

**Biochemische Charakterisierung des ADP Rezeptors P2Y<sub>12</sub> und  
pharmakologische Therapiekontrolle von Thrombozytenfunktionshemmern**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Barsom Aktas  
aus Ochsenfurt

Würzburg 2003

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:  
der Dissertation

1. Prüfer .....

2. Prüfer .....

3. Prüfer  
des öffentlichen Promotionskolloquium

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Englisch	1
1.2 Deutsch	2
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1 Regulationsmechanismen der Aktivierung und Hemmung von Thrombozyten	7
2.1.1 Mechanismen der Plättchenhemmung	7
2.1.2 Physiologie und Mechanismen der Plättchenaktivierung	8
2.1.3 Regulation von Plättchenhemmung und -aktivierung	12
2.2 Möglichkeiten der Manipulation der Thrombozytenregulation und deren Kontrolle	14
2.2.1 Verstärkung endogener Mechanismen der Plättchenhemmung am Beispiel des Dipyridamols	14
2.2.2 Therapiekontrolle des Thrombozytenfunktionshemmers Clopidogrel	15
2.3 Zielsetzung	17
<b>3. MATERIALIEN</b>	<b>18</b>
3.1 Antikörper und Antiseren	18
3.2 Chemikalien und Lösungen	18
3.3 Verbrauchsmaterialien	19
3.4 Geräte	20
<b>4. METHODEN</b>	<b>21</b>
4.1 Präparation humaner Thrombozyten	21
4.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten	21
4.1.2 Zellzählung und Stimulationsbedingungen	21
4.2 Plättchenfunktion	22
4.2.1 Aggregation	22
4.2.2 Serotoninsekretion	22
4.2.3 P-Selektin Expression	23
4.2.4 Thromboxan-Synthaseaktivität	23
4.3 Analyse von sekundären Botenstoffen	24
4.3.1 Bestimmung von cAMP	24
4.3.2 Calciummessung an intakten Thrombozyten	25
4.4 Biochemische Methoden	25
4.4.1 Analyse der VASP-Phosphorylierung	25
4.4.2 Analyse der Phospholipase D Aktivität	28
4.4.3 Phospho-VASP Assay	29
4.5 Sonstige Methoden	30
4.5.1 Permeabilisierung von Plättchen	30

4.6 <i>In vivo</i> Studien zu Thrombozytenfunktionshemmern	31
4.6.1 Dipyridamol Probandenstudie	31
4.6.2 Clopidogrel Patientenstudie	32
4.7 Statistische Methoden	33
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
5.1 Regulation des P2Y <sub>12</sub> Rezeptors durch cGMP-stimulierte Proteinkinase	35
5.2 Phospholipase D als möglicher Effektor des P2Y <sub>12</sub> : Essentielle Rolle G <sub>i</sub> -gekoppelter Rezeptoren für die Sekretion	40
5.3 <i>In vivo</i> Studie zum Wirkmechanismus von Dipyridamol	50
5.4 DELFIA-Assay zur Analyse von Clopidogreleffekten	54
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>57</b>
6.1 Regulation des P2Y <sub>12</sub> und des $\alpha$ 2A Rezeptors durch die cGMP-abhängige Proteinkinase	57
6.2 Phospholipase D als neuer Effektor des P2Y <sub>12</sub> : Essentielle Rolle G <sub>i</sub> -gekoppelter Rezeptoren für die Sekretion	60
6.3 Biochemischer Wirkmechanismus des Dipyridamols in humanen Thrombozyten	64
6.4 DELFIA-Assay zur Therapiekontrolle von Clopidogreleffekten	68
<b>7. LITERATUR</b>	<b>70</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN UND MASSEINHEITEN</b>	<b>83</b>
8.1 Abkürzungen	83
8.2 Maßeinheiten	85
8.3 Stimulationsreagenzien und Inhibitoren	86

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

### 1.1 Englisch

The important role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase for the inhibition of platelet activation and aggregation is well established and due to the inhibition of fundamental platelet responses such as agonist-stimulated calcium increase, exposure of adhesion receptors and actin polymerization. The diversity of cGMP binding proteins and their synergistic interaction with cAMP signaling in inhibiting platelets indicates that a variety of cGMP targets contribute to its anti-platelet action. Since stimulation of  $G_i$ -proteins was recently shown to be essential for complete platelet activation/aggregation, the possibility that  $G_i$ -signaling events are cGMP/cGMP-dependent protein kinase targets was investigated. Thus, the effect of elevated cGMP levels and selective cGMP-dependent protein kinase activation on purinergic and adrenergic receptor-evoked decrease of platelet cAMP content was closely examined. Experiments with a selective activator of cGMP-dependent protein kinase demonstrate for the first time a cGMP-caused  $G_i$ -protein inhibition. Our data suggest that this effect is mediated by cGMP-dependent protein kinase. Considering the essential role of  $G_i$ -signaling for platelet activation, we propose that inhibition of  $G_i$ -mediated signaling by cGMP/cGMP-dependent protein kinase is an important mechanism of action contributing to platelet inhibition by cGMP-elevating endothelium derived factors and drugs. (Aktas et al., *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 433-439)

Dipyridamole and in particular dipyridamole in combination with low dose aspirin are very effective in preventing recurrent stroke. However, the mechanism(s) underlying this dipyridamole effect have not been elucidated. Since dipyridamole inhibits the cGMP-specific phosphodiesterase type V *in vitro*, we hypothesized and tested whether therapeutically relevant dipyridamole concentrations enhance NO/cGMP-mediated effects in intact human platelets studies *ex vivo*. Phosphorylation of VASP (VASodilator-Stimulated Phosphoprotein), an established marker of NO/cGMP effects in human platelets, was quantified by phosphorylation-specific antibodies and western blots. Serotonin secretion and thromboxane synthase activity were determined by fluorimetric quantification of derivatized serotonin and synthase product, respectively. Endothelium-derived factors such as NO and  $PG-I_2$  are known to elevate both, cGMP and cAMP levels with concomitant platelet inhibition and VASP phosphorylation. In our *in vitro* experiments, therapeutically relevant dipyridamole concentrations (3.5  $\mu\text{mol/l}$ ) only amplified cGMP-mediated VASP phosphorylation due to NO donor sodium nitroprusside, but not cAMP-mediated effects. Furthermore, thromboxane synthase activity and serotonin secretion, events important for initial platelet activation, were inhibited by sodium nitroprusside, an effect also enhanced by dipyridamole

demonstrating the functional relevance of these observations. Finally, the *ex vivo* enhancement of NO/cGMP effects was also observed with platelets obtained from healthy volunteers treated with extended released dipyridamole. Under therapeutically relevant dipyridamole conditions, dipyridamole enhances platelet inhibition by amplifying the signalling of the NO-donor SNP. These data support the concept that enhancement of endothelium-derived NO/cGMP-mediated signalling *in vivo* is an important component of dipyridamole action. (*Aktas et al., Stroke 2003; 34(3): 764-769*)

Activation of platelets causes secretion of several platelet activators, including thrombin, thromboxan A<sub>2</sub>, ADP or serotonin. By this process, other platelets get attracted and contribute to the thrombus. Therefore, secretion represents an important amplifying mechanism during platelet activation and hemostasis. In the present work, we could demonstrate that G<sub>i</sub>-protein signalling does not only amplify initial secretion induced by G<sub>q</sub>-protein activation, as it has been proposed so far, but is the actual stimulus to induce secretion. However, stimulation of G<sub>q</sub>-proteins is required, since this enables G<sub>i</sub>-proteins to induce secretion. Therefore, activation of both G<sub>i</sub>-proteins is essential for platelet release. We could exclude inhibition of adenylyl cyclase to be the major mechanism contributing to the observed effects of G<sub>i</sub>-proteins during secretion. We suggest phospholipase D as a novel effector of the G<sub>i</sub>-coupled ADP receptor P2Y<sub>12</sub>, whose stimulation may lead to degranulation of platelets. This mechanism could be the major one underlying the essential role of G<sub>i</sub>-proteins during secretion and activation of platelets. This could provide new insights in the mechanism by which P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists like clopidogrel exert their antithrombotic action. (*Aktas et al., manuscript in preparation*)

## **1.2 Deutsch**

Die Bedeutung der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase für die Hemmung der Plättchenaktivierung und -aggregation ist gut beschrieben. Zahlreiche fundamentale Plättchenantworten wie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die Exposition von Adhäsionsrezeptoren und die Aktinpolymerisation können durch die Cyclonukleotid vermittelte Kinasenaktivierung fast vollständig gehemmt werden. Die Vielfalt der cGMP bindenden Proteine und deren synergistische Interaktion mit cAMP vermittelten Signalwegen deuten auf eine Reihe von cGMP Zielproteinen hin. Vor kurzem wurde die zentrale Bedeutung einer G<sub>i</sub>-Protein Stimulation für die Plättchenaktivierung und -aggregation gezeigt. In dieser Dissertation wurde daher der Frage nachgegangen, ob Signalmoleküle, die an G<sub>i</sub>-Protein vermittelten Effekten beteiligt

sind, einen Angriffspunkt für cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen darstellen. Zu diesem Zweck wurden die Effekte erhöhter cGMP Spiegel und die selektive Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase auf die adrenerge und purinerge Rezeptor vermittelte Erniedrigung stimulierter cAMP Konzentrationen untersucht. In unseren Versuchen konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären cGMP Konzentration G-Protein vermittelte Signale hemmt. Dieses erfolgt nicht auf Grund einer cGMP stimulierten Aktivierung von cyclonukleotidabbauenden Phosphodiesterasen, sondern auf Grund einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase. In Anbetracht der essentiellen Bedeutung der G<sub>i</sub>-Protein Stimulation für die Plättchenaktivierung stellt dies einen wichtigen Mechanismus dar, wie das aus dem Endothel freigesetzte NO über cGMP die Thrombozytenfunktion hemmt. Klinisch bedeutsame Substanzen wie Clopidogrel oder Ticlopidin imitieren diesen *in vivo* Effekt des NO, indem sie extrazellulär über eine Rezeptorhemmung G<sub>i</sub>-Protein Stimulation verhindern. (Aktas *et al.*, *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 433-439)

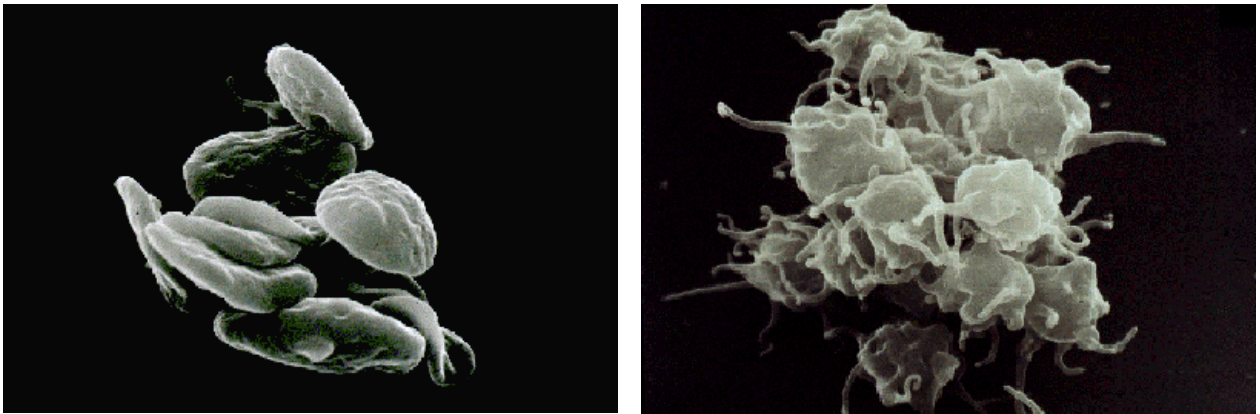
Dipyridamol und im Besonderen die Kombination von Dipyridamol und niedrig dosierter Acetylsalicylsäure sind in der Sekundärprävention des Schlaganfalles sehr gut wirksam. Jedoch sind die hierfür zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt. Da für das Dipyridamol eine *in vitro* Hemmung der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase 5 (PDE 5) nachgewiesen ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Dipyridamol in therapeutisch relevanten Konzentrationen die NO/cGMP vermittelte Effekte auf die Plättchenfunktion unter *ex vivo* Bedingungen verstärkt. Die Phosphorylierung von VASP (*VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein*) diente dabei als Meßparameter NO/cGMP Signale in Thrombozyten mit Hilfe von Antikörpern und *Western Blot* Technik zu quantifizieren. Die Sekretion von Serotonin aus Thrombozyten und die Aktivität der Thromboxansynthase wurden durch die fluorimetrische Bestimmung derivatisierten Serotonins bzw. des Synthaseprodukts Malondialdehyd quantifiziert. Endotheliale Faktoren wie NO oder PG-I<sub>2</sub> erhöhen cGMP bzw. cAMP, die zu einer Plättchenhemmung und gleichzeitigen VASP Phosphorylierung führen. In *in vitro* Versuchen potenzierte Dipyridamol in einer therapeutisch relevanten Konzentration (3,5 µmol/l) nur die cGMP vermittelte, aber nicht die cAMP vermittelte VASP Phosphorylierung. Darüber hinaus konnte Dipyridamol (3,5 µmol/l) die Hemmung von Plättchenfunktionen wie der Serotoninsekretion und die Aktivität der Thromboxansynthase durch einen NO Donor klar verstärken. Schließlich steigerte Dipyridamol die NO vermittelte VASP Phosphorylierung auch in Thrombozyten von Probanden, die vorher Dipyridamol eingenommen hatten. Unter therapeutisch relevanten Bedingungen verstärkt also Dipyridamol NO/cGMP Signalwege und damit die Hemmung von Thrombozyten. Dieser Befund bekräftigt die Vorstellung, dass die Verstärkung endothelialer

NO/cGMP Effekte auf Thrombozyten eine wichtige Komponente der Dipyridamol Wirkung unter *in vivo* Bedingungen darstellt. (Aktas et al., *Stroke* 2003; 34(3): 764-769)

Die Stimulation von Thrombozyten führt u.a. zu einer Sekretion von Plättchenaktivatoren wie Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub>, ADP oder Serotonin aus dem Zellinnern. Durch diesen Prozess der Degranulierung können nun weitere Thrombozyten aktiviert werden. Die Sekretion stellt somit einen wichtigen, verstärkenden Schritt in der Aktivierung von Thrombozyten während der Hämostase dar. Diese Arbeit zeigt, dass in Thrombozyten eine G<sub>i</sub>-Protein Aktivierung nicht nur wie bisher angenommen eine initiale Sekretion durch G<sub>q</sub> verstärkt und aufrecht erhält, sondern der eigentliche Stimulus ist, der die Degranulierung von Thrombozyten auslöst. Die Stimulation G<sub>q</sub> vermittelter Signalwege ist nur insofern erforderlich, als diese das Auslösen der Sekretion durch eine Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen ermöglichen. Die Stimulierung beider G-Proteine ist daher essentiell für die thrombozytäre Sekretion. Zudem konnte die Phospholipase D als ein neuer Effektor des P2Y<sub>12</sub> nachgewiesen werden, deren Stimulierung wahrscheinlich zur Degranulierung von Thrombozyten führt. Dieser Mechanismus könnte der Entscheidende sein, der der essentiellen Rolle des G<sub>i</sub>-Proteins bei der Stimulation der Sekretion und der Aktivierung von Thrombozyten zu Grunde liegt und könnte ein neues Licht auf die Wirkweise des Clopidogrels und des Ticlopidins werfen, die irreversibel an den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor binden. (Aktas et al., *Manuskript in Vorbereitung*)



## 2. EINLEITUNG



*Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten: links diskoider Thrombozyten im Ruhezustand, rechts aktivierte Thrombozyten mit Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien) (Quelle: [www.akh-wien.ac.at](http://www.akh-wien.ac.at)).*

Thrombozyten sind die kleinsten Zellen im Blutkreislauf (ca. 4  $\mu\text{m}$ ). Sie entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten und haben eine Lebenszeit von 7 bis 10 Tagen. Ihr Abbau erfolgt in der Leber und in der Milz. Besondere Kennzeichen sind die diskoider Form ("Plättchen") und das Fehlen eines Zellkerns. Die durchschnittliche Konzentration von Thrombozyten beträgt im Blut eines gesunden Erwachsenen 150.000 – 300.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$ . Ihre Aufgabe liegt vorwiegend in der primären Blutstillung (Hämostase), die durch eine Vernetzung von Thrombozyten, der sog. Thrombozytenaggregation, gekennzeichnet ist (1).

Die Erkrankungen des Gefäßsystems stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (2). Durch chronische Erkrankungen wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes oder durch Tabakkonsum kommt es auf Dauer zu einem Schaden an der Gefäßwand. Dabei wird die innerste Zellschicht der Gefäße, das Endothel, in seiner die Thrombozyten hemmenden Funktion beeinträchtigt. Die daraus folgende erleichterte Aktivierbarkeit der Plättchen kann dann auf rupturierten, atherosklerotischen Plaques oder in Regionen turbulenten Blutflusses in einer Aggregation von Thrombozyten resultieren, die das Gefäß verschließen (Thrombose) oder Embolien verursachen können. Die Folge sind Schlaganfall, Herzinfarkt oder periphere arterielle Verschlusskrankheiten (3-5).

Im intakten Gefäßsystem zirkulieren die Thrombozyten (Blutplättchen) frei im Blut. Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßinnenwand, wie es beispielsweise bei einer Ruptur von atherosklerotischen Plaques der Fall ist, treten Thrombozyten in Kontakt mit freiliegendem, aggregationsförderndem Gewebe. Dies führt in einem ersten Schritt zu einem Abbremsen zirkulierender Thrombozyten, in dessen Folge es zur Adhäsion und zu anschließender Aktivierung der Plättchen an der Stelle der Verletzung kommt. Die Thrombozyten verändern dabei ihre Form und nehmen eine sphärische Gestalt an (*"shape change"*). Durch eine Sekretion von Plättchenaktivatoren aus dem Zellinneren kommt es im weiteren Verlauf zu einer Anreicherung von Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und zu deren Vernetzung, der sog. Aggregation. Dieser Prozess wird als primäre Blutstillung (primäre Hämostase) bezeichnet. Durch eine nahezu zeitgleiche Aktivierung der Gerinnungskaskade werden Fibrinfibrillen gebildet, die sich an den Thrombus anlagern und diesen dadurch stabilisieren (sekundäre Hämostase) (1).

Die Aktivierung von Thrombozyten ist daher ein kritischer Vorgang: die lebenswichtige, physiologische Funktion der Plättchen kann unter pathophysiologischen Bedingungen lebensbedrohliche Folgen haben. Ziel der medikamentösen Therapie vaskulärer Erkrankungen ist es deshalb, das Gleichgewicht aus Plättchenhemmung und Plättchenaktivierung so zu verschieben, dass auf der einen Seite der Gefäßverschluss verhindert wird, auf der anderen Seite aber die Blutstillung aufrecht erhalten bleibt.

Voraussetzung für den sicheren Einsatz, aber auch für die Entwicklung pharmakologisch wirksamer Verbindungen, ist eine möglichst eindeutige biochemische Charakterisierung der zu manipulierenden Signalwege. Diese ermöglicht nicht nur die Identifizierung neuer, therapeutisch viel versprechender Angriffspunkte, sondern kann auch Grundlage für eine zielgenaue Therapiekontrolle sein.

## 2.1 Regulationsmechanismen der Aktivierung und Hemmung von Thrombozyten

Die Aktivität von Thrombozyten wird über eine Wechselwirkung von hemmenden und aktivierenden Kräften reguliert. Hemmung und Aktivierung werden zwar über unterschiedliche biochemische Signalwege in Thrombozyten vermittelt, sind aber in ihrer Signalübertragung über gemeinsame Schnittstellen miteinander vernetzt.

### 2.1.1 Mechanismen der Plättchenhemmung

Endothelzellen kleiden die Innenwand von Gefäßen aus und stellen so eine Grenzschicht zwischen Gefäßwandgewebe und Blut dar. Das Endothel trägt u.a. zur Regulation des Blutdrucks und zur Aufrechterhaltung des Blutflusses bei (6). Die Wechselwirkung des Endothels mit Thrombozyten stellt den wichtigsten *in vivo* Mechanismus der Plättchenhemmung dar (7).

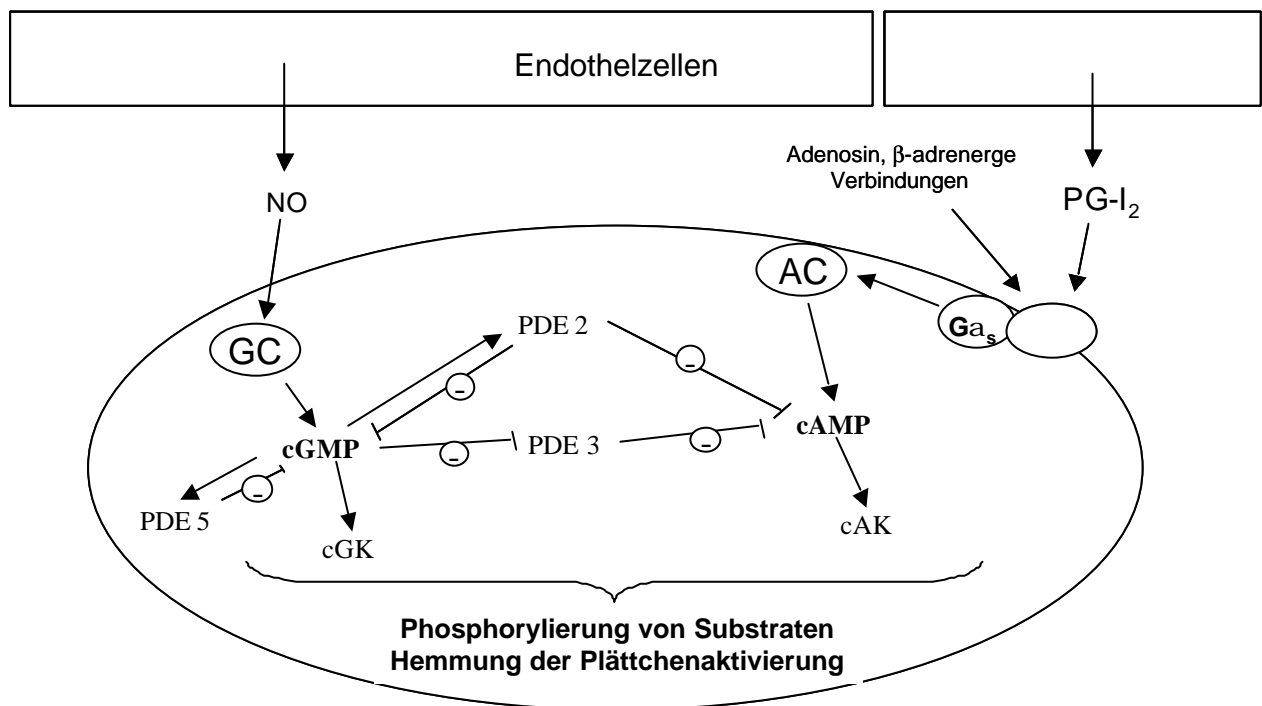


Abbildung 2: Regulationsmechanismen der Plättchenhemmung.

Endothelzellen setzen ständig die physiologischen Plättcheninhibitoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PG-I<sub>2</sub>) in das Blut frei und verhindern so eine ungewollte Aktivierung der Thrombozyten (7,8). Sie stimulieren dort die Bildung der Cyclonukleotide cGMP bzw. cAMP, NO durch direkte Stimulation der cytosolischen Guanylyl Cyclase (GC) und PG-I<sub>2</sub> über G<sub>s</sub>-gekoppelte Prostanoidrezeptoren durch die membranständige Adenylyl Cyclase (AC, siehe Abbildung 2). Die erhöhten Cyclonukleotidspiegel aktivieren die cyclonukleotidabhängigen Kinasen (cGK/cAK) deren

Substrate dadurch phosphoryliert werden (7,9). Dieser Vorgang ist verantwortlich für die Hemmung zahlreicher Plättchenfunktionen: die Hemmung des Calciumsignals (10,11), der Adhäsion (12) der Fibrinogenbindung (13), und der Aggregation (7).

Die cyclonukleotid-vermittelte Plättchenhemmung ist ein Vorgang, der unabhängig vom Stimulus ist. Neben PG-I<sub>2</sub> führt auch das Adenosin oder β-adrenerge Verbindungen über Rezeptoren zu einer Aktivierung der Adenylyl Cyclase und einem Anstieg von cAMP (14).

Familie	Isozym	K <sub>m</sub> (μM)	
		cAMP	cGMP
PDE 2	von cGMP stimuliert; hydrolysiert cAMP und cGMP	50	35
PDE 3	von cGMP inhibiert; hydrolysiert cAMP	0,2	0,02
PDE 5	von cGMP stimuliert; hydrolysiert spezifisch cGMP	150 <sup>a</sup>	5

*Tabelle 1: Phosphodiesterasen (PDE) in Thrombozyten (<sup>a</sup>: unter in vivo Bedingungen nicht relevant)(15).*

Die Cyclonukleotide cAMP und cGMP regulieren Phosphodiesterasen (PDE) und werden selbst durch diese reguliert (16). In humanen Thrombozyten sind drei verschiedene Subtypen dieser cyclonukleotidabbauenden Enzyme nachgewiesen worden (17,18): die unspezifische cGMP-stimulierte PDE 2, die cGMP-inhibierte und cAMP spezifische PDE 3 und die cGMP-stimulierte und cGMP spezifische PDE 5 (siehe Tabelle 1). Die synergistische Hemmung der Plättchenfunktion durch NO und PG-I<sub>2</sub> (19,20) wird der Hemmung der PDE 3 durch cGMP zugeschrieben (21,22): im Falle einer Hemmung dieses Enzyms durch cGMP führt der gehemmte Abbau von cAMP zu einer relativen Erhöhung der cAMP Konzentration im Zellinnern. Dieser Anstieg an cAMP wird wiederum limitiert durch die PDE 2, die cAMP direkt abbaut und zusätzlich indirekt durch die PDE 5, die cGMP hydrolysiert (23).

### 2.1.2 Physiologie und Mechanismen der Plättchenaktivierung

Die Aktivierung humaner Thrombozyten erfolgt über Membranglykoproteine, die in vier Gruppen unterteilt werden: Integrine, leucinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp (1). Während die thrombozytären Membranglykoproteine an der Adhäsion und der Aktivierung von Thrombozyten maßgeblich beteiligt sind (24), regulieren G-Protein gekoppelte, heptahelikale Rezeptoren zusätzlich den Prozess der Aggregation und die Bildung des Thrombus (25).

