zangl, K.J., Negrescu, E.V., Reininger, A.J., Siess, W.: Mildly oxidized LDL stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor rapidly Src-family and Syk tyrosine kinases, and Ca<sup>2+</sup>-influx in human platelets. *J. Biol.Chem.* 275(25):19159-66(2000).

Bauer, M., Maschberger, P., Quek L., Briddon S.J., Dash D., Weiss M., Watson S.P., Siess, W.: Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin alphaIIb beta3 inside-out signalling during shape change. *Thromb. Haemost.* 85(2):331-40(2001).

Bobbe, R., Wilde J.I., Maschberger, P., Essler M., Aepfelbacher M., Watson, S.P., Siess, W.: Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of phospholipase Cgamma2 in mouse megakaryocytes is independent of Bruton tyrosine kinase translocation. *Blood* 97(3):678-84(2001).

Maschberger, P., Watson, S.P., Siess, W.: Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation stimulates the Src-kinases mediated tyrosine phosphorylation of the Fc receptor  $\gamma$ -chain, Syk activation and phospholipase C $\gamma$ 2 tyrosine phosphorylation in human platelets. *Manuskript in Vorbereitung*

## **2. Buchbeiträge**

Hato, T. Maschberger, P., Shattil, S.J.: Integrin signaling in platelets. Method Book: Signaling through Cell Adhesion Molecules. *CRC Press (2000)*.

## **3. Kongreßbeiträge, Abstracts, Vorträge**

### ***a) Vorträge***

Maschberger, P., Negrescu, E.V., Baumann, J., Reiningger, A.J., Siess, W.: Activation of the protein tyrosine kinase p72<sup>Syk</sup> but not p125<sup>FAK</sup> during platelet shape change. *6<sup>th</sup> Erfurt conference on Platelets organised on behalf of the European Platelet Group, Erfurt, 12.-15.05.1996;*

*Platelets (1996) 7/92*

Maschberger, P.: Activation of Syk during platelet shape change induced by mox-LDL and YFLLRNP. *1<sup>st</sup> Platelet Signal Transduction Symposium Munich-Oxford, München, 28.-29.09.1996*

Maschberger, P.: Signaltransduction in platelets: Regulation and function of the tyrosine kinase p72<sup>Syk</sup> during the initial platelet activation. *Seminar, Department of Vascular Biology, Scripps Research Institute, La Jolla, USA, 04.12.1997*

Maschberger, P.: Regulation of the tyrosine kinase p72<sup>Syk</sup> during shape change, spreading and aggregation of human platelets. *Seminar, Department of Pharmacology, University of Oxford, UK, 01.05.1998*

Maschberger, P., Bauer, M., Negrescu, E.V., Shattil, S.J., Siess, W.: Regulation of the tyrosine kinase p72<sup>Syk</sup> during platelet shape change, spreading and aggregation of human platelets. *ETRO-Euroconference, Paris, 14.-15.05.1998*

Siess, W., Bauer, M., Bauer, K., Maschberger, P., Briddon, S.J., Watson, S.P.: Regulation of platelet shape change and spreading. *1<sup>st</sup> UK Platelet Meeting, Oxford, UK, 23.-24.06.1998*

Siess, W., Bauer, M., Maschberger, P., Retzer, M., Essler, M., Aepfelbacher, M., Briddon, S.J., Wilde, J.I., Quek, L.S., Watson, S.P.: Regulation of platelet shape change and platelet spreading. *Fourth International Dahlem Symposium on Cellular Signal Recognition and Transduction, Berlin, 08.-10.10.1998*

***b) Poster***

Maschberger, P., Baumann, J., Negrescu, E.V., Siess, W.: Role of the tyrosine kinase Syk in the initial platelet response induced by mildly oxidized LDL. *Poster, 6th International Lipoprotein Symposium, Hamburg, 29.05. - 01.06.1997*

Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J.I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S.P., Siess, W.: Rho kinase and calcium regulate myosin phosphorylation and shape change in intact human platelets independently of each other. *XIV. Plättchensymposium, Schloß Oppurg, 15.-17.10.1999;*  
*Platelets (2000) 11/111*

## *Danksagung*

*Herrn Prof. Dr. P.C. Weber danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut diese interessante Arbeit durchzuführen.*

*Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Siess für seine engagierte Förderung der Arbeit, für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen und seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Auslandsaufenthalte.*

*Bei Dr. E.V. Negrescu, Dr. M. Bauer, Dr. M. Otte, Dr. C. Johannes und allen anderen Kolleginnen und Kollegen im Labor bedanke ich mich für die anregenden Diskussionen, die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.*

*Frau C. Meister und Frau U. Wielert danke ich für die vielen praktischen Hilfestellungen und die nette Arbeitsatmosphäre.*

*Herrn Prof. Dr. S.J. Shattil danke ich für die äußerst lehrreiche und interessante Zeit in seinem Labor am Scripps Research Institute in La Jolla, USA.*

*Herrn Dr. S.P. Watson, Institute of Pharmacology, Oxford, UK danke ich für die Möglichkeit, einige Experimente mit k.o.-Mäusen in seinem Labor durchzuführen.*

*Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann und Herrn Dr. K.H. Trebesius, Max-von-Pettenkofer Institut danke ich für die Möglichkeit der Benutzung des konfokalen Lasermikroskops und die Hilfestellung.*

*Bei Herrn Prof. F. Hofmann, Frau Dr. C. Werner und Herrn Dr. M. Sausbier, Institut für Pharmakologie, TU München sowie bei Prof. Dr. J. van de Winkel und Dr. M. van Vugt, Utrecht, Niederlande bedanke ich mich für das Bereitstellen von Mausblutproben.*

*Frau Dr. B. Kehrel, Universität Münster danke ich für das Zusenden von Blutproben von Thrombasthenia Glanzmann Patienten.*

# **Lebenslauf**

## **I. Persönliche Daten**

Name	Petra Margit Maschberger
Geburtsdatum	14. April 1971
Geburtsort	Altötting

## **II. Ausbildung und berufliche Tätigkeit**

09.1977 - 07.1981	Grundschule Markt
09.1981 - 06.1990	König-Karlmann Gymnasium Altötting
10.1990 - 09.1995	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin
	Abschluß: Dipl.-Ing. Fachrichtung Biotechnologie
11.1995 - 05.1999	Promotion am Institut für Kreislaufforschung, Graduiertenkolleg Vaskuläre Biologie, Prof. W. Siess, LMU München
WS 99/00 - WS 02/03	Studium der Pharmazie an der LMU München
WS 99/00 - SS 02	Mitarbeit in Renner'schen Apotheke, München
06.2003 - 11.2003	1. Praktisches Halbjahr: Renner'sche Apotheke, München
04.2004 - 09.2004	2. Praktisches Halbjahr: Fujisawa Deutschland GmbH, München; Bereich Herz/Kreislauf

## **III. Auszeichnungen und Auslandsaufenthalte**

11.07.96	Erwin-Stephan-Preis der TU Berlin
07.1997 - 12.1997	Auslandsaufenthalt am Scripps Research Institute, La Jolla, USA
06.04. - 03.05.1998, 07.12. - 14.12.1998, 17.03. - 20.03.1999	Auslandsaufenthalte am Institute of Pharmacology, University of Oxford, UK