Bei einer Schädigung von Endothelzellen kommt es zur Freilegung von subendothelialelem Gewebe, auf dessen Oberfläche sich eine Reihe aggregationsfördernder (prothrombotischer) Proteine

befinden. Diese interagieren über Plasmaproteine (26) mit Membranglykoproteinen der Thrombozyten (27-29) und lösen dadurch die Thrombusbildung aus. Eine zentrale Rolle spielen hierbei der von Willebrand Faktor (vWF) und Collagen, die zu einem Abbremsen ("tethering") und anschließender Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand führen (29). An diesem Prozess sind der vWF-Rezeptor, der sogenannte Glykoprotein (GP) Ib-V-IX Komplex (30,31) und der Collagenrezeptor GP VI (32) auf Thrombozyten beteiligt. Über diese membranständigen Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Signalwege ("outside-in-signalling"), die zu einer Neuorganisation des Zytoskeletts ("shape change"), zur Aktivierung von weiteren Oberflächenrezeptoren wie dem Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa ("inside-out signalling") und zur Ausschüttung von Plättchenaktivatoren aus den intrazellulären Speicherorganellen führen (27,33,34). Dadurch werden weitere Thrombozyten aktiviert, die über die Enden des symmetrisch gebauten Fibrinogenmoleküls an aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptoren miteinander verbunden werden (35). Die Ausbildung dieser Fibrinogenbrücken und die dadurch erfolgte Verbindung von Thrombozyten miteinander wird als Aggregation bezeichnet.

Die Physiologie der Thrombozytenaggregation wird zusätzlich über ein Netzwerk biochemischer Signale G-Protein gekoppelter Rezeptoren gesteuert (14,25,36) (siehe Tabelle 2).

Agonist	Rezeptor	G-Protein	Effektor	Effekt
Thrombin	PAR-1/3 <sup>a</sup>	G $\alpha_q$ , G $\alpha_{12/13}$ , (G $\alpha_i$ ) <sup>b</sup>	PLC, Rho, AC	PKC, Calcium $\uparrow$
	PAR-4			Rho-kinase $\uparrow$ cAMP $\downarrow$
Thromboxan A2	TP $\alpha$	G $\alpha_q$ , G $\alpha_{12/13}$	PLC, Rho	PKC, Calcium $\uparrow$ Rho-kinase $\uparrow$
ADP	P2Y1	G $\alpha_q$	PLC	PKC, Calcium $\uparrow$
	P2Y12	G $\alpha_i$	AC	cAMP $\downarrow$
Adrenalin	$\alpha_2A$	G $\alpha_i$ / G $\alpha_z$ <sup>a</sup>	AC	cAMP $\downarrow$
Serotonin	5-HT <sub>2A</sub>	G $\alpha_q$	PLC	PKC, Calcium $\uparrow$

Tabelle 2: G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten. <sup>a</sup>: entsprechender Subtyp in Mausthrombozyten. <sup>b</sup>: wird nur stimuliert bei Thrombinkonzentration > 0,3 Einheiten/ml (37). Abkürzungen: PLC: Phospholipase C; AC: Adenylyl Cyclase; PKC: Proteinkinase C; PAR: protease activated receptor, Rho: "small" GTPase (25,38).

G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bilden dabei einen zusammenhängenden Komplex. Sowohl ihre Klassifizierung als auch die Festlegung, welches Signal ausgelöst wird, erfolgt über die  $\alpha$ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand bindet die  $\alpha$ -Untereinheit GDP, das bei Aktivierung des Rezeptors durch GTP ersetzt wird. Durch

diesen Prozess erfährt die  $\alpha$ -Untereinheit eine Konformationsänderung und dissoziiert zusammen mit GTP vom  $\beta\gamma$ -Komplex. Die  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta\gamma$ -Komplex können nun Effektormoleküle regulieren. Durch die GTP-ase Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit wird das gebundene GTP langsam zu GDP hydrolysiert, die  $\alpha$ -Untereinheit bindet anschließend wieder an den  $\beta\gamma$ -Komplex und bringt so das G-Protein in den inaktiven Grundzustand zurück (25).

In zahlreichen *ex vivo* Experimenten an humanen wie murinen Thrombozyten wurde die Rolle G-Protein gekoppelter Rezeptoren bei der Plättchenaktivierung untersucht. Einen entscheidenden Einfluss auf die Aggregation, aber auch für die Formveränderung und die Sekretion, hat die Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  durch  $G_q$ , die die Bildung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) verursacht.  $IP_3$  vermittelt dabei einen Anstieg der freien Calciumkonzentration (39), der für die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa zwar essentiell ist, jedoch alleine nicht ausreicht (40). Die zusätzliche Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG ist notwendig (40). Die Bedeutung des  $G_q$ -Signalweges für die Aggregation zeigen die Untersuchungen an sogenannten *knock-out* Mäusen, denen das Gen für die Codierung von  $G_q$  fehlt (41). Thrombozyten dieser Mäuse aggregieren nach Stimulation mit Thrombin, ADP oder Thromboxan A2 (TxA2) nicht; da sie nicht in der Lage sind, die PLC zu aktivieren. Dieser Befund wurde in Experimenten mit Mäusen bestätigt, denen der  $G_q$ -gekoppelte ADP Rezeptor P2Y1 fehlt. ADP löst in Thrombozyten dieser Mäuse keine Aggregation mehr aus (42).

Eine alleinige  $G_q$  Stimulation scheint jedoch für eine unumkehrbare, irreversible Aggregation nicht ausreichend zu sein. Mindestens zwei unabhängige Signalwege sind notwendig, wie am Beispiel der ADP induzierten Aggregation eindrucksvoll gezeigt werden konnte. ADP besitzt auf Thrombozyten zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren: der P2Y1, der an  $G_q$  koppelt (43) und der P2Y12, der  $G_i$  aktiviert (44). Wie bereits oben erwähnt, löst ADP in Mausthrombozyten, denen der P2Y1 Rezeptor fehlt, keine Aggregation aus (42,45). Dieses konnte auch durch eine funktionelle Hemmung des P2Y1 Rezeptors durch ein modifiziertes ADP Analogon auf humanen Thrombozyten erzielt werden (46-49). In beiden Fällen ist aber die ADP induzierte Aggregation durch Serotonin, das einen  $G_q$ -gekoppelten Rezeptor bindet, wieder herstellbar (46,49,50). Die Aggregation nach Stimulation mit ADP ist aber auch durch das Fehlen oder die Hemmung des P2Y12 nicht möglich (siehe Kapitel 2.2.2). Erst die zusätzliche Stimulation mit Adrenalin, das über den  $\alpha_2A$  Rezeptor ebenfalls ein  $G_i$ -Protein aktiviert, stellt die ADP induzierte Aggregation wieder her (48).

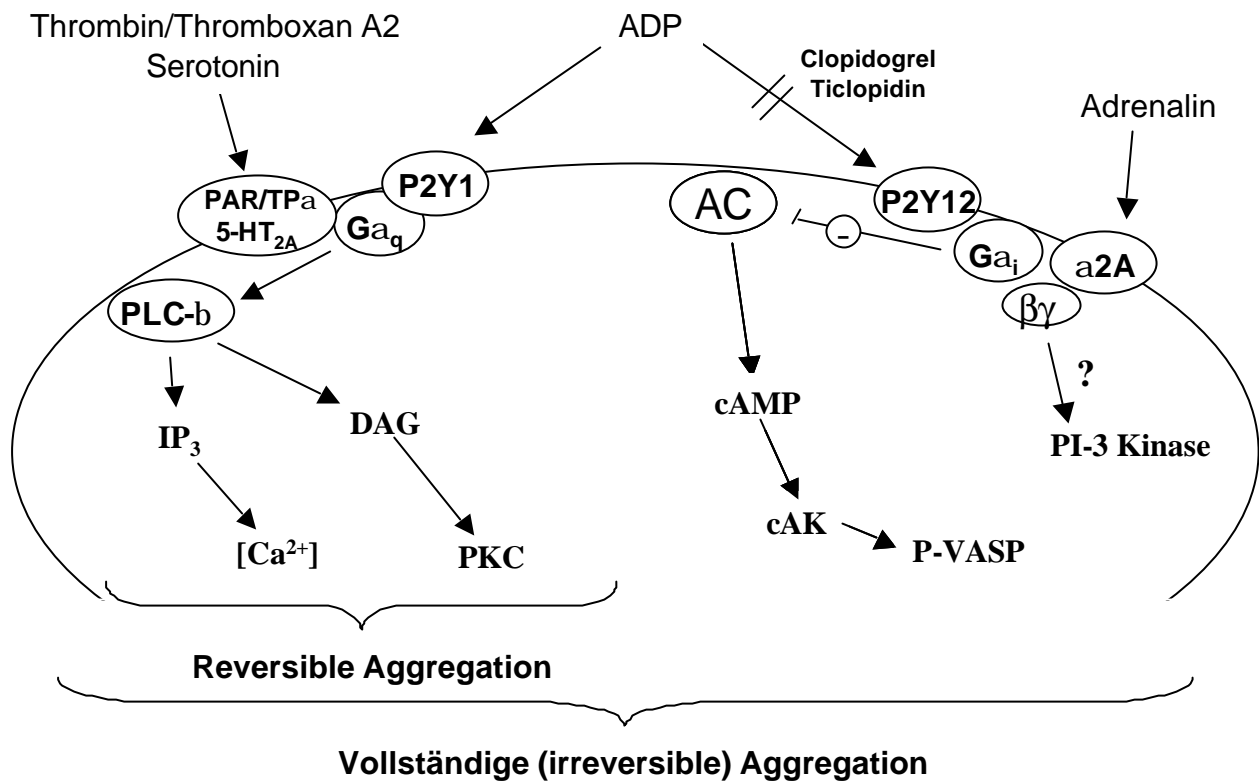


Abbildung 3: Regulationsmechanismen der Plättchenaktivierung. Clopidogrel und Ticlopidin hemmen den ADP Rezeptor P2Y12 (siehe 2.2.2). Abkürzungen: IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerol; P-VASP: Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein, phosphoryliert; PI-3 kinase: Phosphatidylinositol-3 Kinase; cAK: cAMP-abhängige Proteinkinase.

Eine vollständige und irreversible Aggregation bedingt demnach eine gleichzeitige Stimulation von G<sub>q</sub>- und von G<sub>i</sub>-Protein (siehe Abbildung 3). Die G<sub>q</sub>-Aktivierung löst dabei in einem ersten Schritt eine Formveränderung und eine vorübergehende (reversible) Aggregation aus, die dann in Gegenwart einer G<sub>i</sub>-Stimulierung verstärkt, aufrecht erhalten und vervollständigt wird (48). Eine alleinige Stimulation des G<sub>i</sub>-Proteins bewirkt keine Aggregation. Die Notwendigkeit der gemeinsamen Aktivierung zweier Signalwege für eine vollständige Aggregation ist unabhängig vom Stimulus: Serotonin (G<sub>q</sub>) löst zusammen mit Adrenalin (G<sub>i</sub>) ebenso eine irreversible Aggregation aus wie ADP oder Thrombin alleine, da sowohl ADP als auch Thrombin an G<sub>q</sub> und an G<sub>i</sub> koppelnde Rezeptoren auf Thrombozyten besitzen (48) (siehe Tabelle 2).

Für den Vorgang der Sekretion (Degranulierung) ist ebenfalls eine G<sub>i</sub>-Protein Aktivierung eine essentielle Voraussetzung (25): erhöhte Calciumspiegel in der Zelle (51,52) und Aktivierung der PKC (53-55) lösen beide jeweils eine Degranulierung aus. Dieser Prozess wird verstärkt und aufrechterhalten durch eine zusätzliche Stimulierung eines G<sub>i</sub>-Proteins (56). Im Gegensatz zur Aggregation reicht eine Stimulation von G<sub>q</sub> und G<sub>i</sub> offenbar nicht für eine vollständige Sekretion aus, da ADP, das sowohl G<sub>q</sub> als auch G<sub>i</sub> aktiviert, nicht in der Lage ist, eine Degranulierung auszulösen. Eine essentielle Beteiligung von G<sub>2/13</sub> vermittelten Signalwegen an der Sekretion wird daher

diskutiert (25), ließ sich aber bislang noch nicht belegen. Eine grundlegende Bedeutung der  $G_{12/13}$  Stimulation für die Aggregation konnte hingegen nachgewiesen werden: in  $G_q$ -defizienten Maustrombozyten genügte die alleinige Aktivierung von  $G_{12/13}$  und  $G_i$ , eine Aggregation auszulösen (57). Der gleiche Mechanismus wurde nachfolgend auch für humane Thrombozyten nachgewiesen (58).

Noch ist allerdings nicht geklärt, wie die Stimulation von  $G_i$ -Protein zur Aktivierung von Thrombozyten, im Besonderen zur Aggregation und Sekretion, beiträgt. Eine Senkung der cAMP Konzentration durch Hemmung der Adenylyl Cyclase mit der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins ist vermutlich nicht der entscheidende Mechanismus, da eine direkte Hemmung der Adenylyl Cyclase durch Inhibitoren die  $G$ -Protein Stimulation bei der Aggregation nicht ersetzen kann (59-62). Alternativ wird die Möglichkeit diskutiert, dass der  $\beta\gamma$ -Komplexes die Phosphatidylinositol-3 (PI-3) Kinase aktiviert (63,64). Eine Hemmung der PI-3 Kinase beeinträchtigt zwar die Stimulation der Aggregation, jedoch zeigen PI-3-defiziente Mäuse keine signifikant veränderte Plättchenfunktion (65). Der genaue Beitrag der  $G_i$ -Protein Stimulation zur Plättchenaktivierung ist daher immer noch unklar.

### 2.1.3 Regulation von Plättchenhemmung und -aktivierung

Überschneidungen in den Signalwegen der Plättchenhemmung und -aktivierung können über gemeinsame Zieleffektoren erfolgen oder über eine Phosphorylierung von Proteinen der gegenseitigen Signalkaskade.

Ein Beispiel für die Überschneidung an einem gemeinsamen Zieleffektor stellt die Adenylyl Cyclase (AC) dar. Plättchenaktivatoren wie ADP oder Adrenalin inhibieren die AC (66,67) und treten damit in eine direkte Konkurrenz mit Plättcheninhibitoren wie  $PG-I_2$  oder Adenosin, die die AC stimulieren (14). Die Hemmung der AC kann allerdings nur in Gegenwart eines Stimulus gemessen werden. Eine Verringerung basaler cAMP Spiegel durch  $G_i$ -Protein Stimulation ist bisher nicht reproduzierbar messbar und wird kontrovers diskutiert (68). Für zahlreiche funktionelle Parameter wie Aggregation, Serotoninsekretion oder P-Selektin Expression ist die Hemmung der AC nicht relevant (siehe Kapitel 2.1.2).

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt vermutlich den wichtigsten Regulationsmechanismus der Plättchenaktivität dar. Eine Reihe von Substraten der cAK (cAMP-abhängige Proteinkinase) und cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase) sind bisher identifiziert worden (7,9), wobei die Phosphorylierung der einzelnen Proteine unterschiedliche Auswirkung auf die Plättchenaktivität haben kann. So kann die Cyclonukleotid vermittelte Phosphorylierung von Substraten die Plättchenaktivierung an verschiedenen Stellen der Signalkaskade hemmen (siehe Tabelle 3): Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_{13}$ -Proteins inhibiert die Rho/Rho-Kinase



Signalkaskade und damit die Umorganisation des Zytoskeletts (69). Auch wird die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern durch die Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors vermindert (70,71). Zahlreiche Zytoskelett-assoziierte Proteine wie ABP (*actin binding protein*) (72), Caldesmon (73) und VASP (**V**asodilator-**s**timuliertes **P**hosphoprotein) werden ebenfalls durch Cyclonukleotidkinasen reguliert (13,74,75). Auf der anderen Seite kann Phosphorylierung im Sinne eines selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus (negativer *feedback*-Mechanismus) zu einer Schwächung der Cyclonukleotid vermittelten Plättchenhemmung führen. In humanen Plättchen verstärkt die Phosphorylierung der PDE 3 (76) und der PDE 5 (77) den Abbau von cAMP bzw. cGMP. Weitere Substrate der cAK und cGK sind in anderen Zelltypen nachgewiesen worden, jedoch wurde eine Relevanz für Thrombozyten bisher nicht belegt (7).

<b>Substrat</b>	<b>cAK</b>	<b>cGK</b>	<b>angenommener Effekt</b>
ABP	Plättchen	--	Zytoskelettstabilisierung ruhender Thrombozyten (72)
Caldesmon	Plättchen	--	Zytoskelettstabilisierung ruhender Thrombozyten (73)
Gα <sub>13</sub>	Plättchen	--	Hemmung des RhoA/Rho Signalweges (69)
GP Ibβ	Plättchen	--	Collagen induzierte Aktinpolymerisation ↓ (78)
IP <sub>3</sub>	Plättchen	Plättchen	intrazelluläre Calciumfreisetzung ↓ (70,71)
PDE 3	Plättchen	--	Verstärkung des Abbaus von cAMP (76)
VASP	Plättchen	Plättchen	Hemmung der GP IIb/IIIa Aktivierung (13,74-76)
IRAG	--	Glatte Muskelzellen	Hemmung der intrazellulären Calciumfreisetzung (79)
PDE 5	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	Verstärkung des Abbaus von cGMP (80)
TxA <sub>2</sub> Rezeptor	HEK 293 Zellen	HEL Zellen	Hemmung der G-Protein Aktivierung (81,82)

*Tabelle 3: Substrate der cAMP-abhängigen und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK und cGK)(7).*

Das am besten charakterisierte Substrat der cAK und cGK ist VASP, das drei Phosphorylierungsstellen besitzt (an Serin 157, Serin 239 und Threonin 278). Diese werden jedoch mit unterschiedlicher Präferenz von beiden Kinasen phosphoryliert (74,83). VASP liegt in Thrombozyten in sehr hoher Konzentration vor (84) und ist in verschiedenen Zelltypen in den fokalen Kontakten, Stressfasern und Zell-Zell Kontakten lokalisiert (85). Es interagiert mit anderen Zytoskelettproteinen wie Profilin, Zyxin, Vinculin und Aktin, sowie mit dem Oberflächenprotein ActA des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (86-89). Die Aktinpolymerisation und die Bündelung von Aktinfilamenten werden durch VASP verstärkt (90). Zusammen mit anderen Faktoren ist es vermutlich an den Umbildungen des Zytoskeletts beteiligt, die zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors führen. Die Phosphorylierung des Serins an Position 157 korreliert eng mit der Hemmung des Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa (13). Mäuse, denen das Gen für VASP fehlt,

haben leicht aktivierbare Thrombozyten, was sich möglicherweise durch die Tatsache erklären lässt, dass die Cyclonukleotid vermittelte Hemmung der Aggregation in den VASP *knock-out* Mäusen gestört ist: die Aggregationszeit nach einer Stimulation mit Collagen ist verkürzt und die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und die Expression von P-Selektin, einem Marker für die Plättchenaktivierung, ist verstärkt (75,91). Diese Befunde werden durch Beobachtungen in Endothelzellen gestützt: die Phosphorylierung von VASP führt zu einer verminderten Präsenz von VASP in den fokalen Kontakten, die mit einer Auflösung des Aktinfilamentsystems einhergeht. Zudem zeigen nicht-phosphorylierbare Mutanten des Proteins diesen Effekt nicht mehr (92). Diskutiert wird eine verstärkende Rolle von VASP auf die Aktinpolymerisation, die durch Phosphorylierung vermindert werden könnte (93). Kürzlich konnte eine Rolle von VASP in der Signalkaskade des G<sub>12/13</sub>-Proteins gezeigt werden (94).

## **2.2 Möglichkeiten der Manipulation der Thrombozytenregulation und deren Kontrolle**

In der Prävention und Therapie vaskulärer Erkrankungen spielt die Hemmung der Plättchenaggregation eine fundamentale Rolle. Wie alle Pharmaka nutzen auch die Thrombozytenfunktionshemmer die körpereigenen Regulationsmechanismen für ihre Wirkung. Dabei lassen sich zwei Typen von Aggregationshemmern unterscheiden: solche, die die Signalwege der Plättchenhemmung verstärken (95) und solche, die die Signalwege der Plättchenaktivierung hemmen (38). Für die Arzneimittelsicherheit eines Pharmakons ist die genaue Kenntnis der Wirkweise ebenso wie die Kontrolle der Wirkstärke und Wirkdauer von grundlegender Bedeutung.

### **2.2.1 Verstärkung endogener Mechanismen der Plättchenhemmung am Beispiel des Dipyridamols**

Eine Reihe von Medikamenten verstärken endogene Mechanismen der Plättchenhemmung, entweder durch eine direkte Stimulierung der cAMP bzw. cGMP vermittelten Signalwege oder durch eine Hemmung des Abbaus der Cyclonukleotide (95). Die Wirkweise des Dipyridamols verbindet beide Ansatzpunkte und deutet auf Grund seiner unterschiedlichen Wirkweisen auf eine strukturelle Verwandtschaft der beteiligten Signalmoleküle hin.

Dipyridamol ist seit Anfang der sechziger Jahre bekannt und wurde seither als Koronartherapeutikum eingesetzt. Fast 40 Jahre später erfuhr die Substanz durch die Ergebnisse der *European Stroke Prevention Study 2* (ESPS-2) eine Renaissance als Thrombozytenfunktionshemmer (96). In dieser Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie war die Behandlung mit retardiertem Dipyridamol ebenso wirkungsvoll wie die Behandlung mit niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (ASS) bei der Prävention von Sekundärschlaganfällen; die

Kombination aus beiden (Aggrenox®) war mehr als doppelt so wirkungsvoll wie die Therapie mit niedrigdosierter ASS alleine (96-99). Zahlreiche mögliche Mechanismen werden diesen klaren klinischen Befunden zu Grunde gelegt: eine Hemmung der Wiederaufnahme von Adenosin in rote Blutkörperchen (100,101), die Verringerung des Adenosinkatabolismus (102) und die direkte Stimulation der Freisetzung von endothelialelem PG-I<sub>2</sub> (103-107). *In vitro* erwies sich das Dipyridamol ist auch als ein PDE Hemmer (108-110). Jedoch konnte bislang nicht gezeigt werden, ob in klinisch relevanten Konzentrationen (= Bedingungen der ESPS-2: 1,4 – 4 µM (111)) eine PDE Hemmung und daraus resultierend ein verstärktes Cyclonukleotidsignal einen wichtigen Beitrag zur antithrombotischen Wirkung des Dipyridamols leistet.

### 2.2.2 Therapiekontrolle des Thrombozytenfunktionshemmers Clopidogrel

In der Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen kommt es zu einem Übergewicht prothrombotischer Mechanismen: durch Endothelläsion oder durch eine atherosklerotische Gefäßwandveränderung fallen zum einen Mechanismen der Plättchenhemmung weg, zum anderen sind im Bereich der Erkrankung aggregationsfördernde Faktoren verstärkt vorhanden. ADP wird z.B. aus verletzten Endothelzellen oder aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt und kann diese aktivieren. Thienopyridinderivate hemmen die ADP Wirkung und verhindern so eine Plättchenaggregation (59,112,113).

Die ersten Thienopyridinderivate wurden als Entzündungshemmer entwickelt. Ein Vertreter, das Ticlopidin (Tiklyd®) wurde als Plättchenhemmer erst viel später entdeckt (114) und nach einigen klinischen Studien auch als solcher etabliert (115). Neben leichten gastrointestinalen wurden auch schwerwiegende hämatologische Nebenwirkungen wie Leukozytopenie, Thrombozytopenie und Agranulozytose beobachtet, die erst nach Absetzen der Medikation verschwanden (116,117). Die Weiterentwicklung der Thienopyridine führte zum Nachfolger des Ticlopidins, dem Clopidogrel. Clopidogrel ist eine racemische Verbindung, bei der das S-Isomer das pharmakologisch aktive Stereoisomer ist. Zwar ist Clopidogrel wirkstärker als der Vorgänger (118), muss aber wie Ticlopidin als sogenanntes *Prodrug* auch erst in der Leber in den aktiven Metaboliten verstoffwechselt werden (119). Dies erfolgt wahrscheinlich über das Cytochrom P-450-1A (120). Diese Verbindung zeigt die schweren hämatologischen Nebenwirkungen des Ticlopidins nicht und ist im Allgemeinen gut verträglich (121). Die Wirksamkeit von Clopidogrel wurde an mehr als 20.000 Patienten in der CAPRIE Studie untersucht (*“Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events”*) (122). Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Clopidogrel das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses im Vergleich zur Standardtherapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) signifikant verminderte.

Clopidogrel kommt in der Prävention ischämischer Ereignisse bei Patienten mit atherosklerotisch bedingten Gefäßerkrankungen und akut bei operativen Eingriffen an Peripher- oder

Koronararterien ("stenting") zum Einsatz (118). Präoperativ wird meist mit einer Einmalgabe von 300 mg am Tag vor dem Eingriff aufgesättigt, um ein möglichst rasches Erreichen der therapeutisch notwendigen Plasmaspiegelkonzentration zu erreichen. An den folgenden Tagen wird mindestens vier Wochen lang mit 75 mg am Tag weiterbehandelt. Letzteres ist auch die übliche Dosierung in der Präventivbehandlung. Nach etwa einer Stunde ist die maximale Plasmakonzentration erreicht, die sich nach sieben Tagen auf einen stabilen Spiegel einpendelt ("steady-state") (118). Die Bestimmung der Plasmakonzentration erfolgt über den hauptsächlich inaktiven Metaboliten SR 26334. Die Resorption ist unabhängig von der Nahrungsaufnahme oder von einer zusätzlichen Einnahme von Antazida; die Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. acht Stunden (118). Clopidogrel bindet irreversibel an den ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> und hemmt die ADP induzierte Aggregation (56).

Obwohl keine strukturelle Ähnlichkeit zu ADP festzustellen ist, hemmen die Thienopyridine die ADP vermittelte Aktivierung von Plättchen hoch selektiv (siehe Abbildung 3, Kapitel 2.1.2). Angriffspunkt ist der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor (44,123,124), der über ein G<sub>i</sub>-Protein die Bildung von cAMP unterdrückt (112,121). *In vivo* führt die Behandlung mit Clopidogrel und Ticlopidin zu einer Aufhebung der ADP vermittelten Inhibition der stimulierten Adenylyl Cyclase und damit zu einem Wiederanstieg von cAMP und der VASP Phosphorylierung (113,125), einem Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase.

Auf der Grundlage dieses biochemischen Wirkmechanismus könnte die Wirkung der Thienopyridine genauer gemessen werden als mit der herkömmlichen Methode der Plasmaspiegelbestimmung. Letztere erlaubt nur halbquantitative Aussagen und korreliert im Falle eines *Prodrugs* nicht immer mit der tatsächlichen Wirkung des Arzneistoffes.

### **2.3 Zielsetzung**

Obwohl der ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> pharmakologisch gut untersucht ist und mit Clopidogrel und Ticlopidin auch zwei klinisch bedeutsame Antagonisten existieren, ist der biochemische Hintergrund seiner Rolle für die Plättchenfunktion nicht geklärt. Die Hemmung der Adenylyl Cyclase durch eine G<sub>i</sub>-Protein Aktivierung ist sehr gut belegt, doch scheint das nicht der entscheidende biochemische Mechanismus zu sein, über den der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor seine Wirkung auf die Aggregation und die Sekretion entfaltet (59-62). Zudem war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, ob und gegebenenfalls wie der Rezeptor einer Regulation durch Kinasen unterliegt. In einem ersten Teil dieser Arbeit war es daher das Ziel, einen neuen Effektor für den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor zu finden und zu prüfen, ob der P2Y<sub>12</sub> einer möglichen Regulation durch die cGMP-abhängige Kinase unterliegt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Effekte des Dipyridamols auf Thrombozyten untersucht. Die klaren klinischen Daten der ESPS-2 Studie legten die Vermutung eines hemmenden Effektes auf die Plättchenfunktion nahe, doch blieb der biochemische Wirkmechanismus des Dipyridamols unter diesen therapeutischen Bedingungen in Plättchen bisher unbewiesen. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und der Western Blot Technik wurde daher dieser Frage nachgegangen.

Die Plasmaspiegelbestimmung von Arzneistoffen wird häufig als klinischer Parameter für eine Therapiekontrolle (*"drug monitoring"*) angewandt. Jedoch erlaubt es diese Methode nicht, eine exakte Aussage über den Zeitpunkt eines ausgelösten Effektes oder auch über das Ausmaß der Funktionsänderung einer Zelle zu treffen. Das Ziel war es daher, einen Assay am Beispiel des Thrombozytenfunktionshemmer Clopidogrel zu entwickeln, der auf Grundlage des biochemischen Wirkmechanismus eine zielgenaue Kontrolle der Therapie ermöglichen sollte (*"effect monitoring"*).

### 3. MATERIALIEN

#### 3.1 Antikörper und Antiseren

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
M4	VASP		Kaninchen, polyklonal	immunoGlobe	1:1500
16C2	Phospho-VASP- Ser239		Maus, IgG1κ	nanoTools	1:100
IE273	VASP		Maus, IgG1κ	immunoGlobe	1 µg/ml End- konzentration
Anti-Mena	Mena		Maus, IgA	BD Transduction Laboratories	1:500
Anti- CD62P/RPE	P-Selektin (CD62P)	RPE	Maus, IgG	DAKO, Dänemark	10 µg/ml End- konzentration
Ziege-anti-Kani- nchen-HRP	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Amersham	1:2000
Ziege-anti-Mau- s-HRP	Maus IgG	HRP	Ziege	BioRad	1:2000
DELFLIA Anti-Maus IgG	Maus IgG	Europium	Kaninchen	PerkinElmer Wallac	25 ng/ml End- konzentration
Anti-Maus IgA	Maus IgA	HRP	Ziege	Sigma	1:5000

Tabelle 4: Antikörper und Antiseren. Abkürzungen: RPE: RPhycoerytrin, HRP: horseradish peroxidase, DELFLIA: Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay.

#### 3.2 Chemikalien und Lösungen

Adrenalin (Suprarenin®, Hoechst/Aventis)

Formaldehyd, 10% (Polysciences)

Milchpulver (Biorad)

PBS Dulbecco's, ohne Calcium, ohne Natriumbicarbonat (Life Technologies)

8-pCPT-cGMP (Biolog)

ECL™ *Western blotting analysis system* (Amersham Pharmacia Biotech)

DELFLIA-*Assay Buffer* (PerkinElmer Wallac)

DELFLIA-*Washing Solution* (PerkinElmer Wallac)

DELFLIA-*Enhancement Solution* (PerkinElmer Wallac)

Pertussis Toxin (Calbiochem)

Acrylamid 4K-Lösung, 30%, 37,5 : 1 (AppliChem)

Tween 20 (SERVA)  
[<sup>3</sup>H]Myristinsäure (9,10-<sup>3</sup>H(N)-myristic acid, Du Pont NEN)  
Ethanol (Baker)  
Chloroform (Baker)  
EDTA (Baker)  
Essigsäure (100%, Merck)  
Methanol (Baker)  
Phosphatidylethanol (Biomol)  
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck)  
Szintillationscocktail (Lumasafe Plus, Canberra-Packard Biosciences, Dreieich)  
Complete<sup>TM</sup> EDTA-frei (Roche Diagnostics)  
Dipyridamol (Persantin 10 mg/2ml®, Boehringer Ingelheim GmbH)  
Persantin Retard® (Phönix-Apotheke, Würzburg)  
Fetales Kälberserum (FCS, Life Technologies)  
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA, Life Technologies)  
Ro-31-8220 (Calbiochem)  
SQ 22,536 (Alexis)  
Isooctan (Merck)  
Silikonöl (Merck)  
ARC-69931MX (AstraZeneca, Charnwood, England)  
EHNA (9-*erythro*-(2-Hydroxy-3-n-nonyl)adenin, Biolog)  
2',5'-Dideoxyadenosin (Calbiochem)  
Fluoxetin (RBI)

Alle übrigen Reagenzien wurden im jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von der Firma Sigma bezogen.

### **3.3 Verbrauchsmaterialien**

*Protran Nitrocellulose Transfer Membrane* Porengröße 0,45 µm (Schleicher & Schuell)  
Röntgenfilme Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech)  
Mikrotiterplatten *Protein Immobilizer 96 well*, weiß (Exiqon)  
Mikrotiterplatten *Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate Maxiorp<sup>TM</sup> Surface* (Nalge Nunc International)  
Dialysekanüle venös 15G (Bionic Medizintechnik)  
S-Monovette 5 ml (Sarstedt)

Polypropylenröhrchen 12 ml (Greiner)  
Polypropylenröhrchen 50 ml (Greiner)  
Silikagelplatten (Kieselgel 60; 25 x 25 cm, Merck)  
Eppendorf-Caps (Eppendorf)  
Quarzküvetten (Hellma)  
Aggregationsröhrchen 7,25 x 55 mm, silikonisiert (Biodata)

### **3.4 Geräte**

Zentrifugen (Sigma 3K-1, Eppendorf *Centrifuge* 5415 C und 5417 R, Hettich Roto Silenta/K)  
Wasserbad (E12, Haake)  
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436)  
Heizblock (*test tube heater stuart scientific*, Heinse + Ziller)  
Elektrophoresekammer (Anfertigung Fa. Noras, Würzburg)  
Spannungsgeber (Anfertigung Fa.H.Hölzl, München und *Standard Power Pack P25* Biometra)  
Schüttler (*Rocking Platform*, Biometra)  
Schüttler (DELFI *Plateshake* 1296-003, PerkinElmer)  
Schüttelinkubatoren (Certomat H bzw. BS-1, Braun Biotech International)  
Entwickler (X-OMAT M 35, Kodak)  
pH-Meter (PHM 92 LAB, Radiometer Kopenhagen)  
Vortex Genie 2<sup>TM</sup> (Bender & Hobein)  
Gamma-counter (LB 2104, Berthold)  
Fluoreszenzspektrometer (*Luminescence Spectrometer* LS 50, PerkinElmer)  
*Microplate Washer* (Tecan)  
Szintillationszähler (Packard Liquid Scintillation Analyzer, Canberra-Packard Bioscience)  
Szintillationsgefäß (6 ml Pony-Vials, Packard Liquid Scintillation Analyzer, Canberra-Packard Bioscience)  
Hermle (Hermle Typ Z364, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)  
*Microplate Reader* (Wallac Victor<sup>2</sup> MTP-Reader 1420 *Multilabel Counter*, PerkinElmer)



## 4. METHODEN

### 4.1 Präparation humaner Thrombozyten

#### 4.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Thrombozyten werden aus frisch entnommenem, venösem Vollblut gesunder Spender isoliert, die mindestens zwei Wochen vor Entnahme keine die Plättchenfunktion beeinflussenden Medikamente eingenommen haben (10).

Das Blut wird mit einer Dialysekanüle (1,8 mm Durchmesser) aus der Armvene entnommen und im Verhältnis 5:1 mit vorgelegtem Citratpuffer gemischt. Dieses mit Citrat stabilisierte Blut wird in dieser Form für Versuche mit **Vollblut** eingesetzt.

Für die Präparation von **Plättchenreichem Plasma (PRP)** wird das so stabilisierte Blut sofort nach Entnahme für 20 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase (PRP) wird mit einer Plastikpipette abgenommen und für den weiteren Gebrauch in ein neues Plastikröhrchen überführt.

Zur Präparation von **gewaschenen Plättchen (WP)** wird das frisch entnommene Blut in Citratpuffer aufgenommen, das zusätzlich 15 mM EGTA enthält. Nach Gewinnung des PRPs nach obiger Beschreibung wird dieses für 10 min bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Resuspensionspuffer resuspendiert.

#### 4.1.2 Zellzählung und Stimulationsbedingungen

Zur Zählung der Thrombozyten wird die Suspension 1:100 mit Resuspensionspuffer verdünnt, 10 µl werden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen nach Auszählung dreier Gruppenquadrate mit einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt (Durchschnittliche Thrombozytenzahl x 250000 x 100 (Verdünnungsfaktor) = Thrombozytenkonzentration/ml Suspension).

Alle Versuche mit Thrombozyten werden im Wasserbad bei 37°C und unter ausschließlichem Einsatz von Kunststoffpipetten und –gefäßen durchgeführt um eine mögliche Aktivierung von Thrombozyten durch die polare Oberfläche der Glasinnenwand zu vermeiden.

Für den Stimulationsversuch wird die Plättchensuspension in Eppendorf Caps aliquotiert. Um eine Präaktivierung der Plättchen durch die rauhe Innenwand der Caps zu vermeiden, werden diese silikonisiert. Hierzu werden die Caps mit Sigmacote (Sigma) befüllt, nach drei Std geleert, mit demineralisiertem Wasser gewaschen und bei 80°C für 30 min "gebacken". Nach Abkühlen können die Caps einmalig für einen Stimulationsversuch verwendet werden.

Citratpuffer, pH 6,5:

100 mM	Natriumcitrat
7 mM	Zitronensäure
140 mM	Glucose
15 mM	EGTA (im Falle einer Präparation von WP)

Resuspensionspuffer, pH 7,4:

145 mM	NaCl
5 mM	KCl
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

## 4.2 Plättchenfunktion

### 4.2.1 Aggregation

Plättchenaggregation wird am BIO/DATA *Platelet Aggregation Profiler Model PAP-4* gemessen, bei dem die Aggregation über die optischen Dichte der Plättchensuspension bestimmt und als Kurve aufgezeichnet wird (10).

Gewaschene Plättchen werden nach Zählung in der Neubauerkammer auf eine Konzentration von  $3 \times 10^8$  Plättchen/ml eingestellt. Anschließend werden 0,3 ml Suspension bei 37°C und einer Magnetrührerfrequenz von 920 Umdrehungen/min vermessen.

Vor jeder Messung wird das Gerät mit einer Kontrollprobe (PPP, „*platelet poor plasma*“) auf 100% Transmission (entspricht 100% Aggregation) geeicht. Hierzu werden aus einer Probe der Zellsuspension die Zellen abzentrifugiert (2 min, 5000 x g). Der Überstand wird abgenommen und als Kontrollprobe eingesetzt.

### 4.2.2 Serotoninsekretion

Serotonin wird nach kovalenter Kopplung an ein Fluorochrom am Wallac Victor<sup>2</sup> Fluorimeter 1420 Multilabel Counter nach der Methode von Holmsen *et al.* (126) quantitativ bestimmt.

Zur Verstärkung des Serotoninsignals wird unmittelbar vor jeder Stimulation ein selektiver Serotonin Wiederaufnahme (*re-uptake*) Hemmer eingesetzt (Fluoxetin, 4 µM). Zur Bestimmung sezernierten Serotonins werden aus 0,8 ml gewaschener Thrombozyten nach Stimulation 350 µl Suspension entnommen und in eine Mischung aus 100 µl kaltem Silikonöl und 35 µl kalter EDTA-Lösung (50 mM, pH 7,4) pipettiert. Nach Vortexen der Proben für 15 sek, werden diese 30 sek bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Zur

Bestimmung des Gesamtserotoningehaltes einer Probe wird analog verfahren, jedoch entfällt der Zentrifugationsschritt.

270 µl Überstand werden in ein neues Cap pipettiert und mit 60 µl kalter, 100%-iger TCA versetzt. Nach kurzem Vortexen werden die Proben für 2 min bei 14000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur zentrifugiert.

250 µl Überstand werden in 2 ml Eppendorf-Caps überführt, in denen 1,0 ml OPT-Reagenz vorgelegt war. Nach 10-minütigem Kochen bei 100°C werden die Proben vollständig in 12 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und dreimal mit 2 - 3 ml Chloroform gewaschen. Anschließend werden 200 µl in ein 96-er Wellplate pipettiert und die Proben bei 355 nm angeregt. Die Emissionswellenlänge beträgt 475 nm.

OPT-Reagenz:

1 + 10 (1 : 11) Mischung aus

o-Phthalaldehyd (OPT) 0,5% in Ethanol (w/v) und

8 N HCl

#### 4.2.3 P-Selektin Expression

Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche wird am Durchflußzytometer mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers bestimmt (125).

Nach Stimulation von 100 µl PRP wird die Reaktion mit 10 µl Formaldehyd 10% abgestoppt und für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Für 1 min werden die Proben bei 2700 x g zentrifugiert und anschließend das Pellet in 150 µl PBS Puffer mit 0,5% BSA resuspendiert. 50 µl davon werden mit 10 µl anti-CD62P/RPE versetzt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden durchflußzytometrisch am FACSCalibur der Firma Becton Dickinson vermessen. Als Kontrolle für die unspezifische Bindung des Antikörpers dient die Bindung des Antikörpers an ruhende (= nicht stimulierte) Thrombozyten.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm CellQuest (Version 1.0, Becton Dickinson). In Form von Histogrammen wird die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität dient dabei als Maß für die Menge an gebundenem Antikörper bzw. an exprimiertem P-Selektin.

#### 4.2.4 Thromboxan-Synthaseaktivität

Bei Stimulation der thrombozytären Thromboxansynthase entstehen Thromboxan A<sub>2</sub> und Malondialdehyd im Verhältnis 1 : 1. Durch die Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd und der anschließenden fluorimetrischen Messung des entstehenden Produkts lässt sich die Aktivität der Thromboxansynthase quantitativ bestimmen (127).

Nach Stimulation von 700 µl Plättchensuspension bekannter Konzentration bei 37°C wird die Reaktion mit 400 µl 20%-iger TCA abgestoppt, 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 14.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. 600 µl Überstand werden mit 600 µl 0,53%-iger Thiobarbitursäurelösung für 30 min bei 70°C erhitzt und nachfolgend für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 700 µl Probe werden fluorimetrisch vermessen. Die Anregungswellenlänge beträgt 533 nm, die Emissionswellenlänge 550 nm.

Zur Erstellung der Standardkurve wird mit dem Malondialdehydderivat 1,1,2,2 Tetraethoxypropan wie mit den zu bestimmenden Proben verfahren. Die Umsetzung mit Thiobarbitursäure wird als vollständig angenommen. Folgende Endkonzentrationen werden vermessen: 2000 nM, 1500 nM, 1000 nM, 750 nM, 500 nM, 200 nM, 100 nM und 20 nM. Die Verdünnungen erfolgen im Phosphatpuffer.

Phosphatpuffer, pH 7,4

10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,36 g/l)

50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4,45 g/l)

Thiobarbitursäurelösung

0,53% in Phosphatpuffer

TCA, 20%

62,5 ml HCl, 1 M

17,5 ml Aqua dest.

20 ml TCA, 100%

Malondialdehydstandard: 1,1,2,2 Tetraethoxypropan, 0,92 g/ml

10 mM 23,9 µl in 10 ml Ethanol gelöst (= Stocklösung)

### **4.3 Analyse von sekundären Botenstoffen**

#### 4.3.1 Bestimmung von cAMP

Nach Stimulation werden 300 µl PRP 10 sek lang bei 10.000 Umdrehungen/min (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl eisgekühltem 70%-igen Ethanol suspendiert. Nach 30 min auf Eis werden die Proben bei 4°C für 10 min bei 14.000 Umdrehungen/min (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Cap überführt. Das Pellet wird mit 300 µl eiskaltem 70%-igen Ethanol wieder resuspendiert und erneut 10 min bei 14.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wird zum Überstand des

ersten Zentrifugation gegeben und die Proben (800 µl) vakuumgetrocknet. Das resultierende Pellet wird in 500 µl Assaypuffer (50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,8) gelöst (113).

Der Gehalt an cAMP in humanen Thrombozyten wird bestimmt mit dem Radioimmunoassay Biotrak für cAMP [<sup>125</sup>J] von Amersham Pharmacia Biotech. Die Durchführung erfolgt nach dem Assay-Standardprotokoll. Die Proben werden am Gammacounter gezählt.

#### 4.3.2 Calciummessung an intakten Thrombozyten

Intrazelluläres Calcium wird nach Komplexierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff fluorimetrisch bestimmt (10).

Für Calciummessungen werden 200 ml Blut/Citrat Mischung verwandt. Um eine Desensibilisierung der Rezeptoren oder Aktivierung der Thrombozyten durch Spuren an ADP zu verhindern, wird dem PRP 0,1 Einheiten/ml Apyrase zugesetzt. Zusätzlich wird der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 in Form seines Acetoxymethylesters als 0,4 mM Lösung in DMSO eingesetzt (Endkonzentration des Farbstoffs = 4 µM, 1% (v/v) DMSO). Die Inkubation erfolgt dann bei 37°C für 45 min im Wasserbad. Anschließend erfolgt die Präparation von gewaschen Plättchen wie unter Kapitel 4.1.1 beschrieben. Das Pellet wird in 50 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Der Suspension werden 1 mM Calciumchlorid und erneut 0,1 Einheiten/ml Apyrase zugesetzt. Bis zur Messung werden die Zellen bei 20°C aufbewahrt, da bei höherer Temperatur der Farbstoff sehr schnell aus den Zellen diffundiert.

Für die Versuche werden 2,5 ml gewaschene Plättchen in 10 mm Quarzküvetten überführt, mit einem kleinen Magnetrührer versehen und in einem thermostatierten (37°C) Platzhalter gestellt. Calciumsignale werden bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (Spaltweite 10 nm) und einer Emissionswellenlänge von 510 nm (Spaltweite 6 - 7 nm) im Perkin Elmer LS-50 Fluoreszenzspektrometer bestimmt.

### 4.4 Biochemische Methoden

#### 4.4.1 Analyse der VASP-Phosphorylierung

VASP und die Phosphorylierung von VASP werden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Methode von Lämmli, 1970) und Western Blot mit Hilfe von Antikörpern bestimmt.

Nach Stimulation werden 300 µl PRP für 10 sek bei 14.000 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl heißer 1 x SDS-Lösung aufgenommen. Anschließend werden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht. Gegebenenfalls werden die Proben danach bei -20°C eingefroren.

Vor dem Auftragen auf das Acrylamidgel werden die Proben mit 3 µl β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 80°C erhitzt. Pro Geltasche werden zwischen 15 und 20 µg Gesamtprotein

aufgetragen. Während der Elektrophorese wird zur Fokussierung der Proteine im Sammelgel eine Spannung von 100 V angelegt, zur Auftrennung im Trenngel eine Spannung von 150 V.

Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (NC) übertragen. Der Transfer erfolgt mit Hilfe eines *Semi-dry Blotters* (Biometra). Eine konstante Stromstärke von 350 mA wird für 30 min angelegt (5 mA/cm<sup>2</sup> NC).

Zur Transferkontrolle werden die Proteine mit Ponceau-S angefärbt. Zur Entfernung allen Ponceau S und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran in frisches Blockmedium gelegt und für 1 Std bei Raumtemperatur geschwenkt oder direkt bei 4°C über Nacht gelagert.

Die Erstantikörper werden in Blockmedium verdünnt (siehe Tabelle 4) und für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen der NC mit PBS-T wird für 1 Std bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase konjugierten Zweitantikörper inkubiert (siehe Tabelle 4). Anschließend wird der ungebundene Antikörper durch Waschen entfernt.

Für die ECL-Detektion wird nach dem Protokoll des ECL<sup>TM</sup> Western *blotting analysis system* verfahren. Die chemolumineszierenden Banden werden mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Zur quantitativen Auswertung werden die entwickelten Filme mit dem Programm *PhotoLook* (Agfa-Gevaert N.V.) eingescannt und der Schwärzungsgrad der Banden mit dem Programm NIH1.61 Image erfasst.

Um ECL-Reagenz und Antikörperkomplex von der Nitrocellulosemembran zu entfernen, wird die NC erst mit PBS-T für 10 min gewaschen und anschließend im *stripping-buffer* für 30 min bei 50°C geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml PBS-T wird die NC 1 Std bei Raumtemperatur geblockt. Trotz Proteinverlust konnte der Blot anschließend einmalig für eine erneute Antikörperinkubation eingesetzt werden.

3 x SDS-Lösung:

200 mM	Tris
6%	SDS
15%	Glycerin
0,003%	Bromphenolblau

ad 100 ml aqua dest.

1 x SDS-Lösung:

450 µl      3 x SDS  
50 µl      β-Mercaptoethanol  
1 ml      aqua dest.

Trenngel (9% Acrylamid):

3 ml      30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid  
1,25 ml    3 M Tris-HCl pH 8,9  
100 µl    10%-ige SDS-Lösung  
5 µl      TEMED  
5,61 ml    aqua dest.  
100 µl    APS 10%

Sammelgel (3% Acrylamid)

0,5 ml      30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid  
0,625 ml    0,5 M Tris-HCl, pH 6,7  
50 µl      10%-ige SDS-Lösung  
2,5 µl      TEMED  
3,625 ml    aqua dest.  
200 µl      APS 10%

Elektrophoresepuffer, pH 8,9:

25 mM      Tris  
0,2 M      Glycin  
0,1%      SDS

*Semi-Dry* Transferpuffer, pH 8,3:

25 mM      Tris  
150 mM     Glycin  
10%      Methanol

Ponceau-S Lösung:

0,1% Ponceau-S in 5% Essigsäure

PBS-T Puffer, pH 7,4:

10 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$   
150 mM NaCl  
0,1% Tween 20

Blockmedium:

5% Milchpulver in PBS-T Puffer

"stripping buffer", pH 6,7:

62,5 mM Tris  
2% SDS  
70  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol/10 ml Puffer frisch dazugeben

#### 4.4.2 Analyse der Phospholipase D Aktivität

Phospholipase D (PLD) hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin. Zur Bestimmung der PLD Aktivität wird mit [ $^3\text{H}$ ] radioaktiv markiertes Phosphatidylcholin eingesetzt, das nach Hydrolyse in Gegenwart von Ethanol als stabiles Phosphatidylethanol nachweisbar ist (128).

Zur radioaktiven Markierung des Phosphatidylcholins mit [ $^3\text{H}$ ] Myristinsäure wird eine Thrombozytenkonzentration von  $2 \times 10^9/\text{ml}$  eingestellt. Nach Eindampfen von 80  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] Myristinsäure unter  $\text{N}_2$  werden die Thrombozytensuspension und zwei Metallkugeln zugefügt und für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad über einem Magnetrührer markiert.

Für den Stimulationsversuch wird die Thrombozytensuspension mit Resuspensionspuffer auf eine Konzentration von  $5 \times 10^8/\text{ml}$  verdünnt. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wird ein Metallkugeln vorgelegt und darin 200  $\mu\text{l}$  der Thrombozytensuspension im Thermomixer bei  $37^\circ\text{C}$  und 900 rpm in der Gegenwart von 0,5% Ethanol stimuliert. Die Reaktion wird anschließend mit 1 ml kaltem Methanol abgestoppt und nachfolgend 10 min auf Eis gehalten.

Die Lipidextraktion wird nach der Methode von Bligh und Dyer vorgenommen (Martinson *et al.*, 1990). Ein Probenvolumen von 1200  $\mu\text{l}$  wird in 4,5 ml Zentrifugenröhrchen (75 x 12 mm, Sarstedt) überführt, mit 0,7 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 1 ml Chloroform versetzt (das Verhältnis  $\text{H}_2\text{O} : \text{Methanol} : \text{Chloroform}$  entspricht 0,9 : 1 : 1, (v/v)). Nach zweimaligem Ausschütteln werden die Proben bei  $7000 \times g$  für 20 min zentrifugiert (Hermle). Die wässrige Phase wird abgesaugt, die organische Lipidphase zu 750  $\mu\text{l}$  in 1,5 ml Eppendorf-Caps überführt und unter  $\text{N}_2$  eingedampft.

Die Proben werden in je 10  $\mu\text{l}$  der Standards Phosphatidylethanol (0,5 mg/ml) und Phosphatidsäure (0,5 mg/ml) aufgenommen und danach auf Silikagelplatten aufgetragen. Das verwendete Laufmittel besteht aus 46% (v/v) Ethylacetat, 7% (v/v) Isooctan, 11% (v/v) Essigsäure



(100%) und 36% (v/v) H<sub>2</sub>O. Alle Laufmittelkomponenten werden kräftig gemischt, die wässrige Phase anschließend verworfen und die organische Phase für die Trennung in einer Glaskammer verwendet. Bei dieser Auftrennung werden Phosphatidylethanol und Phosphatidsäure von den anderen Phospholipiden und neutralen Lipiden separiert. Die Platten werden an der Luft getrocknet und die Phospholipide mit Ioddämpfen in einer Glaskammer unter dem Abzug angefärbt.

Die Platten werden mit Wasser befeuchtet, die Phosphatidylethanolflecken sowie drei Gesamphospholipidstandards abgekratzt und in 5 ml Szintillationsgefäße überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml H<sub>2</sub>O und 4 ml Szintillationscocktail wird drei Stunden inkubiert und nachfolgend mit einem Szintillationszähler für 10 min der radioaktive Zerfall pro Minute bestimmt.

#### 4.4.3 Phospho-VASP Assay

Der Phospho-VASP Assay der Fa. Vasopharm Biotech ermöglicht die quantitative Bestimmung des VASP-Phosphorylierungsstatus im humanen Vollblut (bislang nicht publiziert). Die Detektion des VASP-Proteins und dessen Phosphorylierung erfolgt dabei mit Hilfe monoklonaler Antikörper der Klasse IgG1κ, die über einen polyklonalen Europium markierten Anti-Maus IgG im DELFIA-System (PE Wallac) nachgewiesen werden.

Mikrotiterplatten (96er Well) werden für 18 Std mit einer GST-Zyxin(1-142) Lösung (5 µg/ml in PBS, pH 7,4) beschichtet (100 µl/Well) und dreimal mit PBS-T gewaschen (je 350 µl/Well).

Zur Gewinnung der Blutproben werden 700 µl Vollblut mit 700 µl Lysepuffer gemischt. Darin enthaltene Inhibitoren von Proteasen, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen stabilisieren den VASP Phosphorylierungsstatus nach Lyse der Blutzellen.

Die Blutproben werden anschließend auf die Mikrotiterplatte aufgetragen (je 100 µl/Well) und für 1 Std bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachfolgend wird die Platte viermal mit PBS-T gewaschen (je 350 µl/Well).

Die Erst- und Zweitantikörperinkubation erfolgt jeweils 1 Std lang bei Raumtemperatur (je 100 µl/Well). Die eingesetzten Konzentrationen sind aus Tabelle 4 zu entnehmen. Zwischen Erst- und Zweitantikörperinkubation und nach Zweitantikörperinkubation wird die Platte jeweils dreimal mit DELFIA *Wash Solution* gewaschen (350 µl/Well).

Zur Verstärkung des Signals wird danach für 15 min mit DELFIA-*Enhancement Solution* inkubiert. Die Messung von VASP und Phospho-VASP-Ser239 erfolgt mit einem PE Wallac Victor<sup>2</sup> MTP-Reader 1420 *Multilabel Counter* und dem Programm PD-Eu VLO.

Lysepuffer (2 fach):

40 mM	Tris
150 mM	NaCl
50 mM	EDTA
50 mM	EGTA
2%	Desoxycholat
2%	Triton X-100
0,1%	SDS
50mM	Natriumpyrophosphat
1 Tabl./5 ml	<i>Complete</i> <sup>TM</sup> EDTA-free, frisch dazugegeben

Lysepuffer

10 x PBS, pH 7,4:

2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,74 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
137 mM	NaCl

PBS-T, pH 7,4:

PBS mit 0,05% Tween 20 (w/v)

## 4.5 Sonstige Methoden

### 4.5.1 Permeabilisierung von Plättchen

Die Permeabilisierung der Plättchenmembran mit Saponin ermöglicht die Verwendung von Inhibitoren oder Aktivatoren, die auf Grund von Größe oder Hydrophilie die Zellmembran nicht passieren konnten.

Zu diesem Zweck wird das pelletierte PRP nach der Methode von Authi *et al.* (129) in zytosolischem KCl-Puffer resuspendiert. Eine Zellzahl von  $2-3 \times 10^8$  Zellen/ml wird eingestellt und die Suspension wird zur Equilibrierung 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Permeabilisierung der gewaschenen Zellen werden der Suspension dann 10-14 µg/ml Saponin hinzugefügt (37°C). Nach 45 sek konnte mit dem Inhibitor/Aktivator inkubiert werden. Die Stimulation der Proben wird spätestens nach 8 min abgestoppt.

Zytosolischer KCl-Puffer, pH 7,4:

1 mM	Glucose
140 mM	KCl
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,42 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
6 mM	NaHCO <sub>3</sub>
10 mM	HEPES

#### 4.6 *In vivo* Studien zu Thrombozytenfunktionshemmern

##### 4.6.1 Dipyridamol Probandenstudie

An der Studie nahmen fünf gesunde Probanden teil, 3 Frauen und 2 Männer im Alter von 22 bis 31 Jahren. Sie erhielten für sieben Tage zweimal täglich Persantin Retard® (Dipyridamol 200 mg, retard). Die Blutentnahme erfolgte vor, drei Std nach Einnahme der ersten Dosis, sieben Tage nach Therapiebeginn und 44 Std nach Einnahme der letzten Dosis. Nach Isolierung der Thrombozyten wurden der Plasmaspiegel von Dipyridamol und die VASP Phosphorylierung bestimmt (siehe dazu Kapitel 4.4.1).

	<b>Tag 0 Vor Einnahme</b>	<b>Tag 1 3 Std nach erster Einnahme</b>	<b>Tag 7 konstanter Wirkspiegel</b>	<b>Tag 10 44 Std nach letzter Einnahme</b>
<b>Einnahme Dipyridamol</b>	-	8.00h und 18.00h peroral	8.00h und 18.00h peroral	8.00h und 18.00h peroral
<b>Blutabnahme</b>	8.00h	11.00h	11.00h	8.00h
<b>Analyse der VASP Phosphorylierung aus PRP</b>	VASP-Ser239/157 Phosphorylierung stimuliert durch SNP 0,5µM und SNP 0,3µM + PG-E <sub>1</sub> 0,3 nM	VASP-Ser239/157 Phosphorylierung stimuliert durch SNP 0,5µM und SNP 0,3µM + PG-E <sub>1</sub> 0,3 nM	VASP-Ser239/157 Phosphorylierung stimuliert durch SNP 0,5µM und SNP 0,3µM + PG-E <sub>1</sub> 0,3 nM	VASP-Ser239/157 Phosphorylierung stimuliert durch SNP 0,5µM und SNP 0,3µM + PG-E <sub>1</sub> 0,3 nM
<b>Plasmaspiegel-be stimmung bei Boehringer Ingelheim</b>	Einfrieren von 2 ml unstimulierten Vollblutes	Einfrieren von 2 ml unstimulierten Vollblutes	Einfrieren von 2 ml unstimulierten Vollblutes	Einfrieren von 2 ml unstimulierten Vollblutes

Tabelle 5: Studienprotokoll der Dipyridamol Probandenstudie

Nach Vorliegen des positiven Votums der Würzburger Ethikkommission wurde die Studie dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) vorgelegt (Vorlagenummer: 4016535) und nachfolgend der Regierung von Unterfranken angezeigt. Die Probanden unterschrieben eine Einverständniserklärung und wurden über die Gerling Industrie GmbH versichert.

#### 4.6.2 Clopidogrel Patientenstudie

An der Studie nahmen insgesamt dreizehn Patienten teil (9 männlich, 4 weiblich, Alter unbekannt), die auf Grund eines möglichen operativen Eingriffs an Peripher- oder Koronararterien mit Clopidogrel therapiert werden sollten.

Diese wurden aufgeteilt in drei Gruppen:

- sieben Patienten, die aus medizinischen Gründen ohne Clopidogrelbehandlung blieben oder denen vor einer Clopidogrelbehandlung Blut entnommen worden war;
- zwei Patienten, die am Vortag der Blutentnahme mit 4 x 75 mg Clopidogrel behandelt wurden (Sättigungsdosis) und
- drei Patienten, die drei bis 5 Tage vor Blutentnahme mit 4 x 75 mg Clopidogrel und nachfolgend mit 1 x 75 mg/Tag therapiert wurden.
- ein Patient, der über 2 Wochen mit 1 x 75 mg/Tag Clopidogrel therapiert wurde

Ausschlusskriterien waren eine Behandlung mit Trinitrosan® oder mit Prostavasin® (NO Donor bzw. Prostaglandinderivat).

Das Patientenkollektiv stammte aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg (Röntgendiagnostik).

	vor Einnahme von Clopidogrel	12 h nach erster Einnahme von Clopidogrel	3 bis 5 Tage nach erster Einnahme von Clopidogrel	Clopidogrel-behandlung seit mehr als 2 Wochen
<b>Clopidogrel-behandlung</b>	erst <u>nach</u> Blutentnahme: 4 x 75 mg	4 x 75 mg, p.o.	4 x 75 mg am ersten Tag, nachfolgend 1 x 75 mg/Tag	4 x 75 mg am ersten Tag, nachfolgend 1 x 75 mg/Tag
<b>Blutentnahme</b>	5 ml in Citratröhrchen	5 ml in Citratröhrchen	5 ml in Citratröhrchen	5 ml in Citratröhrchen
<b>Analyse der VASP Phosphorylierung</b>	VASP-Ser239-Phosphorylierung nach Ilo 10 nM und ADP 10 µM/Ilo 10 nM Stimulierung	VASP-Ser239-Phosphorylierung nach Ilo 10 nM und ADP 10 µM/Ilo 10 nM Stimulierung	VASP-Ser239-Phosphorylierung nach Ilo 10 nM und ADP 10 µM/Ilo 10 nM Stimulierung	VASP-Ser239-Phosphorylierung nach Ilo 10 nM und ADP 10 µM/Ilo 10 nM Stimulierung

Tabelle 6: Studienprotokoll Clopidogrel Patientenstudie. Abkürzung: Ilo: Iloprost.

Die VASP-Phosphorylierung wurde mit Hilfe des DELFIA-Phospho-VASP Assays der Fa. Vasopharm Biotech bestimmt (siehe dazu Kapitel 4.4.3).

#### 4.7 Statistische Methoden

Die abgebildeten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichung (*„standard deviation“*) von wenigstens vier verschiedenen Blutspendern dar ( $n > 3$ ). Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der 2-way-ANOVA durchgeführt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Als Signifikanzschwelle wurde ein  $p$ -Wert von  $< 0,05$  angenommen.

##### *Die Berechnung der Signifikanz am Beispiel des Dipyridamoleffekts auf die stimulierte VASP Phosphorylierung*

Die ANOVA Analyse wurde genutzt, um die Hypothese zu testen, ob Dipyridamol (DP) einen Einfluss auf die SNP Wirkung in Thrombozyten hat.

Es liegen die Faktoren SNP mit den drei Faktorstufen (*levels*) Konzentrationen 0, 1, 2 und Dipyridamol mit den beiden *levels* „+“ und „-“ vor. Üblicherweise wird das lineare Modell

$$y = m + a + b + (ab) + e$$

(genauer:  $y_{ijk} = m + \text{SNP}_i + \text{DP}_j + (\text{SNP} \cdot \text{DP})_{ij} + e_{ijk}$ )

angenommen, wobei

y: die abhängige Variable ist,

m: eine Konstante,

a: den ersten Faktor (hier SNP mit  $i=1\dots3$ ),

b: den zweiten Faktor (hier DP mit  $j=1\dots2$ ),

(ab): die Interaktion zwischen a und b und

e: einen (zufälligen) Fehler (mit Erwartungswert 0) symbolisieren sollen.

Mittels der ANOVA werden m, a, und (ab) geschätzt. Wenn a und b sich nicht gegenseitig beeinflussen, d.h. sich additiv verhalten, verschwindet der Koeffizient von (ab).

Die Testhypothese, ob eine Interaktion vorliegt, lautet also

$$H_0: (ab)_{ij} = 0$$

Kann sie verworfen werden, d.h. ist sie signifikant von 0 verschieden, liegt eine Interaktion vor. Man könnte noch weitere Hypothesen aufstellen, nämlich ob die Faktoren überhaupt einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Bei einer Ermittlung signifikanter Ergebnisse bei der ANOVA wird üblicherweise eine *post-hoc* Analyse durchgeführt, um zu sehen, welche Werte sich genau von anderen unterscheiden. Darauf ist in diesem Fall verzichtet worden.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Regulation des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors durch cGMP-stimulierte Proteinkinase

Wie unter Kapitel 2.1.3 beschrieben hemmt die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) zahlreiche Plättchenfunktionen durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine (7,9). Viele dieser Zielmoleküle der cGK sind noch nicht identifiziert. Der ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> stellt einen bedeutenden Rezeptor in der komplexen Regulation der primären Hämostase dar, dessen Hemmung durch Clopidogrel therapeutisch nutzbar ist (122). In den folgenden Untersuchungen wurde daher der Frage nachgegangen, ob der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor einer funktionellen Hemmung durch die cGK unterliegt.

Die Funktion des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors wurde über die Verringerung stimulierter, intrazellulärer cAMP Spiegel gemessen (siehe Kapitel 2.1.2, Abbildung 3). Aufgrund der hohen Variabilität physiologischer cAMP Konzentrationen war eine Auswertung der Messungen über die erzielten Absolutkonzentrationen nicht möglich. Daher wurde der PG-E<sub>1</sub> stimulierte cAMP Anstieg als 100% Wert für jeden Spender angenommen und die entsprechenden Messwerte als Prozentanteil dieser PG-E<sub>1</sub> Stimulation errechnet.

In Voruntersuchungen wurden der Zeitpunkt und die Konzentration der einzusetzenden Verbindungen über die Kinetiken und über die Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt (siehe Tabelle 7).

Verbindung	gemessener Effekt	Zeitspanne, in der der Effekt konstant blieb	gewählte Inkubationszeit bei 37°C	gewählte Endkonzentration
PG-E <sub>1</sub>	cAMP-Konzentration	1 - 4 min	2 min	1 µM
ADP, Adrenalin oder ddA	Erniedrigung PG-E <sub>1</sub> stimulierter cAMP Spiegel (2 min Wert)	1 – 4 min	2 min	5 µM (ADP, Adr.) 100 µM (ddA)
SNP	VASP Phosphorylierung	3 – 5 min	4 min	100 µM
8CPT	VASP Phosphorylierung	15 – 60 min (längere Inkubationszeit nicht getestet)	20 min	1 mM

Tabelle 7: Vorversuche: Ermittlung geeigneter Konzentrationen und Inkubationszeiten für die eingesetzten Verbindungen in Plättchen-reichem Plasma. Abkürzungen: SNP: Natrium Nitroprussid, 8CPT: 8pCPT-cGMP, ddA: 2',5'-Dideoxyadenosin.

Eine Stimulation von PRP mit dem NO-Donor Natrium Nitroprussid (SNP), mit ADP oder eine gleichzeitige Stimulation mit beiden Verbindungen führte zu keiner signifikanten Veränderung des basalen cAMP Spiegels (= unstimulierte Plättchen). Jedoch löste unter den gleichen Bedingungen PG-E<sub>1</sub> (1 µM) einen 10-fachen Anstieg an cAMP aus, was einer Konzentration von etwa 80-100 pmol cAMP/10<sup>9</sup> Plättchen entsprach (Abbildung 4).

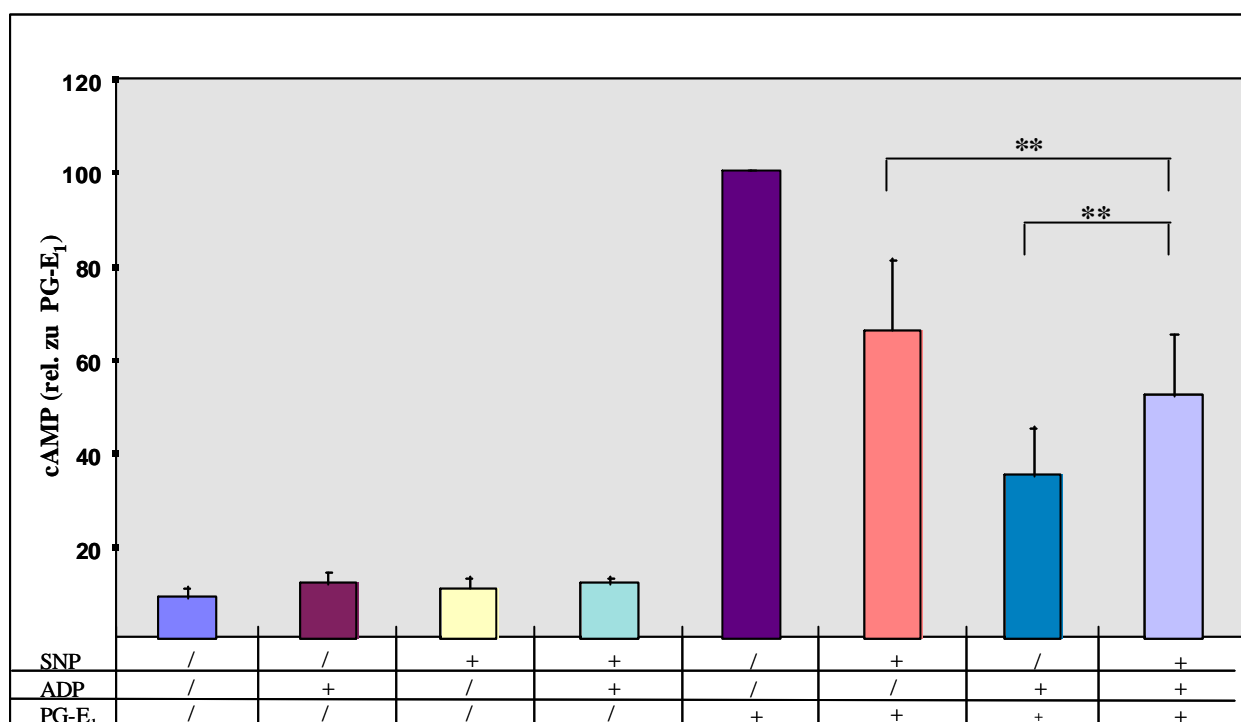


Abbildung 4: Die ADP vermittelte Hemmung der Adenylyl Cyclase über die Aktivierung des G<sub>α<sub>i</sub></sub> wird durch Stimulation der Guanylyl Cyclase mit dem NO-Donor SNP gehemmt. Humane Thrombozyten wurden entweder mit 5 µM ADP, 1 µM PG-E<sub>1</sub>, 100 µM SNP oder mit Kombinationen aus diesen Verbindungen inkubiert. Die angegebenen cAMP Konzentrationen sind in Relation gesetzt zu der Menge an cAMP, die nach Stimulation mit 1 µM PG-E<sub>1</sub> gemessen wurde. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dar, die aus sechs verschiedenen Experimenten (Blutspendern) ermittelt wurden. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  angenommen.

Dieser PG-E<sub>1</sub> stimulierte Anstieg konnte jeweils mit ADP und mit SNP gehemmt werden. Mit 5 µM ADP war der von PG-E<sub>1</sub> ausgelöste Anstieg an cAMP um 65% vermindert. SNP in einer Konzentration von 100 µM führte ebenfalls zu einer deutlichen Minderung des PG-E<sub>1</sub> induzierten cAMP Anstiegs, der nur noch etwa 60% der ursprünglichen PG-E<sub>1</sub> Stimulation betrug.

Die Kombination aus ADP und SNP resultierte anders als erwartet nicht einer völligen Unterdrückung des stimulierten cAMP Anstiegs, sondern führte zu einem Spiegel, der 14% niedriger lag als der der SNP + PG-E<sub>1</sub> Kombination, aber 17% höher als der der ADP + PG-E<sub>1</sub> Kombination (Abbildung 4).

Ein ähnlicher, aber deutlicherer Effekt wurde bei einer Inkubation der Plättchen mit Adrenalin gemessen (Abbildung 5). Wie ADP führt auch Adrenalin über eine Rezeptor vermittelte Aktivierung



eines G<sub>i</sub>-Proteins zu einer Senkung stimulierter cAMP Spiegel (siehe dazu Kapitel 2.1.2, Abbildung 3). Adrenalin unterdrückte den PG-E<sub>1</sub> induzierten cAMP Anstieg um 80%, führte aber in Kombination mit SNP, wie im Falle des ADPs, zu einer verminderten Unterdrückung der cAMP Bildung (70%). Wiederum war diese Hemmung stärker ausgeprägt als die Unterdrückung der PG-E<sub>1</sub> stimulierten cAMP Bildung durch SNP alleine (60%).

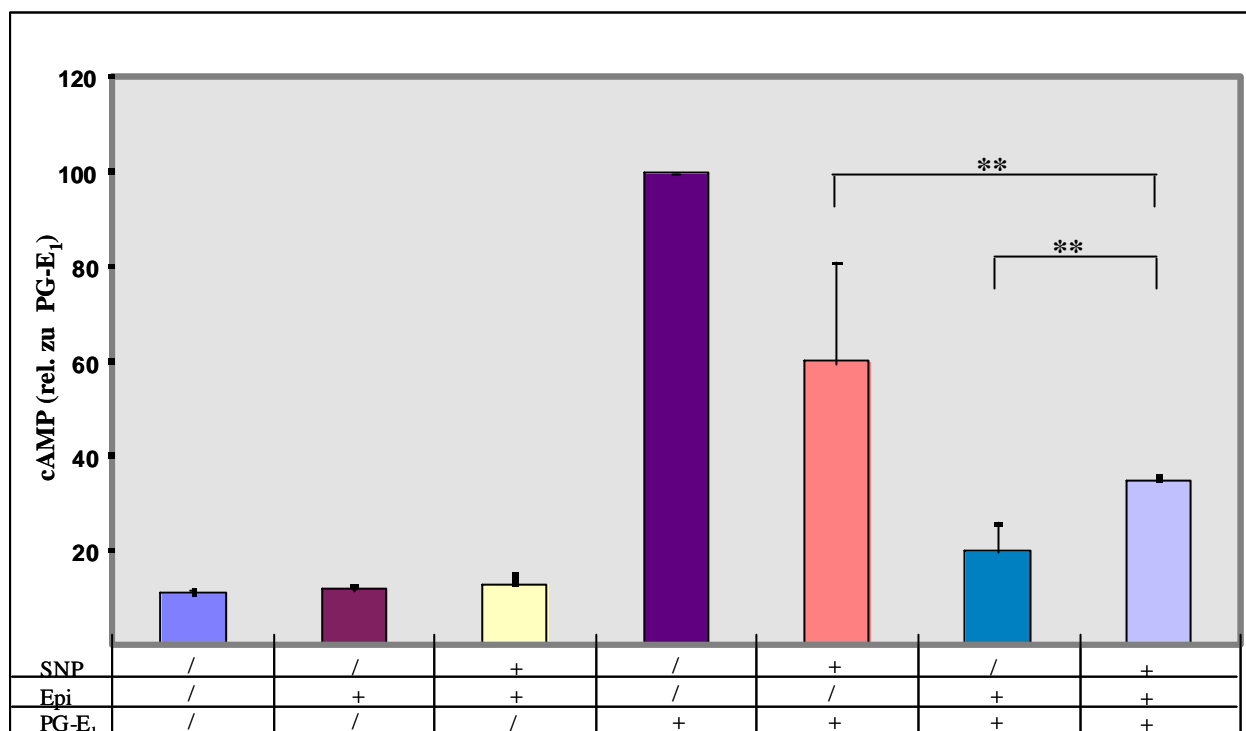


Abbildung 5: Die Hemmung der Adenylyl Cyclase durch Adrenalin (Epi) wird aufgehoben durch die Stimulation der Guanylyl Cyclase mit dem NO-Donor SNP. Humane Thrombozyten wurden mit entweder 5  $\mu$ M Adrenalin (Epi), 1  $\mu$ M PG-E<sub>1</sub>, 100  $\mu$ M SNP oder mit Kombinationen aus diesen Verbindungen inkubiert. Die angegebenen cAMP Konzentrationen sind in Relation gesetzt zu der Menge an cAMP, die nach Stimulation mit 1  $\mu$ M PG-E<sub>1</sub> gemessen wurden. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dar, die aus vier verschiedenen Experimenten (Blutspendern) ermittelt wurden. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  angenommen.

Eine Verminderung des PG-E<sub>1</sub> vermittelten Anstiegs durch SNP könnte durch zwei Mechanismen erfolgen: das durch SNP Stimulation gebildete cGMP aktiviert die Phosphodiesterase 2 (PDE 2), die dann cAMP hydrolysieren kann. Dieser Mechanismus ist bekannt und für Thrombozyten gut beschrieben (15,23). Eine SNP Stimulation führt aber auch zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (83). Möglicherweise führt diese dann zu einer Phosphorylierung und damit einer partiellen funktionellen Inaktivierung von Signalmolekülen, die an der G-Protein vermittelten Senkung von stimulierten cAMP Spiegel beteiligt sind. Um diese Vermutung zu klären, wurde der selektive cGK Aktivator 8pCPT-cGMP (8CPT) eingesetzt (130). Diese membrangängige Verbindung aktiviert selektiv die cGMP-abhängige Proteinkinase, aber nicht die Phosphodiesterase 2. Weiterhin ist die Verbindung gegenüber allen Phosphodiesterasen

hydrolysestabil. Unter dem Einsatz von 8CPT unterbleiben daher alle Phosphodiesteraseeffekte. Damit ist es möglich, cGMP vermittelte Effekte zu messen, die allein auf Phosphorylierungsreaktionen beruhen.

Der basale cAMP Spiegel (= unstimulierte Probe) blieb in Gegenwart von 1 mM 8CPT (Abbildung 6) unverändert. Im Gegensatz zu SNP jedoch hatte 8CPT keinen Einfluss auf den PG-E<sub>1</sub> stimulierten cAMP Anstieg. Darüber hinaus veränderte 8CPT die direkte Hemmung der Adenylyl Cyclase durch 2',5'-Dideoxyadenosin (ddA) ebenfalls nicht, was darauf hinweist, dass der Prostaglandin stimulierte Signalweg durch cGK Aktivierung nicht gehemmt wird. Die Inhibierung des PG-E<sub>1</sub> stimulierten cAMP Anstiegs durch SNP ist demnach auf eine Aktivierung der PDE 2 durch cGMP zurückzuführen. Die ADP oder Adrenalin stimulierte Verminderung des PG-E<sub>1</sub> induzierten cAMP Anstiegs war hingegen – wie bei den Stimulationsversuchen mit SNP – deutlich gehemmt durch die cGK Aktivierung mit 8CPT (Abbildung 6).

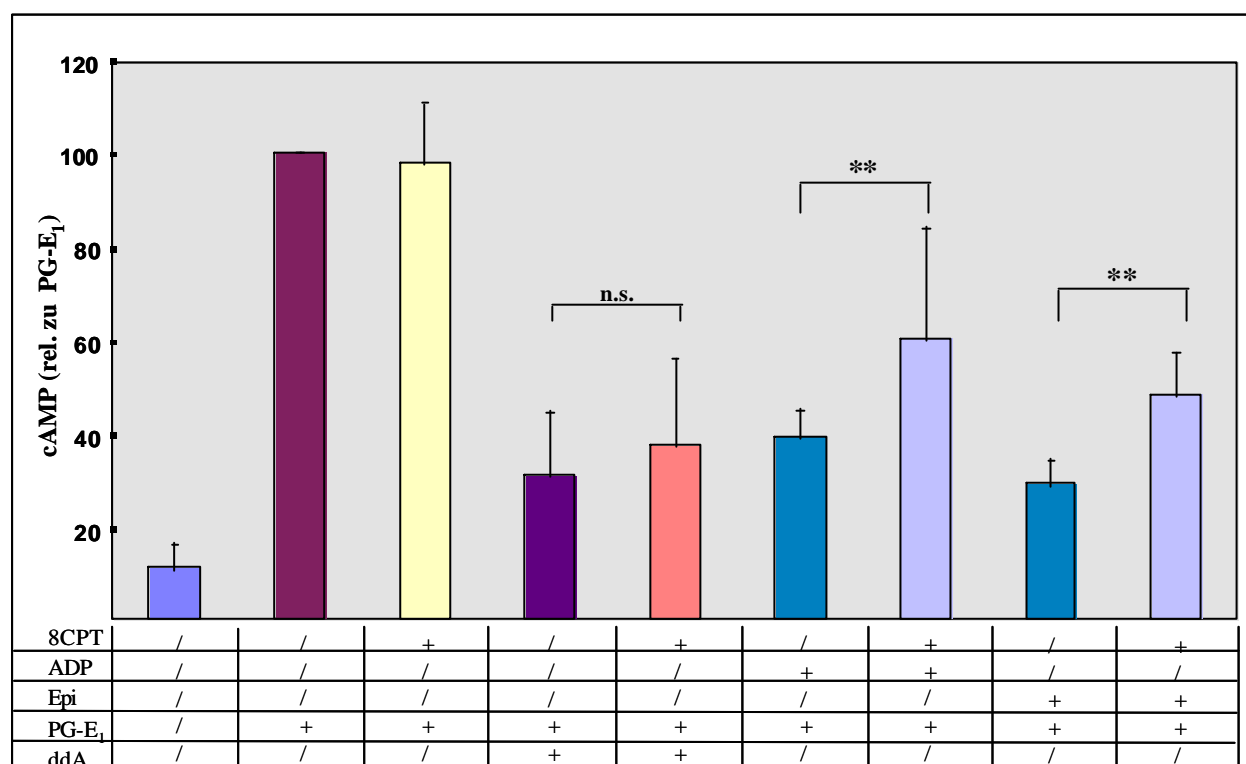


Abbildung 6: Einfluss der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK) auf PG-E<sub>1</sub> stimulierte cAMP Spiegel und auf die Aktivierung des G-Proteins durch ADP oder Adrenalin (Epi). Humane Thrombozyten wurden mit entweder 5  $\mu$ M ADP, 5  $\mu$ M Adrenalin (Epi), 1  $\mu$ M PG-E<sub>1</sub>, 100  $\mu$ M Adenylyl Cyclase Inhibitor 2',5'-Dideoxyadenosin (ddA), 1mM cGK Aktivator 8pCPT-cGMP (8CPT) oder mit Kombinationen aus diesen Verbindungen inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen sind in Relation gesetzt zu der Menge an cAMP, die nach Stimulation mit 1  $\mu$ M PG-E<sub>1</sub> gemessen wurden. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dar, die aus fünf verschiedenen Experimenten (Blutspendern) ermittelt wurden. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  angenommen.

EHNA ist ein etablierter Inhibitor der PDE 2 (131). In einer Konzentration von 20  $\mu$ M zeigte dieser keinen Effekt auf den PG-E<sub>1</sub> stimulierten cAMP Anstieg. Die Hemmung dieses Anstiegs durch

ADP war ebenfalls unverändert. Es zeigten sich auch keine Unterschiede bei der Hemmung des ADP Effekts auf den PG-E<sub>1</sub> induzierten cAMP Anstieg durch 8CPT. Dies zeigt deutlich, dass die PDE 2 an der Hemmung der AC durch ADP Stimulation nicht beteiligt ist und dass die PDE 2 nicht durch 8CPT aktiviert wird.

## 5.2 Phospholipase D als möglicher Effektor des P2Y<sub>12</sub>: Essentielle Rolle G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren für die Sekretion

ADP bindet auf humanen Thrombozyten an den G<sub>q</sub>-gekoppelten P2Y<sub>1</sub> (43) und an den G<sub>i</sub>-gekoppelten P2Y<sub>12</sub> Rezeptor (44). Obwohl eine Stimulation der beiden Rezeptoren die Bildung von Thrombozytenaggregaten auslösen kann, ist ADP nicht in der Lage, den Prozess der Sekretion zu induzieren (25). Jedoch kann eine Stimulation des G<sub>i</sub>-gekoppelten P2Y<sub>12</sub> Rezeptors eine Sekretion durch schwach wirkende Agonisten verstärken (63,68,132-134). Der für diesen Prozess zu Grunde liegende biochemische Mechanismus ist nicht bekannt. Eine Hemmung der Adenylyl Cyclase durch die Aktivierung des G<sub>i</sub>-Proteins (59-62) scheint ebenso wenig der entscheidende Mechanismus zu sein wie die Stimulation der PI-3 Kinase (65). Die folgenden Untersuchungen zielten daher darauf ab, einen neuen Effektor für den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor zu identifizieren, der den bekannten Effekten dieses Rezeptors auf die Sekretion zu Grunde liegen könnte.

Um ADP Effekte auf die Sekretion untersuchen zu können, wurden die Thrombozyten mit dem stabile Thromboxan A<sub>2</sub> Analogon U46619 stimuliert, das ebenso wie das physiologische Hormon den TP $\alpha$  Rezeptor aktivieren kann (135). Dieser Rezeptor ist an G<sub>q</sub> und G<sub>12/13</sub> gekoppelt, die im Zusammenspiel eine Formveränderung und Aggregation einleiten (25) und die nur in Gegenwart eines G-Protein Aktivators wie ADP auch eine Sekretion auslösen können (56). Bisher wird angenommen, dass Thromboxan A<sub>2</sub> oder das Analogon U46619 eine schwache Sekretion induzieren, die daraufhin zu einer Ausschüttung geringfügiger Mengen an ADP aus dem Zellinnern führt. Über eine Stimulation des G<sub>i</sub>-gekoppelten P2Y<sub>12</sub> Rezeptors hält dann das ADP den Sekretionsprozess aufrecht (56). Aufgrund dieses Mechanismus genügt die alleinige Inkubation von Thrombozyten mit U46619, um eine Sekretion messen zu können, die allerdings zu einem großen Teil von der Wirkung des ADP Rezeptors P2Y<sub>12</sub> getragen wird.

Als Parameter für die quantitative Bestimmung der Sekretion wurde die Ausschüttung von Serotonin gewählt, da dieses nach Derivatisierung leicht zu messen ist (siehe Kapitel 4.2.2).

Zur besseren Lesbarkeit der folgenden Ausführungen können unter Kapitel 8.3 alle verwendeten Stimulationsreagenzien, Inhibitoren und deren Wirkung in Thrombozyten in einer Auflistung nachgeschlagen werden.

### Bedeutung des ADPs und der Aktivierung des $G_i$ -Proteins für die U46619 induzierte Sekretion

Eine Stimulation von gewaschenen Plättchen mit  $1 \mu\text{M}$  U46619 induzierte eine Sekretion von Serotonin, die etwa 30 - 40% des Gesamtserotonins in der Probe entsprach. Diese konnte durch eine Koinkubation mit Apyrase ( $2 \text{ Einheiten/ml}$ ), die als lösliche Ectonukleotidase enzymatisch ADP abbaut, vollständig gehemmt werden (Abbildung 7).

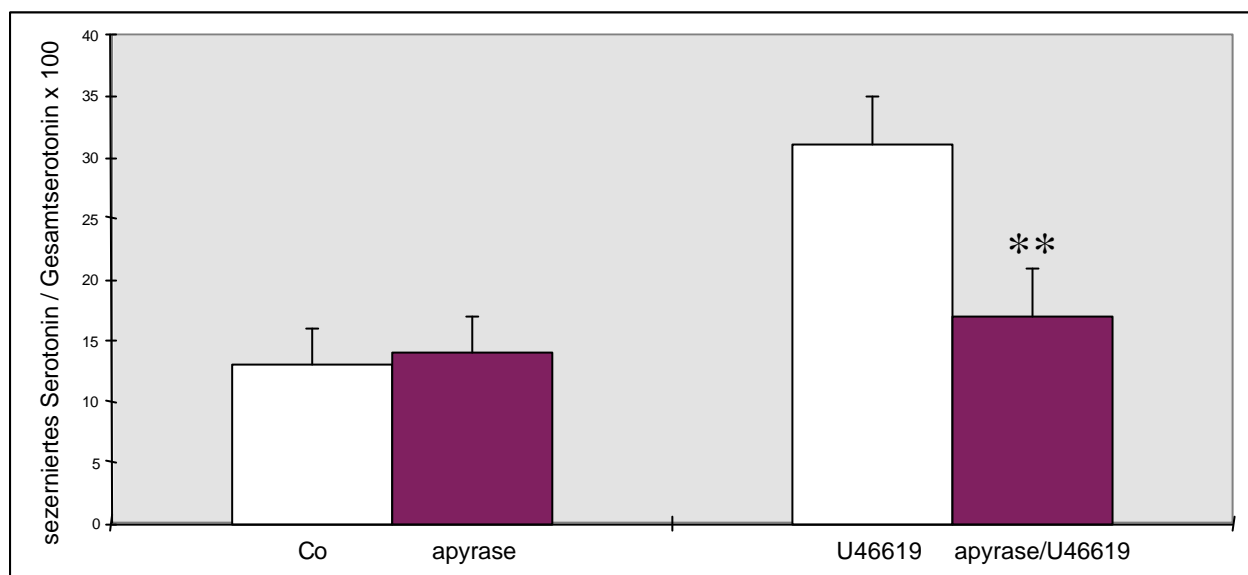


Abbildung 7: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit Resuspensionspuffer (Co),  $1 \mu\text{M}$  Thromboxanalogon U46619 und  $2 \text{ Einheiten/ml}$  Apyrase inkubiert. Vor jeder Stimulation wurden  $4 \mu\text{M}$  Fluoxetin der Plättchensuspension hinzugefügt. Sezerniertes Serotonin und Gesamtserotonin wurden für jeden Messwert bestimmt und als Prozentanteil angegeben. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten dar. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als Signifikanzschwelle angenommen.

In Umkehrung führte die zusätzliche Stimulation mit ADP zu einer signifikanten Verstärkung der U46619 induzierten Serotonin Sekretion (Abbildung 8). Interessanterweise war ADP selbst auch in sehr hohen Konzentrationen (bis zu 100  $\mu\text{M}$ ) und in Gegenwart von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nicht in der Lage, eine Degranulierung auszulösen. Aus diesen Daten kann der Schluss gezogen werden, dass die U46619 Wirkung wie bei der Aggregation auch bei der Sekretion abhängig ist von extrazellulär vorhandenem und/oder sezerniertem ADP. Der entscheidende Rezeptor für die ADP Wirkung ist auch hierfür der  $G_i$ -gekoppelte P2Y12 Rezeptor: eine Hemmung des  $G_q$ -gekoppelten P2Y1 durch A3P5P hatte keinen Einfluss auf die U46619 induzierte Serotonin Sekretion. Die selektive Inhibierung des P2Y12 durch ARC-69931-MX führte hingegen zu einer vollständigen Hemmung der U46619 Wirkung (Abbildung 8).

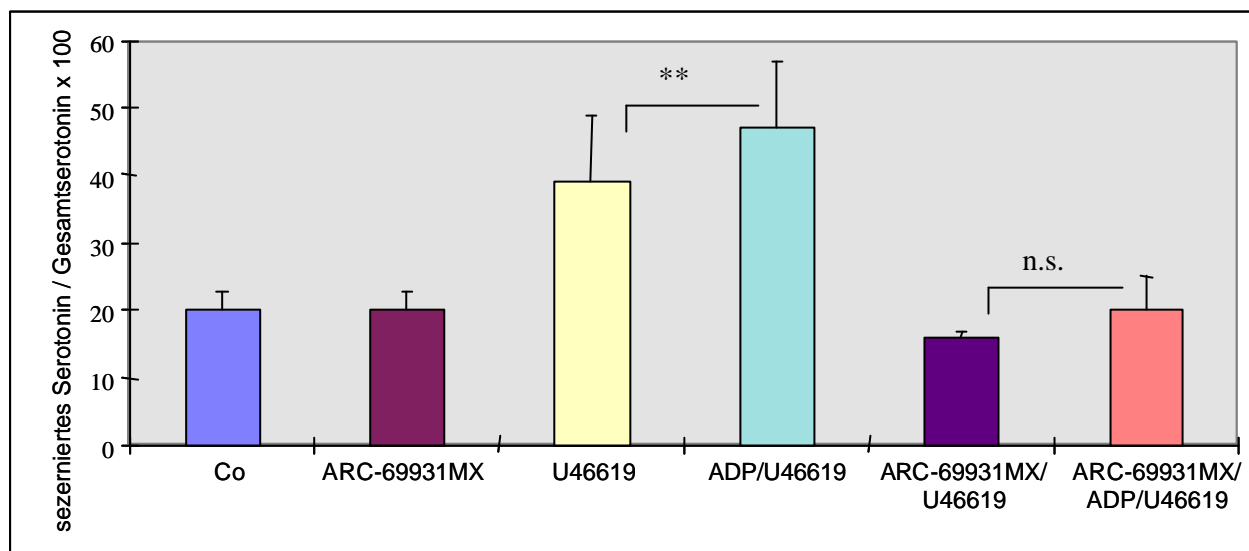


Abbildung 8: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Resuspensionspuffer (Co), 1  $\mu\text{M}$  Thromboxananalogon U46619, 1  $\mu\text{M}$  P2Y12 Rezeptorantagonist ARC-69931-MX, 5  $\mu\text{M}$  ADP oder Kombinationen aus diesen inkubiert. Vor jeder Stimulation wurden der Plättchensuspension 4  $\mu\text{M}$  Fluoxetin hinzugefügt. Sezerniertes Serotonin und Gesamtserotonin wurden für jeden Messwert bestimmt und als Prozentanteil angegeben. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten dar. Ein  $p$ -Wert < 0,05 wurde als Signifikanzschwelle angenommen.

Einen weiteren Beleg für die essentielle Rolle beider G-Proteine für die Sekretion liefern die Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C (PKC) bei der Sekretion (Abbildung 9). U46619 stimuliert über ein  $G_q$ -Protein die PKC; die direkte Aktivierung dieser Kinase mit 5  $\mu\text{M}$  PMA bewirkte wie U46619 eine Freisetzung von Serotonin. Diese konnte jedoch durch Hemmung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors mit ARC-69931-MX vollständig aufgehoben werden. Wie erwartet verhinderte der PKC Inhibitor Ro-31-8220 die U46619 stimulierte Serotonin Sekretion vollständig (Abbildung 9).

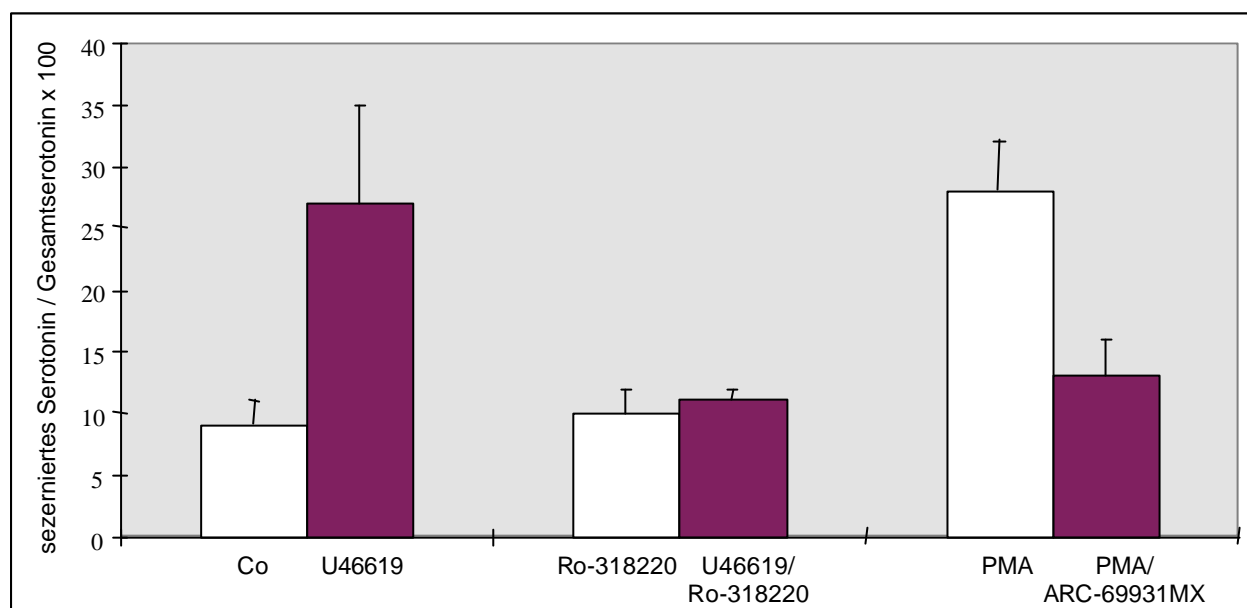


Abbildung 9: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Resuspensionspuffer (Co), 1  $\mu\text{M}$  Thromboxananalogon U46619, 5  $\mu\text{M}$  Proteinkinase C Aktivator PMA, 10  $\mu\text{M}$  Proteinkinase C Inhibitor Ro-31-8220, 1  $\mu\text{M}$  P2Y<sub>12</sub> Rezeptorantagonist ARC-69931MX oder Kombinationen aus diesen inkubiert. Vor jeder Stimulation wurden der Plättchensuspension 4  $\mu\text{M}$  Fluoxetin hinzugefügt. Sezerniertes Serotonin und Gesamtserotonin wurden für jeden Messwert bestimmt und als Prozentanteil angegeben. Die Messpunkte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dar.

Für die U46619 induzierte Serotonin Sekretion sind demnach sowohl eine  $G_q$ -Protein als auch eine  $G_i$ -Protein Aktivierung (über P2Y<sub>12</sub>) essentiell. Das Fehlen einer Komponente blockiert die Sekretion. Das ADP könnte, wie bisher in der Literatur angenommen, von einer initialen Stimulierung der Sekretion durch  $G_q$  Aktivierung herrühren (56). Denkbar wäre aber auch, dass bereits vorhandenes, extrazelluläres ADP ausreicht, um in Gegenwart eines  $G_i$  Signals eine Sekretion auszulösen.

Um möglicherweise extrazellulär vorhandenes ADP nachzuweisen, wurde die basale Aktivität des P2Y<sub>12</sub> im Ruhezustand der Thrombozyten untersucht. Es zeigte sich, dass der PG-E<sub>1</sub> induzierte cAMP Anstieg in Gegenwart des P2Y<sub>12</sub> Rezeptorantagonisten ARC-69931-MX um mehr als das eineinhalbfache höher war. Dies weist klar auf eine Präsenz von extrazellulärem ADP hin, das in einer Konzentration vorhanden sein muss, die für eine funktionelle Aktivierung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors ausreicht (siehe Tabelle 8).

	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle (Leerwert)	16,33	9,45
ARC-69931-MX	16,01	11,27
PG-E <sub>1</sub>	100,00	-
ARC / PG-E <sub>1</sub>	167,67	18,15

Tabelle 8: Erhöhung von stimulierten cAMP Spiegel in Gegenwart des P2Y<sub>12</sub> Rezeptorantagonisten ARC-69931-MX. Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Puffer (Kontrolle), 1 µM PG-E<sub>1</sub>, 1 µM ARC-69931-MX oder Kombinationen aus beiden inkubiert. Die Messwerte wurden in Relation zur PG-E<sub>1</sub> Probe ausgewiesen und stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten dar.

#### Beteiligung der Phospholipase D bei der U46619 induzierten Serotonin Sekretion

Um festzustellen, in wie weit die Hemmung der Adenylyl Cyclase durch die Aktivierung des G $\alpha_i$ -Proteins einen Beitrag zur Sekretion leistet, wurde die Wirkung des Adrenalins, das in Thrombozyten ebenfalls ein G $\alpha_i$ -Protein aktiviert, auf die Serotonin Freisetzung untersucht. Wie ADP löst auch Adrenalin selbst keine Sekretion aus, verstärkt aber, wie ADP, die U46619 induzierte Serotonin Freisetzung (Abbildung 10). Diese Verstärkung war hemmbar durch Yohimbin, einem selektiven  $\alpha_2A$  Rezeptorantagonisten, der den Anteil der U46619 Stimulation an der Serotonin Freisetzung nicht beeinträchtigte.

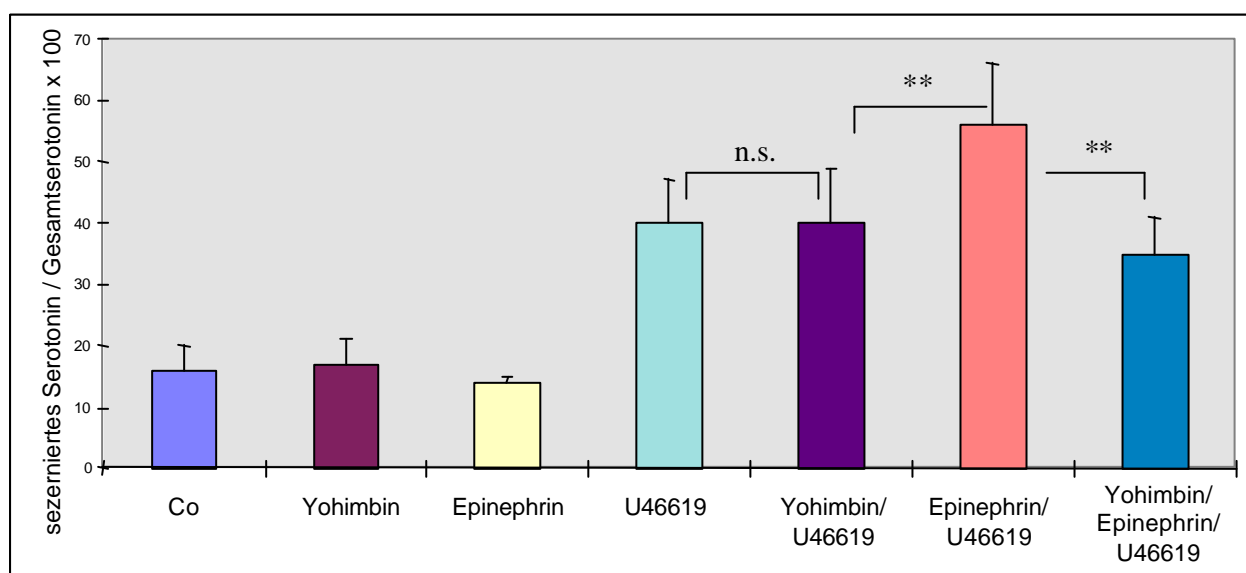


Abbildung 10: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Resuspensionspuffer (Co), 10 µM Adrenalinrezeptorantagonist Yohimbin, 50 µM Adrenalin (Epinephrin), 1 µM Thromboxananalogon U46619 und Kombinationen aus diesen inkubiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stellen Messwerte aus sieben unabhängigen Versuchen dar.



Im Unterschied zur Aktivierung der G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren verstärkte eine direkte Hemmung der Adenylyl Cyclase durch SQ 22,536 die U46619 induzierte Serotonin Sekretion nicht (Abbildung 11), obwohl die Verbindung in einem Kontrollversuch unter den gleichen experimentellen Bedingungen den PG-E<sub>1</sub> stimulierten cAMP Anstieg um etwa 50% senkte (keine Abbildung zu diesem Kontrollversuch).

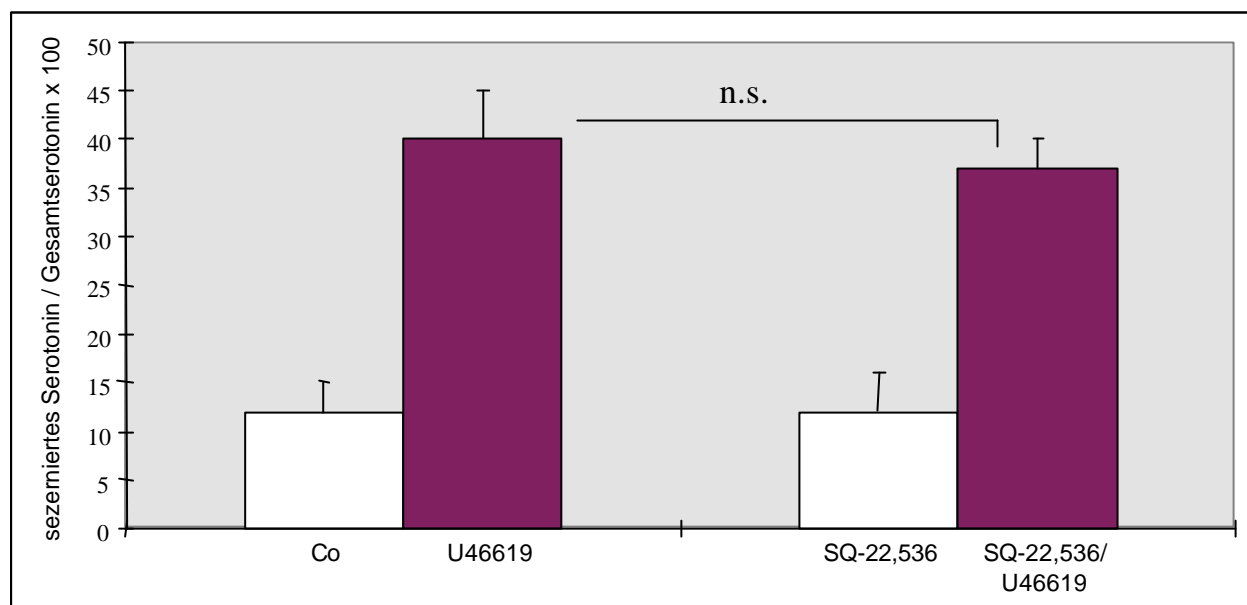


Abbildung 11: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37° C mit Resuspensionspuffer (Co), 1  $\mu$ M Thromboxananalogon U46619 und/oder mit 100  $\mu$ M Adenylylcyclaseinhibitor SQ-22,536 inkubiert. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen.

Eine Beteiligung der Adenylyl Cyclase an den ADP und Adrenalin vermittelten Effekten bei der U46619 induzierten Serotonin Sekretion erscheint daher unwahrscheinlich. Der Versuch, die Adenylyl Cyclase als verantwortlichen Effektor über eine irreversible Hemmung der G-Protein Signalübertragung durch das Pertussis Toxin auszuschließen, scheiterte. Trotz Permeabilisierung der Plättchen konnte das Pertussis Toxin auf Grund seiner Molekülgröße nicht in die Zelle gelangen. Eine noch stärkere Permeabilisierung hätte zwar die Messung der Adenylyl Cyclase Aktivität weiterhin erlaubt, doch wären funktionelle Untersuchungen wie die Bestimmung der Serotonin Sekretion an den stark beschädigten Thrombozyten nicht mehr möglich gewesen.

Da außer der Adenylyl Cyclase kein weiterer Effektor für den P2Y<sub>12</sub> bzw. den  $\alpha$ 2A Rezeptor bekannt ist, wurde nach einem möglichen neuen Effektor gesucht. In vielen anderen Zelltypen vermittelt die Phospholipase D (PLD) eine Sekretion (136-141). In Thrombozyten ist die PLD zwar nachgewiesen (142,143), aber eine Bedeutung für die Plättchenfunktion wird bislang nicht angenommen. Auch konnte die PLD bisher einem Signalweg, G<sub>q</sub>-, G<sub>i</sub>- oder G<sub>12/13</sub>-vermittelt, nicht zugeordnet werden.

Phospholipase D hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin. Da keine verlässlich spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren für dieses Enzym bekannt sind, wurden zum einen die Thrombozyten mit Phosphatidylcholin (PtCh) und zum zweiten mit Phosphatidsäure (PA) inkubiert, um so PLD vermittelte Effekte zu imitieren.

Die Inkubation von Plättchen mit PtCh löste eine Serotonin Freisetzung aus, die etwa der entsprach, die mit U46619 erzielt werden konnte (Abbildung 12). Eine gleichzeitige Stimulation mit beiden steigerte überraschenderweise die Menge an sezerniertem Serotonin nicht, was darauf hindeutet, dass U46619 und PtCh den selben Signalweg benutzen.

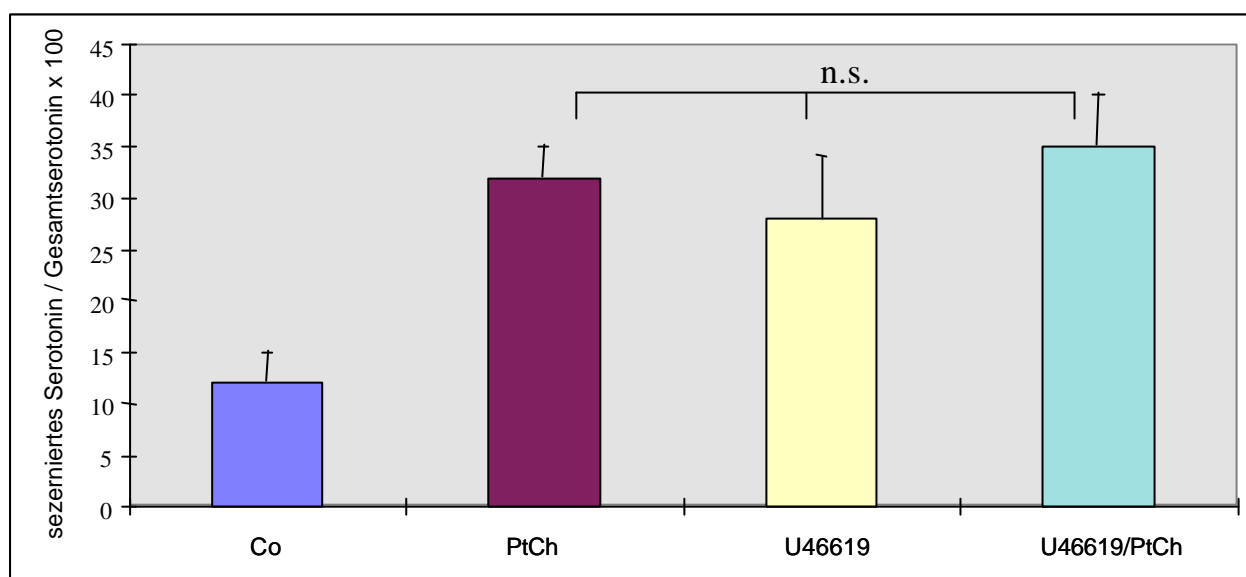


Abbildung 12: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Resuspensionspuffer (Co), Phospholipase D Substrat Phosphatidylcholin (PtCh) 320  $\mu$ M und/oder 1  $\mu$ M Thromboxananalogon U46619 inkubiert. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichungen von sechs unabhängigen Versuchen.

Darüber hinaus löste das PLD Produkt PA nur in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  eine Degranulierung aus; die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  zeigte hingegen keine Effekte (Abbildung 13). Beide Konzentrationen jedoch führten bei zusätzlicher Stimulation mit U46619 zu einer gleichstarken Serotonin Sekretion, die in etwa der entsprach, die mit PtCh alleine erzielt werden konnte. Dieses deutet wiederum darauf hin, dass U46619 und PLD die selben Signalwege nutzen.

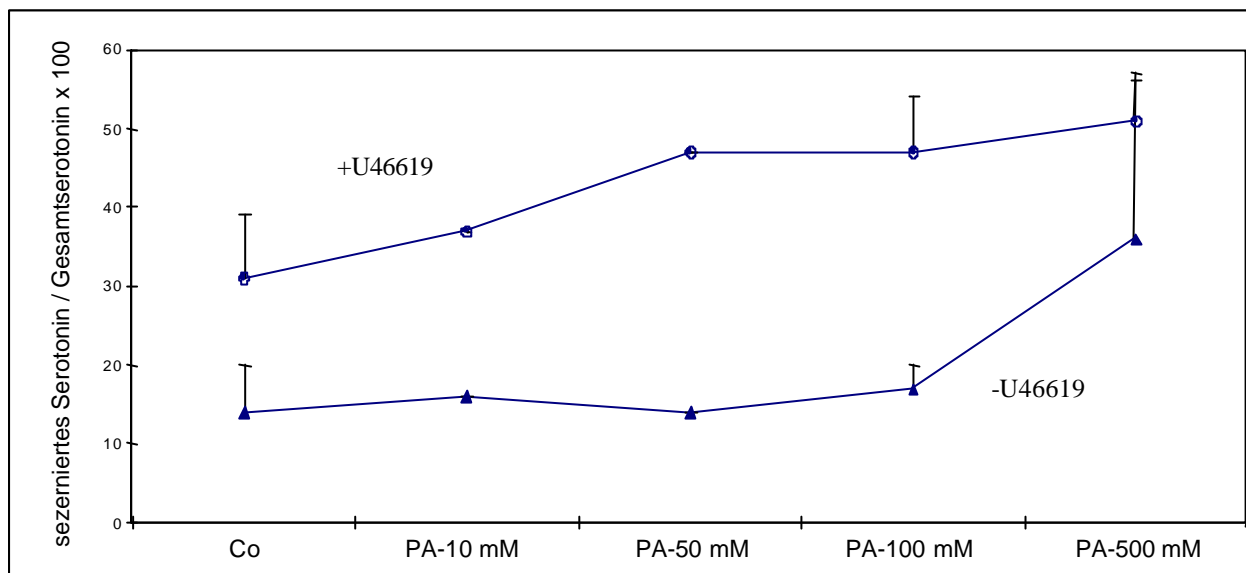


Abbildung 13: Sowohl Phospholipase D Produkt Phosphatidsäure (PA) als auch Thromboxananalogon U46619 1  $\mu\text{M}$  wurden 2 min bei 37°C inkubiert. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerte und den Standardabweichungen von fünf unabhängigen Versuchen.

### Beteiligung der PLD an der P-Selektin Expression

Nach einer Aktivierung von Thrombozyten wird P-Selektin aus den  $\alpha$ -Granula an die Zelloberfläche transportiert. Die Expression dieses Proteins wird häufig als Marker verwendet, Vorgänge der Sekretion zu charakterisieren. In dieser Arbeit diente es neben der Serotoninmessung als zweiter Parameter, die oben beschriebenen Ergebnisse zur Sekretion zu bestätigen.

U46619 und PtCh lösten beide eine Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche aus (Abbildung 14). Analog zur Serotonin Sekretion erhöhte die gleichzeitige Inkubation von U46619 und PtCh die Expression nicht. Darüber hinaus verhinderte die Inhibierung der PKC durch Ro-31-8220 die U46619 induzierte Expression vollständig, ebenso wie die Hemmung der ADP Rezeptors P2Y12 mit ARC-69931-MX.

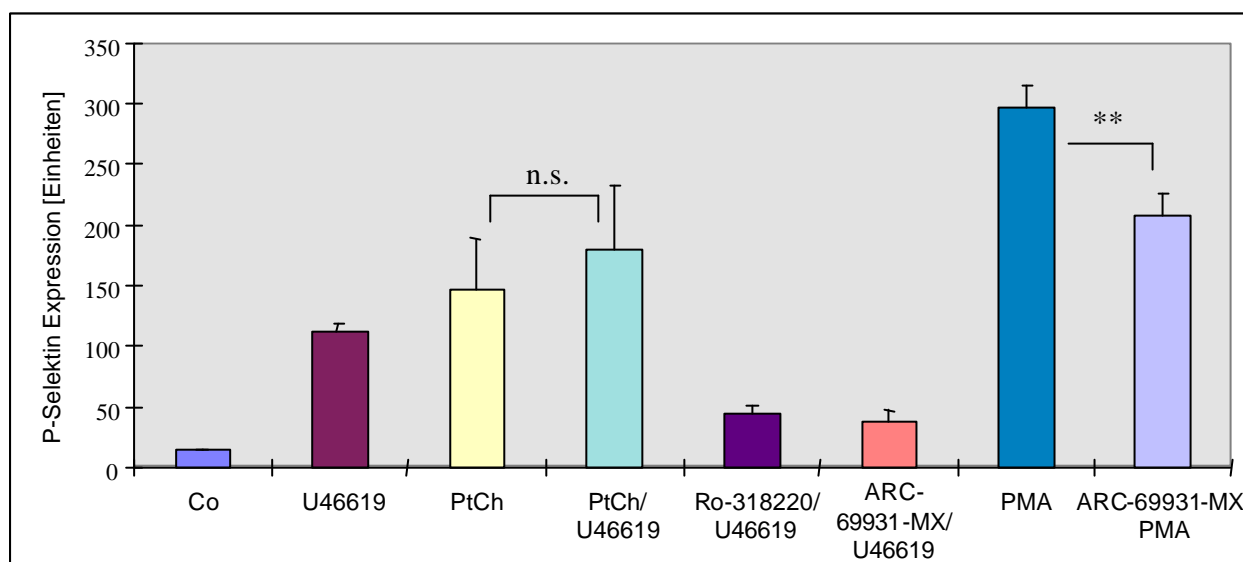


Abbildung 14: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min bei 37°C mit Resuspensionspuffer (Co), 1  $\mu$ M Thromboxananalogon U46619, 320  $\mu$ M Phospholipase D Substrat Phosphatidylcholin (PtCh), 5  $\mu$ M Proteinkinase C Aktivator PMA inkubiert oder koinkubiert in Gegenwart oder Abwesenheit von 10  $\mu$ M Proteinkinase C Inhibitor Ro-318220 oder 1  $\mu$ M P2Y12 Rezeptorantagonist ARC-6993-MX. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

### Rolle der PLD Aktivierung bei der P2Y12 Stimulation

In den Untersuchungen zur PLD Aktivität wurden die gleichen Versuchsbedingungen gewählt wie für die Messungen der Serotonin Freisetzung: die Stimulationszeit betrug 2 min, alle Substanzen wurden in der gleichen Konzentrationen und mit der gleichen Inkubationszeit verwendet. In beiden Fällen handelt es sich um eine kumulative Messung: Fluoxetin verhindert die Wiederaufnahme des Serotonins in die Zelle, und das gemessene Phosphatidylethanol wird als Endprodukt nach Transphosphatidylierung des PtCh mit Ethanol nicht weiter metabolisiert.

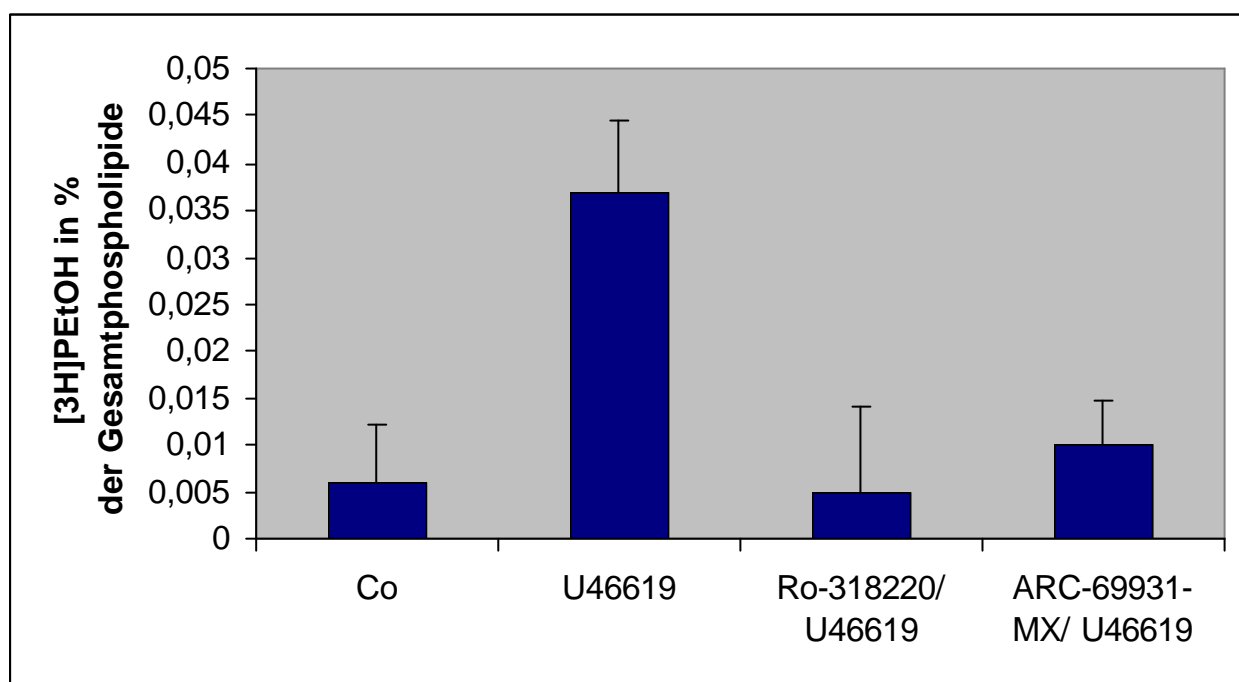


Abbildung 15: Gewaschene Plättchen wurden für 2 min mit Resuspensionspuffer (Co), 1  $\mu$ M Thromboxanalogon U46619, 10  $\mu$ M Proteinkinase C Inhibitor Ro-318220, 1  $\mu$ M P2Y12 Rezeptorantagonist ARC-69931-MX oder Kombinationen aus diesen bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der Phospholipase D (PLD) wurde angegeben als Anteil von [ $^3$ H] markiertem Phosphatidylethanol an der Gesamtphospholipidmenge in  $10^9$  Thrombozyten/ml (Angabe in Prozent).

Die PLD Aktivität war nach Stimulation mit U46619 etwa sechs Mal höher als der Basalwert der Enzymaktivität. Diese konnte mit dem Inhibitor der PKC, Ro-31-8220, vollständig gehemmt werden. Die Inhibierung des P2Y12 durch ARC-69931-MX führte zu einer 80%-igen Verminderung der U46619 stimulierten PLD Aktivität (Abbildung 15).

## **Pharmakologisches Monitoring von Thrombozytenfunktionshemmern**

### **5.3 In vivo Studie zum Wirkmechanismus von Dipyridamol**

Neben zahlreichen kleineren Studien hat vor allem die *European Stroke Prevention Study 2* (ESPS-2) die Wirksamkeit des Dipyridamols in der Behandlung des Sekundärschlaganfalls belegt (96). Trotz dieser eindeutigen klinischen Befunde blieb der tatsächliche Wirkmechanismus auf Plättchen unter den therapeutischen Bedingungen der ESPS 2 Studie unklar. Da bislang unter anderem eine Hemmung von cyclonukleotidabbauenden Enzymen (=Phosphodiesterasen) als möglicher Angriffspunkt vermutet worden war (108-110), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, die es ermöglichte, Cyclonukleotideffekte zu quantifizieren. Die Standarddosierung aus der ESPS-2 Studie betrug zwei Mal täglich 200 mg Dipyridamol in retardierter Form. Die daraus resultierenden Plasmaspiegel lagen im Bereich von 1,4–4  $\mu\text{M}$  (111). Für die *ex vivo* Versuche wurde eine Dipyridamolkonzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  gewählt.

Beide Cyclonukleotide, cAMP und cGMP, aktivieren die cAK bzw. die cGK, die ihrerseits das VASP Protein an zwei Serinaminosäuren (Serin 239 und Serin 157) phosphorylieren. Die unterschiedlichen Präferenzen der Kinasen erlauben eine Unterscheidung des zu Grunde liegenden Signalweges: die cAK phosphoryliert VASP bevorzugt am Serin 157 (74) die cGK hingegen bevorzugt am Serin 239 (83). Über den Einsatz von Antikörpern, die die einzelnen Phosphorylierungszustände erkennen, ist nicht nur eine Identifizierung des verantwortlichen Signalweges, sondern gleichzeitig auch eine Quantifizierung möglich.

Dipyridamol in der therapeutisch relevanten Konzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  oder einer höheren Konzentration (bis zu 30  $\mu\text{M}$ ) beeinflusste weder den basalen Cyclonukleotidspiegel (keine Abbildung) noch die basale VASP Phosphorylierung (Abbildung 16). Jedoch wurde die SNP-induzierte VASP-Ser239 Phosphorylierung durch Dipyridamol (3,5  $\mu\text{M}$ ) signifikant verstärkt.

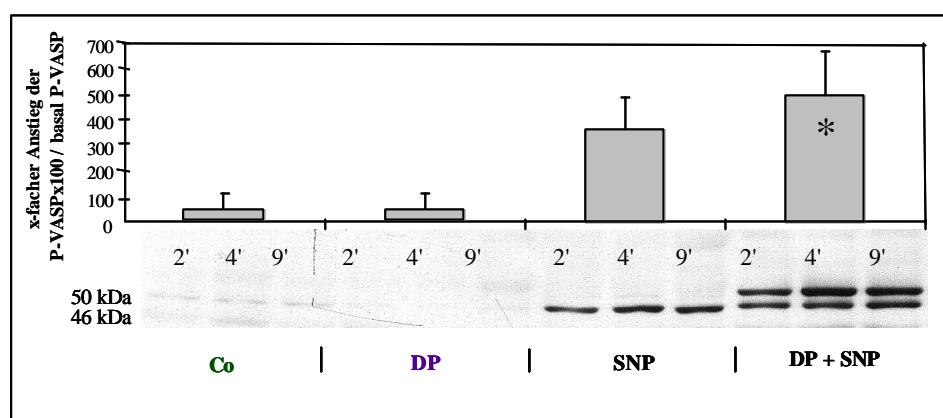


Abbildung 16: Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde in der Abwesenheit (Co) oder in Gegenwart von Dipyridamol (DP; 3,5  $\mu$ M) für 20 min und anschließend mit Natrium Nitroprussid (SNP; 1  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden 2, 4 und 9 min nach der Stimulation mit SNP gestoppt. Die thrombozytäre VASP Phosphorylierung wurde dann per Western Blot wie im Methodenteil beschrieben mit dem monoklonalen Antikörper 16C2 und quantitativer, densitometrischer Auswertung mit dem NIH Image 1.62 System bestimmt. In diesem repräsentativen Western Blot (unterer Teil) ist ein Zeitverlauf der SNP induzierten VASP Phosphorylierung in Gegenwart oder Abwesenheit von Dipyridamol abgebildet. Phosphoryliertes VASP an Serin 239 erscheint als 46 kDa Bande, das bei zusätzlicher Phosphorylierung an Serin 157 als 50 kDa Bande erscheint. Die quantitative Auswertung (oberer Teil) stellt die 4 min Inkubation mit SNP dar und ist angegeben als x-facher Anstieg der Menge an Serin 239 P-VASP im Vergleich zur basalen P-VASP Menge. Die Messwerte geben den Mittelwert und die Standardabweichung von vier verschiedenen Versuchen an (\*:  $p < 0,05$ ).

Um eine mögliche Beteiligung des PG-I<sub>2</sub>/cAMP Signalweges an den gemessenen Effekten auszuschließen, wurden die Zellen mit dem stabilen PG-I<sub>2</sub> Derivat PG-E<sub>1</sub> stimuliert. Die dadurch induzierte VASP Phosphorylierung wurde jedoch von Dipyridamol nicht verstärkt (Abbildung 17). Unter *in vivo* Bedingungen inhibieren NO und PG-I<sub>2</sub> synergistisch Plättchen (19). Dieser Synergismus konnte auch für die VASP Phosphorylierung gezeigt werden (20); Dipyridamol in einer therapeutisch relevanten Konzentration (3,5  $\mu$ M) verstärkte diesen Synergismus signifikant.

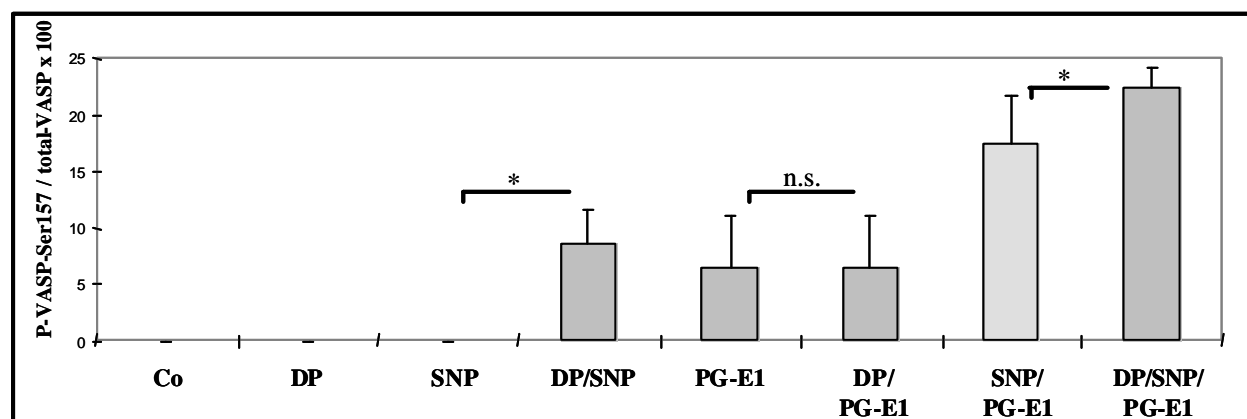


Abbildung 17: Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde mit Resuspensionspuffer (Co), Dipyridamol (DP; 3,5  $\mu$ mol/l) für 20 min und anschließend mit SNP (0,3  $\mu$ mol/l) und/oder PG-E<sub>1</sub> (3nM) für 4 min bzw. 2 min bei 37°C inkubiert. VASP Serin 157 Phosphorylierung wurde mit dem polyklonalen M4 Antikörper detektiert und nachfolgend densitometrisch mit dem NIH Image 1.62 System ausgewertet. Die Messwerte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus vier verschiedenen Versuche dar (\*:  $p < 0,05$ ).

Um eine funktionelle Relevanz der gemachten biochemischen Beobachtungen zu demonstrieren, wurden Plättchenfunktionen wie die Thromboxansynthase Aktivität oder die Serotonin Sekretion untersucht. Beide stellen wichtige Vorgänge dar, die die initiale Aktivierung von Thrombozyten verstärken und vervielfachen. So haben Patienten mit einem angeborenem Sekretionsdefekt eine stark erhöhte Blutungsneigung (144) und die Hemmung der Thromboxansynthase ist der Hauptmechanismus des Goldstandards Acetylsalicylsäure (Aspirin®) in der Therapie vaskulärer Erkrankungen (145). Die Thromboxansynthase konnte mit Thrombin aktiviert werden, was von Dipyridamol nicht beeinflusst wurde (Abbildung 18). Jedoch war Dipyridamol in der Lage, die SNP vermittelte Hemmung der Thromboxansynthasestimulierung zu verstärken.

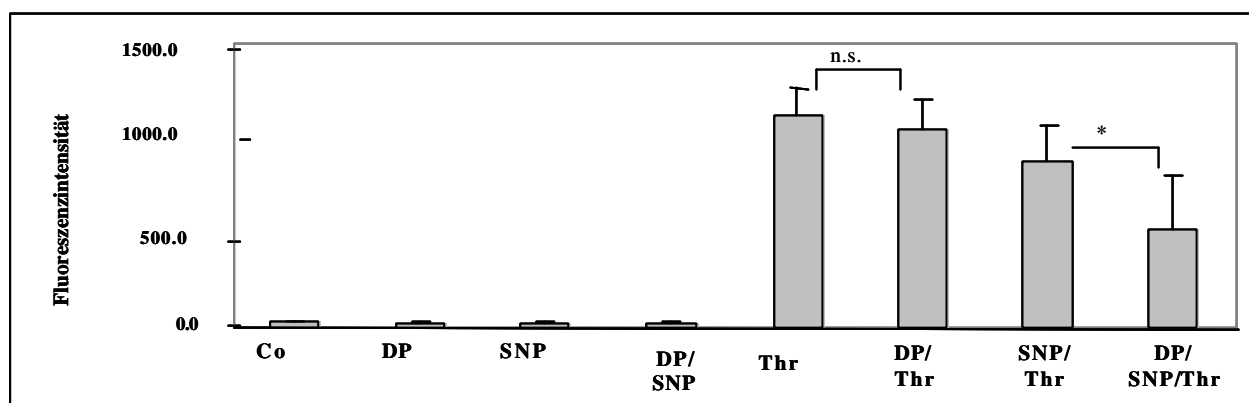


Abbildung 18: Gewaschene Plättchen wurden mit Resuspensionspuffer (Co), Dipyridamol (DP; 3,5  $\mu$ M) für 20 min und anschließend mit SNP (20 nM) und/oder Thrombin (Thr; 0,3 U/ml) für 4 bzw. 2 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der Thromboxansynthase wurde wie im Methodenteil beschrieben fluorimetrisch bestimmt. Die Messwerte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen vier verschiedener Versuche dar (\*:  $p < 0,05$ ).

In ähnlicher Weise konnte Dipyridamol die Hemmung der U46619 induzierten Serotonin Sekretion durch SNP verstärken, ohne aber einen Einfluss auf die Stimulation mit Thrombin selbst zu haben (Abbildung 19).

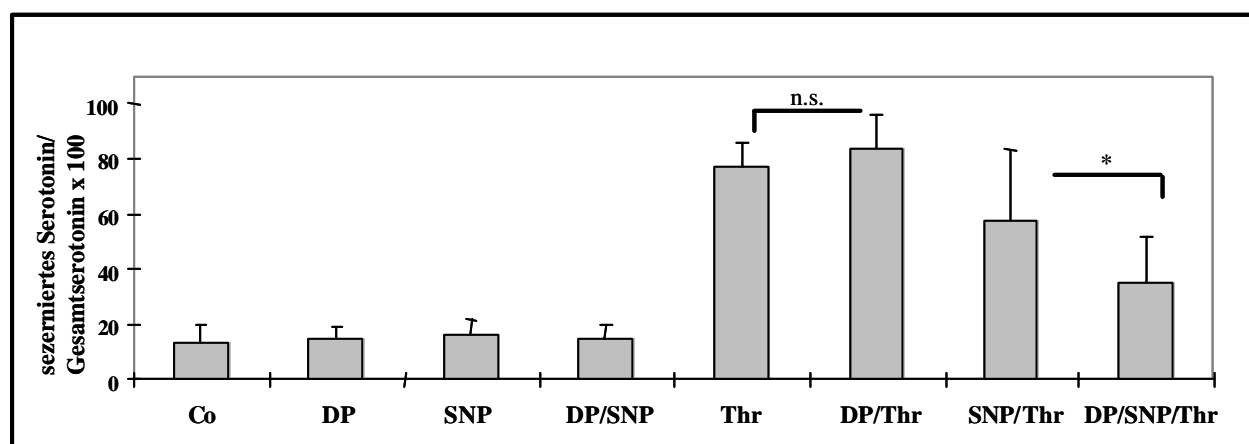


Abbildung 19: Gewaschene Plättchen wurden mit Resuspensionspuffer (Co), Dipyridamol (DP; 3,5  $\mu$ M) für 20 min und anschließend mit SNP (30  $\mu$ M) und/oder Thrombin (Thr; 0,75 U/ml) für 4 bzw. 2 min bei 37°C inkubiert. Die Sekretion von Serotonin wurde wie im Methodenteil beschrieben fluorimetrisch bestimmt. Die Messwerte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen fünf verschiedener Versuche dar (\*:  $p < 0,05$ ).



In einer *ex vivo* Studie mit vier gesunden Probanden wurde die stimulierte VASP Phosphorylierung vor und drei Stunden nach einer Einnahme von 200 mg retardiertem Dipyridamol (Persantin Retard®) untersucht. Vor der Einnahme des Präparates lag die SNP induzierte VASP Phosphorylierung fünf- bis siebenfach über der basalen VASP Phosphorylierung. Bereits drei Stunden nach der Einnahme einer Kapsel war die SNP induzierte VASP Phosphorylierung doppelt so stark (etwa 15-fach, Abbildung 20). Bei der Boehringer Ingelheim GmbH wurde eine Plasmaspiegelbestimmung veranlasst, die jedoch keine auswertbaren Daten lieferte.

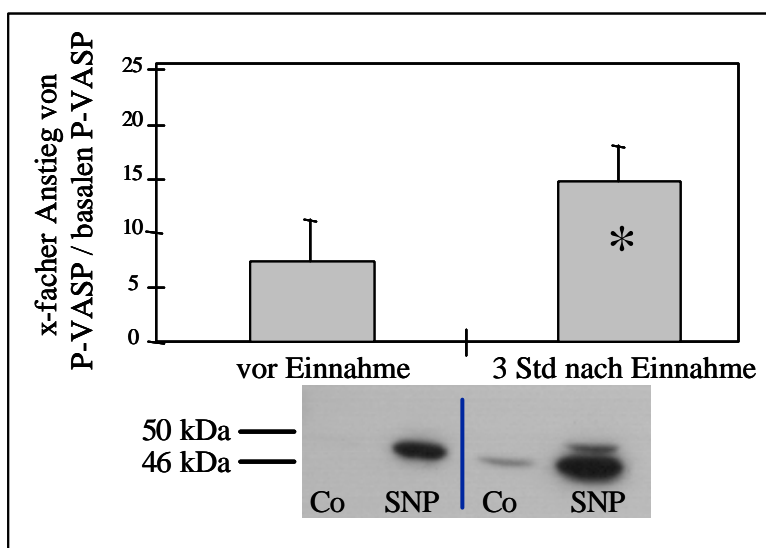


Abbildung 20: SNP induzierte VASP Serin 239 Phosphorylierung wurde in Thrombozyten gesunder Probanden vor und 3 Std nach der Einnahme von 200 mg retardiertem Dipyridamol (Persantin Retard®) untersucht. Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde mit SNP (1  $\mu$ M) für 4 min bei 37°C inkubiert. Die VASP Phosphorylierung wurde mit dem monoklonalen Antikörper 16C2 detektiert. Nach dem "strippen" der Nitrocellulosemembran wurde die Gesamtmenge an VASP mit dem polyklonalen M4 Antikörper detektiert. Die quantitative Bestimmung wurde densitometrisch mit dem NIH Image 1.62 System durchgeführt. Die Messwerte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen vier verschiedener Versuche dar (\*:  $p < 0,05$ ).

#### 5.4 DELFIA-Assay zur Analyse von Clopidogreleffekten

Ein wichtiger Aspekt der Arzneimittelsicherheit ist die Möglichkeit, die Wirkung eines Arzneimittels am Patienten verfolgen zu können. Daher war es das Ziel in dieser Arbeit, einen Assay zu entwickeln, der über eine Bestimmung des Arzneistoffeffekts (*“effect monitoring”*) eine Therapiekontrolle des Thrombozytenfunktionshemmers Clopidogrel im Vollblut erlaubte.

Der Angriffspunkt des Clopidogrels und des Ticlopidins ist der ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> (113,125), der in Thrombozyten die Adenylyl Cyclase über ein inhibitorisches G-Protein hemmt (44). Dieser Prozess führt zu einer verminderten Bildung von cAMP durch Adenylyl Cyclase Aktivatoren, z.B. durch Prostacyclin. Die damit einhergehende verminderte Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK) resultiert in einer reduzierten Phosphorylierung des Proteins VASP (74,83) (siehe dazu Abbildung 3, Kapitel 2.2.2). Das Ausmaß der VASP Phosphorylierung kann mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers im DELFIA Assaysystem der Firma Vasopharm Biotech quantitativ bestimmt werden (detailliert beschrieben in Kapitel 4.4.3).

In Vorversuchen führte die Stimulation der Adenylyl Cyclase (AC) mit einer hohen Konzentration (1  $\mu$ M) des stabilen, wasserlöslichen Prostacyclin Analogons Iloprost bereits nach 30 sec zu einem Anstieg der VASP Phosphorylierung, die über eine Stunde konstant blieb (keine Abbildung). Für die weiteren Versuche wurde für Iloprost daher eine Inkubationszeit von einer Minute gewählt. Für die Ermittlung einer submaximalen Konzentration wurden in weiteren Vorversuchen die Dosis-Wirkungskurven verschiedener Iloprostkonzentrationen aufgenommen, aus denen sich eine optimale Konzentration von 10 nM ergab (keine Abbildung).

Im Folgenden wurde versucht, eine Konzentration an ADP zu ermitteln, bei der die Iloprost induzierte VASP Phosphorylierung vollständig gehemmt war.

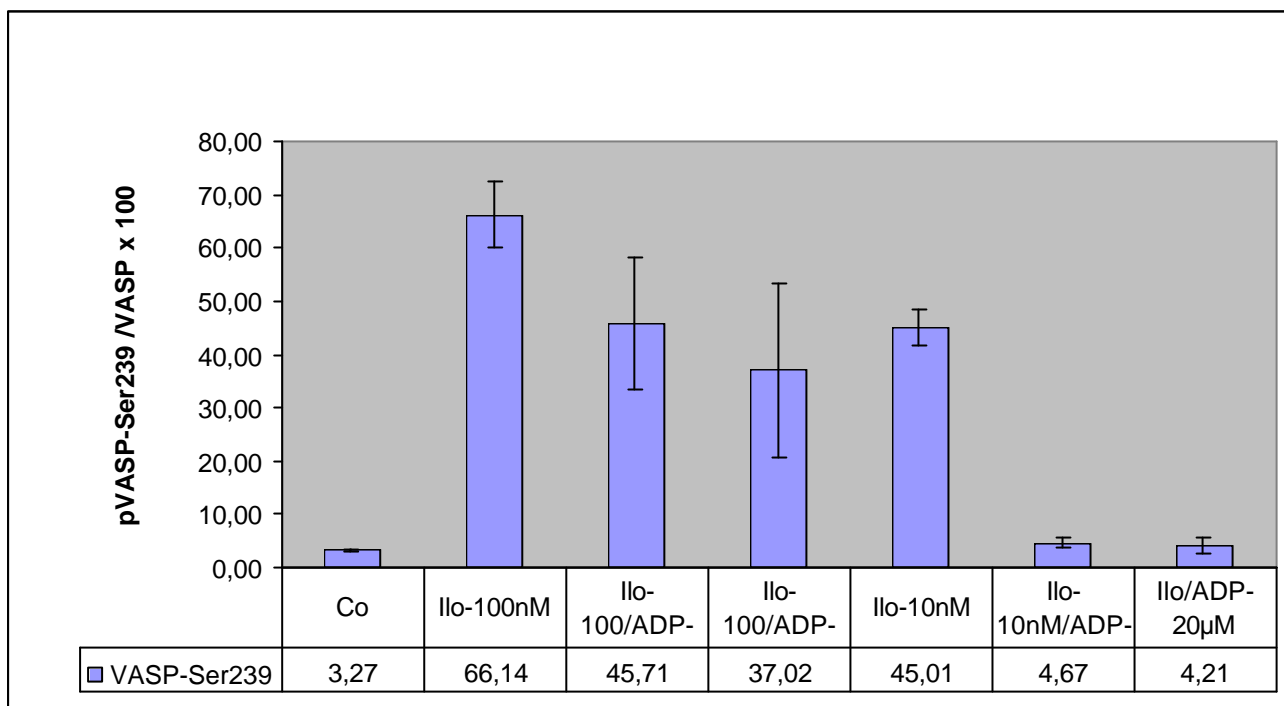


Abbildung 21: Hemmung der Iloprost (Ilo) stimulierten VASP-Phosphorylierung durch ADP im Vollblut. Die Messwerte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Versuchen dar.

Die Stimulation von Vollblut mit 10 nM Iloprost (Ilo) führte zu einer etwa 45%-igen VASP Phosphorylierung, die mit 10 µM ADP vollständig gehemmt werden konnte (4%) (Abbildung 21). Da der aktive Metabolit des Clopidogrels irreversibel an den ADP Rezeptor P2Y12 bindet, könnten deshalb alle Clopidogreleffekte durch einen Anstieg der VASP Phosphorylierung über den Basalwert ausgewiesen werden.

Um eine mögliche klinische Tauglichkeit des Assays zu demonstrieren, wurden in einer preliminären Studie 13 Patienten verglichen, die entweder mit Clopidogrel therapiert wurden oder unbehandelt blieben (siehe Studienprotokoll, Kapitel 4.6.2). Zur Erhebung der Daten in der Patientenstudie wurde die Iloprost Stimulation der VASP Phosphorylierung auf 100% festgelegt, die Werte der anderen Messungen wurden entsprechend in Relation gesetzt. Sieben Patienten, die keine Behandlung mit Clopidogrel erhalten hatten, zeigten keine Aufhebung der ADP induzierten Hemmung auf die stimulierte VASP Phosphorylierung. Das gleiche Resultat ergab sich bei Patienten, die zwölf Stunden vor der Messung 300 mg Clopidogrel erhalten hatten. Erst bei Patienten, die nach einer einmaligen Gabe von 300 mg Clopidogrel und drei- bis fünftägiger anschließender Behandlung mit täglich 75 mg Clopidogrel behandelt wurden, konnte eine Aufhebung der ADP Wirkung beobachtet werden. Bei einem Patienten, der mehr als zwei Wochen mit Clopidogrel behandelt worden war, erfolgte die Aufhebung des ADP Effektes auf die Adenylyl Cyclase fast vollständig (Abbildung 22).

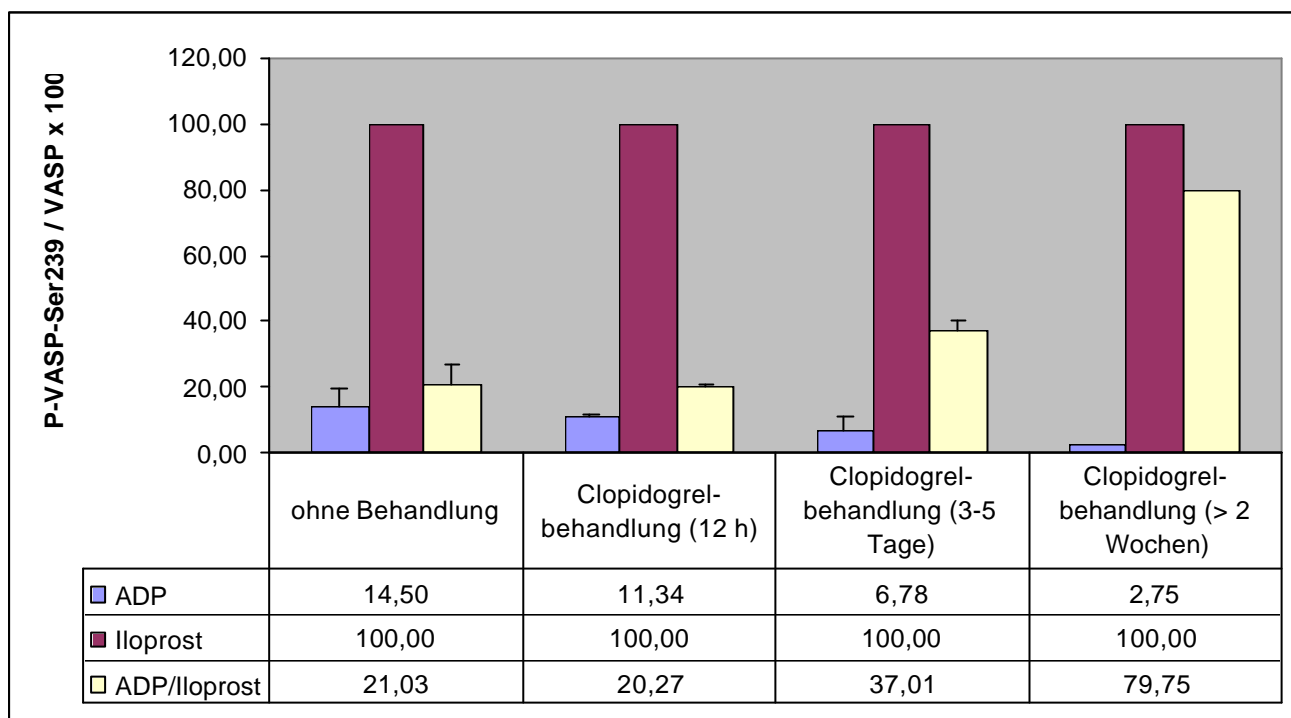


Abbildung 22: Aufhebung der ADP vermittelten Hemmung der Iloprost stimulierten VASP-Phosphorylierung im Vollblut von Patienten. Blutproben von Patienten wurden vermessen, die ohne Clopidogrelbehandlung blieben, die 12 Std vor der Messung 300 mg Clopidogrel einnahmen und die 3-5 Tage Clopidogrel erhielten. Eine weitere Blutprobe wurde einem Patienten entnommen und vermessen, der seit mehr als 2 Wochen mit Clopidogrel therapiert wurde. Für diese ex vivo Studie wurden diejenigen experimentellen Bedingungen gewählt, die in Vorversuchen ermittelt worden waren: Inkubation von zitriertem Vollblut mit 10 nM Iloprost und mit 10  $\mu$ M ADP für 1 min bei 37°C. In dieser preliminären Studie war ein Clopidogreleffekt erst nach 3-5 Tagen einer Behandlung zu sehen.

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Regulation des P2Y<sub>12</sub> und des $\alpha$ 2A Rezeptors durch die cGMP-abhängige Proteinkinase

Für die primäre Hämostase (Blutstillung) ist die feine Regulierung der Thrombozytenfunktion von essentieller Bedeutung. Bei einem Gefäßschaden kommt es zu einer koordinierten Aktivierung von Thrombozyten, die u.a. zu einer Formveränderung des Plättchens, zu einer innerzellulären Calciumerhöhung, zur Sekretion von Aktivatoren aus den Speichern und zur Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors und damit zur Aggregation führt (25). Jedes dieser Ereignisse kann durch Agenzien verhindert werden, die in Thrombozyten die Konzentration an Cyclonukleotiden (cAMP oder cGMP) erhöhen. Unter physiologischen Bedingungen sind dies NO und Prostacyclin, die über cGMP bzw. cAMP die Thrombozytenfunktion hemmen (6).

Die biochemischen Mechanismen, durch die NO und Prostacyclin ihre hemmende Wirkung auf die Thrombozyten entfalten, sind noch immer nicht ganz verstanden. Bekannt ist, dass die Cyclonukleotide cAMP und cGMP die cAMP- bzw. die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK bzw. cGK) aktivieren können (7,9). Diese Enzyme führen zur Phosphorylierung von bestimmten Zielmolekülen, die dadurch eine Funktionsminderung oder -änderung erfahren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Inkubation von Thrombozyten mit NO- oder Prostacyclinderivaten den Calciumanstieg (10,11), die Fibrinogenbindung (13), die Adhäsion (12) und die Aggregation (7) hemmen können. In einigen Fällen, z.B. für die Hemmung des Calciumanstiegs, konnte auch das exakte Zielmolekül der cGK identifiziert werden (79).

Die Phosphorylierung von Proteinen durch die cyclonukleotid-abhängigen Kinasen kann auch zur Selbstregulation der Cyclonukleotidspiegel beitragen. So führt beispielsweise die Phosphorylierung des cGMP abbauenden Enzyms PDE 5 durch cGK zu einem verstärkten Abbau von cGMP (77); für cAMP ist ähnliches bekannt: die cAK phosphoryliert die PDE 3 und verstärkt dadurch den Abbau von cAMP (76).

Auch membranständige Rezeptoren, die bei der Aktivierung von Thrombozyten eine Rolle spielen, unterliegen einer Regulation durch die cyclonukleotid-abhängigen Kinasen. So konnte für den Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor eine Phosphorylierung gezeigt werden, die eine reduzierte Aktivierung des G-Proteins zur Folge hat (81,82). Ein solcher Mechanismus stellt eine sehr effektive Möglichkeit dar, die Plättchenfunktionen zu hemmen, da in diesem Fall die Signalübertragung vor Erreichen des Zellinneren und damit vor dem Auslösen komplexer Signalkaskaden unterbunden wird.

Der ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> ist für die ADP induzierte Aggregation von Thrombozyten von essentieller Bedeutung (59,112,113). So ist ADP nicht in der Lage, bei Patienten, denen der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor fehlt, eine Aggregation auszulösen (146). Bei gesunden Probanden stimuliert die Aktivierung des P2Y<sub>12</sub> durch ADP ein G-Protein, das zu einer nachfolgenden Hemmung der

cAMP bildenden Adenylyl Cyclase führt (113,125). Um eine evtl. vorhandene funktionelle Regulation des P2Y<sub>12</sub> durch die cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK) zu prüfen, wurden Thrombozyten mit dem cAMP erhöhenden Prostacyclinderivat Prostaglandin E<sub>1</sub> (PG-E<sub>1</sub>) und dem cGMP erhöhenden NO Donor (Sodium Nitroprussid, SNP) inkubiert. Dies führte zu einer Aufhebung der ADP vermittelten Hemmung PG-E<sub>1</sub> stimulierter cAMP Spiegel (siehe Abbildung 4). Ähnliches war für Adrenalin zu beobachten, das ebenso wie ADP ein G-Protein aktiviert: die Adrenalin vermittelte Hemmung der Adenylyl Cyclase war durch den NO-Donor SNP aufgehoben (siehe Abbildung 5).

Aufgrund der Verwendung von cGMP erhöhenden SNP konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob tatsächlich die cGK für die gemachten Beobachtungen verantwortlich ist. Es ist auch denkbar, dass cGMP als Substrat der PDE 2 (16) diese stimuliert und damit einen Abbau von cAMP verursacht. Um allein cGK Effekte zu messen, wurde daher der selektive cGK Aktivator 8pCPT-cGMP eingesetzt. Diese Verbindung verändert weder die allosterischen, noch die katalytischen Eigenschaften der PDEs und erlaubt daher eine Unterscheidung von PDE bzw. cGK vermittelten Effekten (130).

Die Aufhebung der ADP und der Adrenalin vermittelten Hemmung einer stimulierten cAMP Bildung durch SNP konnte mit dem selektiven cGK Aktivator 8pCPT-cGMP reproduziert werden (siehe Abbildung 6). Darüber hinaus erfolgte durch cGMP Erhöhung eine ebenso starke Aufhebung der purinergen und adrenergen Effekte wie durch Aktivierung der cGK, während der Anstieg von cAMP durch die Stimulation mit PG-E<sub>1</sub> in der Gegenwart von 8pCPT-cGMP unverändert blieb (vergleiche Abbildung 4 mit Abbildung 6). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADP/G<sub>i</sub>-Protein oder Adrenalin/G<sub>i</sub>-Protein vermittelte Signalwege durch die cGK gehemmt werden.

Das exakte Zielmolekül der cGK ist in diesem Fall noch zu identifizieren, da auf Grundlage dieser Daten nicht geklärt werden kann, ob die Interaktion der cGK auf der Ebene der Rezeptoren, der G<sub>i</sub>-Proteine oder auf der Ebene von beiden erfolgt. Vergleichbare Untersuchungen sind in Thrombozyten für Signalmoleküle gemacht worden, die an G<sub>q</sub>-Protein vermittelten Signalwegen beteiligt sind. So wurden *in vitro* der G<sub>q</sub>-gekoppelte Thromboxanrezeptor (81,82), der IP<sub>3</sub> Rezeptor (70,71) und die Phospholipase C $\beta$  (7) als cGK Substrate identifiziert. Alternativ könnte für die cGK Effekte auf die purinergen oder adrenergen Signalwege ein ähnlicher Mechanismus vorliegen wie er für die Calciumregulation beschrieben wurde: unabhängig vom Stimulus wird die Calciumerhöhung von der cGK durch Phosphorylierung des IP<sub>3</sub> Rezeptor assoziierten cGK Substrats gehemmt (79). Möglicherweise besitzen die ADP und die Adrenalin induzierten Signalwege ein gemeinsames Signalprotein, das das Zielmolekül der cGK ist.

In dieser Arbeit konnte ein neuer Mechanismus für die NO/cGMP vermittelte Hemmung der Plättchenaktivität nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass G<sub>i</sub> gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten durch die Aktivierung der cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) funktionell

gehemmt werden: die Hemmung  $PG-E_1$  stimulierter cAMP Spiegel durch ADP und Adrenalin wurde durch eine selektive cGK Stimulation vermindert (Abbildung 23). *In vivo* könnte dieser neue Mechanismus einen bedeutenden Beitrag zur NO/cGMP vermittelten Hemmung der Plättchenaktivierung und -aggregation leisten, da bereits geringfügige Änderungen der innerzellulären cAMP Konzentration massiven Einfluss auf die Thrombozytenfunktion ausüben können (84) und die Stimulation des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors für die ADP induzierte Thrombozytenaggregation essentiell ist. Auch wird der Synergismus der Endothelfaktoren NO und Prostacyclin durch die cGK vermittelte Hemmung purinerger und adrenerger Stimulation verstärkt, welches auf diesem Wege zur starken antiaggregatorischen Wirkung des Endothels beitragen kann. In Umkehrung könnte eine eingeschränkte Endothelfunktion die Effekte von ADP und Adrenalin verstärken. Vor diesem Hintergrund lässt sich die Bedeutung der klinisch bedeutsamen ADP Rezeptorantagonisten neu verstehen: Clopidogrel und Ticlopidin rekonstruieren durch eine Hemmung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors den fehlenden oder gestörten *in vivo* Mechanismus der endothelialen Thrombozytenhemmung.

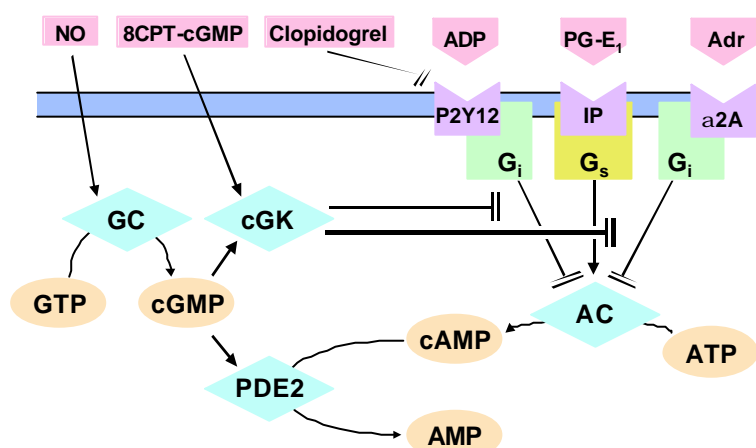


Abbildung 23: Signaltransduktion in humanen Thrombozyten.  $PG-E_1$  stimuliert die Bildung von cAMP durch eine Aktivierung eines  $G_s$ -Protein und der Adenylyl Cyclase (AC). Die Stimulation der Guanylyl Cyclase (GC) durch NO oder NO-Donoren wie SNP limitiert die cAMP Bildung durch eine Stimulation der cAMP abbauenden PDE 2. ADP, Adrenalin (Adr) aktivieren ein  $G_i$ -Protein und hemmen so die Adenylyl Cyclase. Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) wird durch cGMP oder durch 8pCPT-cGMP stimuliert. Clopidogrel hemmt den ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub>. Weitere Abkürzungen: GTP: Guanosintriphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat.

## 6.2 Phospholipase D als neuer Effektor des P2Y<sub>12</sub>: Essentielle Rolle G-gekoppelter Rezeptoren für die Sekretion

Bei einer Stimulation von Thrombozyten kommt es u.a. zu einer Veränderung der Thrombozytenform (*“shape change”*), zur Aggregation und zur Sekretion von Plättchenaktivatoren aus dem Zellinnern. Bei diesen Prozessen spielen Rezeptoren eine wichtige Rolle, die durch Bindung eines Liganden heterotrimere G-Proteine wie G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub> und/oder G<sub>i</sub> aktivieren. Während die Aktivierung eines G<sub>q</sub>-Proteins über eine Erhöhung der Calciumkonzentration und eine Stimulation der Proteinkinase C eine Aggregation und Sekretion auslöst und für diese essentiell ist, ist das G<sub>12/13</sub>-Protein über eine Aktivierung der Rho Kinase am *shape change* beteiligt. Die Rolle des G<sub>i</sub>-Proteins ist allerdings unklar. So kann eine Aktivierung von G-Proteinen in Thrombozyten zahlreiche G<sub>q</sub> stimulierte Plättchenfunktionen (63,68,132-134) potenzieren; jedoch ist unklar, welche Effektoren an G<sub>i</sub>-Protein vermittelten Signalen beteiligt sind.

In Untersuchungen dieser Arbeit zur Sekretion von Serotonin aus humanen Plättchen konnte ein auch potenzierender Effekt für die G-gekoppelten Rezeptoren von ADP und Adrenalin auch nachgewiesen werden: die Stimulierung des P2Y<sub>12</sub> oder des  $\alpha$ 2A Rezeptors verstärkte die induzierte Freisetzung von Serotonin durch das stabile Thromboxan A<sub>2</sub> Analogon U46619 (Abbildungen 8 und 10). Die funktionelle Hemmung des  $\alpha$ 2A führte dabei nur zu einer Aufhebung des Adrenalin vermittelten Mehranstiegs an sezerniertem Serotonin, ohne den U46619 Anteil zu ändern (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu war durch den enzymatischen Abbau allen ADPs (Abbildung 7) oder durch selektive P2Y<sub>12</sub> Rezeptorhemmung (Abbildung 8) die U46619 induzierte Degranulierung vollständig hemmbar. Dieser das ADP betreffende Befund war überraschend, da dem ADP nicht wie bisher angenommen bloß eine verstärkende Rolle bei der stimulierten Serotonin Sekretion zukam, vielmehr ergab sich der Eindruck, dass eine Aktivierung des ADP Rezeptors P2Y<sub>12</sub> für die U46619 induzierte Freisetzung von Serotonin von essentieller Bedeutung zu sein schien.

Eine G<sub>q</sub>-Protein Aktivierung vermittelt u.a. die Stimulierung der Proteinkinase C (PKC), deren direkte Aktivierung ebenfalls Sekretion auslösen kann (53-55,147). Um die essentielle Rolle der P2Y<sub>12</sub> Rezeptoraktivierung für die Sekretion durch weitere Versuche zu belegen, wurde der mögliche Einfluss des G-gekoppelten P2Y<sub>12</sub> auf die PKC induzierte Sekretion untersucht. Die Hemmung der PKC verhinderte erwartungsgemäß die U46619 stimulierte Serotoninfreisetzung (Abbildung 9). Folgerichtig löste auch eine direkte Aktivierung der PKC eine Degranulierung aus, die aber wiederum durch P2Y<sub>12</sub> Rezeptorhemmung vollständig gehemmt werden konnte (Abbildung 9). Die vorher gemachten Beobachtungen bestätigten sich also: eine G<sub>i</sub>-Protein Aktivierung verstärkt eine initiale G<sub>q</sub> Stimulierung der Sekretion nicht, sondern sie scheint selbst Sekretion auszulösen. Beide Signalwege sind aber essentiell und ermöglichen nur im



Zusammenspiel eine Degranulierung. Die Aktivierung  $G_q$  vermittelter Signalwege ist erforderlich, um einer  $G_i$  Stimulation das Auslösen der Sekretion zu ermöglichen.

Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen überein, nach denen ein Patient mit einem angeborenem P2Y<sub>12</sub> Rezeptordefekt nach Stimulierung mit U46619 oder Thrombin (bei Konzentrationen kleiner 0,3 U/ml) überhaupt keine thrombozytäre Sekretion zeigte (146). Die Behandlung von Patienten mit P2Y<sub>12</sub> Rezeptorantagonisten führte ausserdem zu einer eingeschränkten Degranulierung (148), die deswegen nicht vollständig gehemmt war, weil es unter therapeutischen Bedingungen nur zu einer Hemmung von etwa 70% der P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren kommt (118).

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die Frage, woher das für die U46619 Stimulation benötigte ADP stammte, da es auf Grundlage dieser neuen Befunde es nicht wie bisher angenommen über eine initiale Stimulation der Sekretion aus dem Zellinnern der Plättchen kommen konnte. Messungen der inhibitorischen P2Y<sub>12</sub> Rezeptoraktivität auf die Adenylyl Cyclase vermittelte Bildung von cAMP erbrachten den Beweis, dass extrazelluläres ADP in solchen Mengen vorhanden ist, dass es einen klar signifikanten funktionellen Effekt auf die P2Y<sub>12</sub> vermittelte Inhibierung stimulierter cAMP Bildung auszuüben vermag: die Hemmung des P2Y<sub>12</sub> durch einen selektiven Inhibitor verursachte einen verstärkten Anstieg der Prostaglandin E<sub>1</sub> stimulierten Bildung von cAMP (Tabelle 8). Aus diesen Daten ließ sich folgern, dass eine Stimulierung  $G_q$ -gekoppelter Signalwege extrazellulär vorhandenem ADP über eine P2Y<sub>12</sub> Rezeptoraktivierung das Auslösen einer Degranulierung ermöglicht.

ADP könnte dabei aus den physiologisch permanent vorhandenen Mikroläsionen des Endothels stammen. Unter *in vitro* Bedingungen könnte ADP auch bei der Gewinnung von Plättchenreichem Plasma (PRP) aus gespendetem Vollblut freigesetzt werden. Zahlreiche Blutkörperchen wie Erythrozyten, die einen sehr hohen Gehalt an ADP haben, werden durch eine Zentrifugation sichtbar beschädigt und können so eine erhöhte ADP Konzentration im Plasma verursachen. Einen Beweis für die Existenz signifikanter Mengen an ADP im Plasma liefert auch die Tatsache, dass die ADP induzierte Aggregation im PRP mit der Zeit schwächer wird. Dieser Befund wird auf die Desensibilisierung des  $G_q$  gekoppelten ADP Rezeptors P2Y<sub>1</sub> zurückgeführt (149). In Versuchen konnte dieses Phänomen dann vermieden werden, wenn lösliche (149) oder membrangebundene (150) Ectonucleotidasen vorhanden waren und einen enzymatischen Abbau des ADPs katalysierten.

Die Adenylyl Cyclase (AC) ist als Effektor für die Rezeptoren P2Y<sub>12</sub> und  $\alpha_2A$  gut beschrieben (44). Deren inhibitorische Wirkung auf die AC kann durch direkte Hemmung des Enzyms mit selektiven Inhibitoren zwar ebenso erreicht werden, jedoch konnten bisher dadurch die postulierten potenzierenden Effekte auf stimulierte Aggregation oder Sekretion nicht reproduziert werden (59-62). Dies ist auch in eigenen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen

(Abbildung 11). Neben diesen funktionellen Messungen wurden auch Messungen der Enzymaktivität selbst unternommen (keine Abbildung), da für die angenommene verstärkende Wirkung der  $G_i$  gekoppelten Rezeptoren auf die Plättchenfunktion theoretisch eine verminderte basale Cyclasenaktivität im Thrombozyten von Nöten gewesen wäre. Es war aber unter keinen Bedingungen möglich, eine Erniedrigung basaler cAMP Spiegel zu messen. Weder U46619, noch Thrombin, noch ADP oder Adrenalin verringerten die basale Cyclonukleotidkonzentration im Thrombozyten (keine Abbildung). Auch war keine veränderte Cyclonukleotid vermittelte basale Kinasenaktivität zu beobachten, wenn Plättchen mit Inhibitoren von cyclonukleotidabbauenden Enzymen inkubiert wurden (Abbildungen 16 und 17). Eine Relevanz der Adenylyl Cyclase für die beobachteten adrenergen und v.a. purinergen Effekte wurde daher ausgeschlossen.

Als möglicher Effektor, der die beobachteten Effekte des P2Y<sub>12</sub> bei der Sekretion vermitteln könnte, kam die Phospholipase D (PLD) in Betracht. Diese bewirkt in zahlreichen Körperzellen, einschließlich Blutzellen, die Sekretion von Botenstoffen nach entsprechender Stimulierung der Zelle (136-141). Ihre Existenz wurde für Thrombozyten zwar gezeigt (142,143), konnte jedoch bislang keinem Signalweg in Plättchen eindeutig zugeordnet werden. Durch eine Erhöhung der Substrat- bzw. der Produktkonzentration und durch eine gleichzeitige, indirekte Stimulation des  $G_i$ -gekoppelten P2Y<sub>12</sub> Rezeptors mit U46619 konnte gezeigt werden, dass die  $G_i$ -Protein vermittelte Sekretion und die PLD den selben biochemischen Signalweg nutzen (Abbildungen 12 und 13). Diese Daten werden durch die direkte Messung der PLD Aktivität gestützt: die Stimulierung der PLD durch U46619 war durch selektive Inhibierung des ADP Rezeptors P2Y<sub>12</sub> massiv hemmbar (Abbildung 15). Diese Befunde legten den Schluss nahe, dass die Stimulierung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors eine Aktivierung der Phospholipase D und gleichzeitig die Sekretion von Botenstoffen wie Serotonin aus dem Thrombozyten auslöst.

In dieser Arbeit konnte des weiteren gezeigt werden, dass eine  $G_i$ -Protein Aktivierung auf Thrombozyten eine initiale Sekretion durch  $G_q$  nicht bloß wie bisher angenommen verstärkt und aufrechterhält, sondern der eigentliche Stimulus ist, der die Degranulierung von Thrombozyten auslöst. Die Stimulation  $G_q$  vermittelter Signalwege ist nur insofern erforderlich, als diese das Auslösen der Sekretion durch eine Aktivierung von  $G$ -Proteinen ermöglichen. Die Stimulierung beider  $G$ -Proteine ist daher essentiell für die thrombozytäre Sekretion. Zudem konnte die Phospholipase D als ein neuer Effektor des  $G_i$ -gekoppelten P2Y<sub>12</sub> nachgewiesen werden, deren Stimulierung wahrscheinlich zur Degranulierung von Thrombozyten führt. Dieser Mechanismus könnte der Entscheidende sein, der der essentiellen Rolle des  $G_i$ -Proteins bei der Stimulation der Sekretion und der Aktivierung von Thrombozyten zu Grunde liegt.

Mit den herkömmlichen biochemischen Methoden ist es jedoch nicht möglich, einen eindeutigen Beweis für die Beteiligung der PLD an der thrombozytären Sekretion zu führen, da spezifische

Aktivatoren und Inhibitoren für die PLD nicht existieren. Die postnatale Einführung dominant negativer Mutanten der PLD ist für Thrombozyten technisch nicht möglich. Man könnte zwar auf Zellkulturmodelle ausweichen, deren Aussage aber sehr schlecht auf die Thrombozytendegranulierung übertragbar wäre. Die Generierung einer PLD-defizienten Maus bietet einen sinnvollen Ansatz, dieses Problem zu lösen. Die Degranulierung muriner Thrombozyten ist problemlos messbar, und die Aussage zur Bedeutung der PLD für die Sekretion wäre eindeutig.

### 6.3 Biochemischer Wirkmechanismus des Dipyridamols in humanen Thrombozyten

Eine Erhöhung der Cyclonukleotidkonzentration in Thrombozyten durch endotheliale Faktoren wie NO oder Prostacyclin führt zu einer Hemmung der Thrombozytenfunktion und zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine wie der Phosphorylierung des Vasodilator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) (7,9,20). Zahlreiche Thrombozytenfunktionshemmer interferieren mit den Cyclonukleotid vermittelten Signalwegen und stellen so eine wichtige Möglichkeit dar, die Folgen vaskulärer Erkrankungen zu verhindern. So kann eine Behandlung mit retardiertem Dipyridamol alleine oder auch in Kombination mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure das Risiko eines Sekundärschlaganfalls senken (96). Für das Dipyridamol sind eine Reihe von biochemischen Mechanismen beschrieben worden (100,102-104,106). Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese Mechanismen einen Beitrag zu den klinischen Benefits der Verbindung leisten, da bei einer Behandlung mit retardiertem Dipyridamol sehr niedrige Plasmaspiegel von 0,8 bis 3,6  $\mu\text{M}$  erreicht werden (111).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die in Thrombozyten eine quantitative Bestimmung Cyclonukleotid vermittelter Kinasenaktivität ermöglicht. Gemessen wurde hierbei die Phosphorylierung von VASP, das ein Substrat der cAMP- und der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK bzw. cGK) ist (20). *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass die Inkubation mit dem NO-Donor SNP und dem Prostacyclinanalogon PG-E<sub>1</sub> zu einer rapiden VASP Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin 239 und Serin 157 führt (siehe Abbildungen 16 und 17). Jedoch verstärkte eine therapeutisch relevante Dipyridamolkonzentration (3,5  $\mu\text{M}$ ) nur die NO/cGMP, aber nicht die PG-E<sub>1</sub>/cAMP vermittelte VASP Phosphorylierung (Abbildung 17). Dipyridamol alleine hatte weder einen Einfluss auf die basale VASP Phosphorylierung (Abbildungen 16 und 17) noch auf basale cGMP Spiegel (keine Abbildung), woraus der Schluss gezogen werden kann, dass der Dipyridamoleffekt nur in Gegenwart eines NO/cGMP Stimulus zum Tragen kommt. Als biochemische Erklärung hierfür kommt eine Hemmung von Phosphodiesterasen (PDE) in Betracht, da diese nur in Gegenwart eines Stimulus aktiv sind und im Falle einer Hemmung zu einer Verstärkung der Cyclonukleotid vermittelten Signalwege führen. Unter den bekannten PDEs werden nur die PDE 9 und die PDE 5 durch cGMP aktiviert, die wiederum selektiv nur cGMP hydrolysieren (16). Auf Thrombozyten ist nur die PDE 5 nachgewiesen (18). Die Hemmung dieses Enzyms könnte als biochemischer Mechanismus des Dipyridamols angenommen werden, da *in vitro* Untersuchungen zudem eine Affinität des Dipyridamols zur PDE 5 mit einem IC<sub>50</sub> von 1,6  $\mu\text{M}$  (108) belegen.

Neben einer Hemmung der PDE 5 durch Dipyridamol käme als weiterer Angriffspunkt das MRP 5 (*multiple resistance protein 5*) für die gemachten Beobachtungen in Betracht. Es stellt funktionell eine ATP abhängige Pumpe dar, die cGMP aus dem Zellinnern in das extrazelluläre Lumen transportiert. Dieses Protein kann in seiner Funktion durch zahlreiche bekannte Inhibitoren der

Phosphodiesterase 5 gehemmt werden (151), was schließlich zu einer Erhöhung stimulierter intrazellulärer Cyclonukleotidspiegel führen könnte. Dieses Protein ist bislang auf Thrombozyten nicht nachgewiesen worden, jedoch deutet ein Nebenbefund dieser Arbeit auf seine Existenz: Dipyridamol in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  verstärkte die VASP Phosphorylierung, induziert durch das PDE resistente cGMP Analog 8pCPT-cGMP. Eine Hemmung des MRP 5 durch das membranaktive Dipyridamol käme als Erklärung hierfür in Frage, zumal diese Beobachtung sich im Augenblick durch keinen bekannten Dipyridamolmechanismus erklären lässt. Interessanterweise waren aber die Beobachtungen aus den 8pCPT-cGMP Versuchen mit therapeutisch relevanten Konzentrationen an Dipyridamol nicht reproduzierbar, so dass eine mögliche *in vivo* Relevanz dieses Mechanismus fraglich erscheint.

In früheren Studien konnte ein Synergismus von NO und Prostacyclin auf die funktionelle Hemmung von Thrombozyten und auf die Cyclonukleotid vermittelte Phosphorylierung von Proteinen gezeigt werden (20). Dieser Synergismus beruht weitgehend auf einer Hemmung der PDE 3 durch cGMP, wodurch Prostacyclin/cAMP vermittelte Signalwege verstärkt werden (19,21). Dabei können geringfügige Änderungen der cGMP Konzentration zu einem starken Gesamthemmeffekt auf die Thrombozytenfunktion führen (84). Dipyridamol verstärkte den Synergismus auf die VASP Phosphorylierung (Abbildung 17), was sich durch eine Hemmung der PDE 5 und nachfolgend einer Erhöhung der cGMP Konzentration erklären ließe. Dieser Mechanismus könnte *in vivo* die Effekte des Dipyridamols auf die Thrombozytenfunktion vervielfachen und so zur klinischen Wirksamkeit der Verbindung beitragen. Interessanterweise reicht ein Anstieg von cGMP nicht aus, basale cAMP Spiegel zu erhöhen und dadurch basale cAK Effekte zu verstärken (Abbildung 17). Die hier erhobenen Daten belegen daher die Hypothese, dass alle cGMP Effekte über cAK vermittelt werden, nicht (131,152,153).

Um eine funktionelle Relevanz dieser biochemischen Untersuchungen zu zeigen, wurde ein möglicher Effekt von Dipyridamol auf die Serotoninsekretion und auf die Thromboxansynthaseaktivität untersucht. Beides sind wichtige Amplifikationsprozesse während der Hämostase. So leiden Patienten mit einem Sekretionsdefekt an einer deutlich verlängerten Blutungszeit (146), und die Hemmung der Thromboxansynthase stellt den Hauptmechanismus dar, durch den der Goldstandard unter den Thrombozytenfunktionshemmer, die Acetylsalicylsäure, seine antithrombotische Wirkung entfaltet (145). Der NO-Donor SNP verminderte dosisabhängig die Stimulation der Thromboxansynthase mit Thrombin. Diese Hemmung wurde von Dipyridamol (3,5  $\mu\text{M}$ ) signifikant verstärkt (Abbildung 18). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den Untersuchungen zur Serotoninsekretion: die SNP induzierte Hemmung der Agonist stimulierten Serotoninfreisetzung wurde durch Dipyridamol verstärkt (Abbildung 19). Im Gegensatz zur Aktivierung der Thromboxansynthase ist die Freisetzung von Serotonin durch verschiedene Stimuli wie Thrombin, Collagen oder das Thromboxananalogon U46619 auslösbar (keine

Abbildung), was auf verschiedene Signalwege hindeutet, die zur Sekretion und zur Aktivierung der Thromboxansynthase führen. Beide Prozesse sind jedoch durch den NO/cGMP Signalweg hemmbar. Diese Befunde stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die eine verstärkende Wirkung von Dipyridamol auf die NO vermittelte Hemmung der Aggregation zeigten (110).

Diese *in vitro* Untersuchungen bestätigten *in vivo/ex vivo* Versuche an gesunden Probanden, die einmalig 200 mg Dipyridamol in retardierter Form eingenommen hatten: die induzierte VASP Phosphorylierung durch den NO Donor SNP war etwa zweimal stärker als vor der Einnahme (Abbildung 20).

Diese Arbeit demonstriert zum ersten Mal einen biochemischen Wirkmechanismus des Dipyridamols auf Thrombozyten unter therapeutisch relevanten Bedingungen. Dipyridamol verstärkte selektiv die NO/cGMP vermittelten Signalwege und in ihrer Konsequenz die VASP Phosphorylierung (Abbildung 24), die Hemmung der Serotoninsekretion und die Hemmung der Thromboxansynthase. Diese Effekte auf NO/cGMP können auch unter *in vivo* Bedingungen im Gefäßsystem und in der Gefäßwand angenommen werden, da NO/cGMP Signalwege in Thrombozyten von Dipyridamol behandelten Probanden verstärkt wurden. Zahlreiche Erkrankungen wie Arteriosklerose, Diabetes oder Bluthochdruck sind durch eine eingeschränkte Endothelfunktion charakterisiert. Das Dipyridamol hätte gerade bei diesen Risikopatienten einen Nutzen, da Dipyridamol den Mangel an freigesetztem NO durch eine Verstärkung des NO Signals ausgleicht. In Gefäßbereichen einer eingeschränkten oder fehlenden Endothelfunktion könnte das Dipyridamol die Plättchen vor einer den Organismus schädigenden Aktivierung bewahren und so zur antithrombotischen Wirkung des Dipyridamols beitragen.

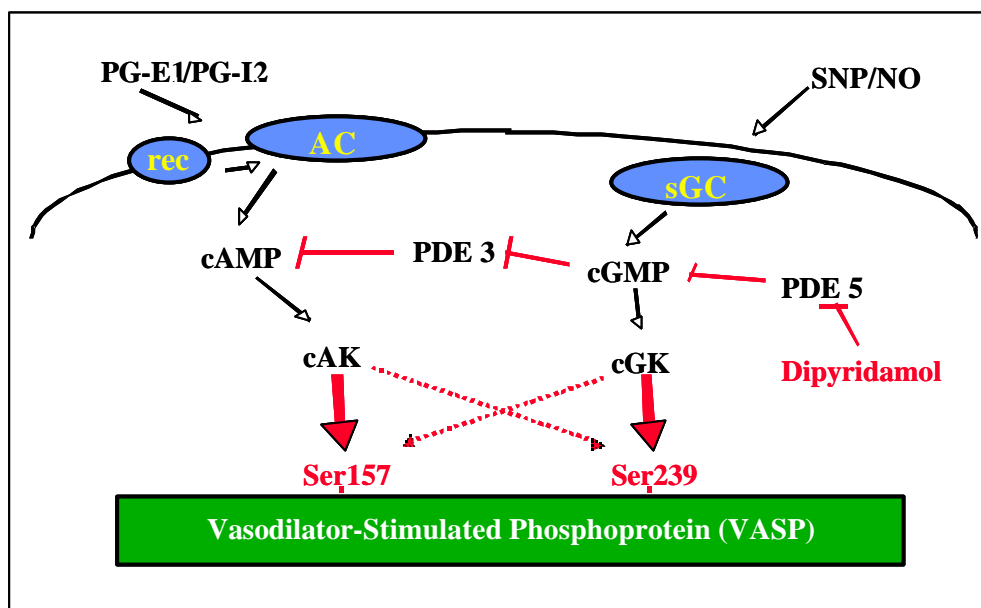


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Dipyridamolwirkung auf die Cyclonukleotid vermittelte VASP Phosphorylierung: Dipyridamol hemmt die cGMP spezifische PDE 5, das zu einer Verstärkung der NO/cGMP vermittelten VASP Phosphorylierung an Serin 239 (Ser239) und Serin 157 (Ser157) führt. Unter therapeutisch relevanten Bedingungen verstärkt Dipyridamol nur den NO/cGMP, und nicht den Prostacyclin/cAMP Signalweg. Abkürzungen: PG-E1: Prostaglandin E1; PG-I2: Prostacyclin; AC: Adenylat Cyclase; SNP: Sodium Nitroprussid; sGC: lösliche ("soluble") Guanylat Cyclase; cAK: cAMP abhängige Proteinkinase; cGK: cGMP abhängige Proteinkinase; PDE: Phosphodiesterase.

Wie am Beispiel des Dipyridamols demonstriert, eignet sich der Parameter der VASP Phosphorylierung dafür, die Hemmung von Plättchen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Da die Phosphorylierung von VASP unter *in vivo* Bedingungen endothelabhängig ist, kann sie auch dazu genutzt werden, pathophysiologische Änderungen in der Gefäßwand zu messen. So wurde bereits gezeigt, dass die VASP Phosphorylierung einen sensitiven Marker darstellt, eingeschränkte NO/cGMP Aktivität in hyperlipidämischen Kaninchen (154), hypertensiven Ratten (155) und bei Nitrattoleranzen in Kaninchen (156) und Mensch (157) zu detektieren. Die VASP Phosphorylierung in Thrombozyten könnte sich daher als Surrogatparameter für die endotheliale Dysfunktion eignen, die ein Mitauslöser vaskulärer Erkrankungen bei Arteriosklerose, Diabetes oder Bluthochdruck ist. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit verwandten Methode zur Bestimmung der VASP Phosphorylierung kann ein Assay entwickelt werden, der die VASP Phosphorylierung als klinischen Marker schnell und genau erfasst.

Die zahlreichen Wirkungen des Dipyridamols auf unterschiedlichste biochemische Vorgänge (Aufnahme, Synthese und Abbau von Botenstoffen) deuten möglicherweise auf eine strukturelle Verwandtschaft der beteiligten, vom Dipyridamol betroffenen Signalmoleküle hin. Wahrscheinlich eignet sich daher das Dipyridamol als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer pharmazeutischer Verbindungen, die im Hinblick auf die Einzelwirkkomponenten optimiert werden müssten.

#### 6.4 DELFIA-Assay zur Therapiekontrolle von Clopidogreleffekten

Die Kontrolle der Arzneimittelwirkung am Patienten kann einen wichtigen Beitrag zur Arzneimittelsicherheit leisten. Dabei stehen hierzu verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Über eine Plasmaspiegelbestimmung des Arzneistoffs oder eines Metaboliten lässt sich sowohl die Einnahme der Medikation als auch die Konzentration der eingenommenen Substanz im Blut messen. Diese Methode, die auch als *drug monitoring* bezeichnet wird, liefert keine klare Aussage über die tatsächliche Funktionsänderung der Zelle. Eine exaktere Annäherung, die Wirkung von Arzneistoffen zu beschreiben ist die Möglichkeit, die Veränderungen in der Zelle anhand von biochemischen Markern zu verfolgen (*“effect monitoring”*).

Die Voraussetzung für eine Entwicklung solcher Assays ist die genaue Kenntnis des Wirkmechanismus des Arzneistoffes. Das Clopidogrel, das in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dem Goldstandard Acetylsalicylsäure leicht überlegen ist (122), hemmt auf Thrombozyten den ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> (44,123,124). In zahlreichen *in vitro* (112,121) und auch *in vivo* Studien (113,125) konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel zu einer irreversiblen Aufhebung der P2Y<sub>12</sub> vermittelten Hemmung der Adenylyl Cyclase führt (siehe dazu auch Abbildung 25). Durch diesen Mechanismus wird unter einer Clopidogrelbehandlung im Thrombozyten die Bildung von cAMP und als Konsequenz daraus, die Phosphorylierung des Vasodilator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) durch die cAMP-abhängige Proteinkinase verstärkt (113,125).

Die qualitative und quantitative Bestimmung der VASP Phosphorylierung ist mit einem Assay der Fa. Vasopharm Biotech möglich (bislang nicht publiziert). Mit seiner Hilfe wurden in Vorversuchen die Bedingungen zur Quantifizierung von Clopidogreleffekten so gewählt, dass durch Aktivierung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors eine vollständige Hemmung der Adenylyl Cyclase vermittelten VASP Phosphorylierung erzielt wurde (Abbildung 21), da bei irreversibler Bindung des Clopidogrels an den P2Y<sub>12</sub> alle Clopidogreleffekte durch einen Anstieg der VASP Phosphorylierung über den Basalwert ausgewiesen werden könnten.

Bei der Messung der VASP Phosphorylierung in Thrombozyten von Clopidogrel behandelten Patienten zeichnete sich ein Wirkverlauf ab, der mit dem in der Literatur beschriebenen gut übereinstimmt. Demnach erfolgt der Wirkeintritt des Clopidogrels nach hepatischer Metabolisierung ca. zwei bis fünf Tage nach Einnahme der ersten Dosis, und eine stabile Plasmakonzentration an Clopidogrel ist nach etwa sieben Tagen zu beobachten (118). Folgerichtig lässt sich zwölf Stunden nach Einnahme von 300 mg Clopidogrel noch kein Effekt auf die VASP Phosphorylierung messen (Abbildung 22). Erst nach drei bis fünf Tagen ist die ADP vermittelte Hemmung der stimulierten VASP Phosphorylierung durch Clopidogrel teilweise, in einem Fall sogar erst nach zweiwöchiger Behandlung fast vollständig aufgehoben (Abbildung 22).



Diese Daten korrelieren auch gut mit früheren Studien, die mit Hilfe der Western Blot Technik (113) und der Durchflußzytometrie (125) Clopidogrel-Effekte auf Thrombozyten untersuchten.

Im Vergleich zu diesen Methoden bietet der DELFIA Assay jedoch folgende Vorteile: er ist schneller durchzuführen, man kommt mit einer sehr geringen Blutmenge aus (700 µl), und der Probendurchsatz ist größer. So lassen sich im momentanen Format Blutproben von etwa 50 – 60 Patienten in ca. vier Stunden vermessen, deren Bestimmung mit den anderen Methoden, wie z.B. Western Blot mehrere Tage bis Wochen erforderte.

In dieser Arbeit wurde ein Assay entwickelt, mit dem Clopidogrel-Effekte auf humanen Thrombozyten qualitativ und quantitativ bestimmt werden können. Mit dem Assay könnte nun in einer umfangreicheren und systematischeren Studie die Wirkung des Clopidogrels oder des Ticlopidins, das ebenfalls an den P2Y12 Rezeptor bindet, untersucht werden. Sie könnte Aufschluss über den tatsächlichen Wirkeintritt, die Wirkstärke und die Wirkdauer der Thienopyridine geben. Weitere interessante Aspekte zum Beispiel mögliche Synergien mit anderen Thrombozytenfunktionshemmern (z.B. Acetylsalicylsäure), Kreuzreaktionen mit anderen Arzneimitteln oder die Identifikation von Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprechen (Therapieversager) könnten untersucht werden. Zu letzterem sind bislang nur Einzelfallberichte bekannt (113). Durch eine Untersuchung der genannten Punkte kann der Assay einen wichtigen Beitrag zur Arzneimittelsicherheit des Clopidogrels leisten und zahlreiche bislang noch unbekannt Eigenschaften der Verbindung verstehen helfen.

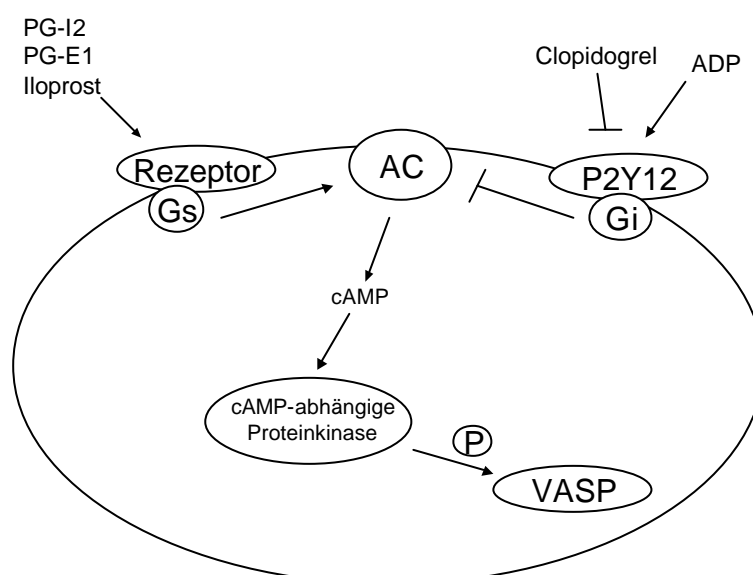


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Clopidogrelwirkung auf die VASP Phosphorylierung. Über ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ) wird die Adenyl Cyclase (AC) aktiviert, die Bildung von cAMP und die Phosphorylierung von VASP durch die cAMP-abhängige Proteinkinase angeregt. Durch eine Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins ( $G_i$ ) hemmt ADP die AC vermittelte VASP Phosphorylierung. Durch irreversible Bindung des Clopidogrels an den ADP Rezeptor P2Y12 wird sie wieder aufgehoben.

## 7. LITERATUR

1. Gawaz M. Blood Platelets. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 1999.
2. WHO. World health report 1998: life in the 21st century: a vision for all. WHO Geneva, Switzerland 1998.
3. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326(4):242-50.
4. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92(3):657-71.
5. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91(11):2844-50.
6. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323(1):27-36.
7. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 2001;62(9):1153-61.
8. Woulfe D, Yang J, Brass L. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* 2001;107(12):1503-5.
9. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997;22(8):307-12.
10. Geiger J, Nolte C, Butt E, Sage SO, Walter U. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(3):1031-5.
11. Geiger J, Nolte C, Walter U. Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *Am J Physiol* 1994;267(1 Pt 1):C236-44.
12. Wu CC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231(2):412-6.
13. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 1994;225(1):21-7.
14. Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;70(1):217-23.
15. Butt E, Walter U. Platelet Phosphodiesterases. In: von Bruchhausen F, Walter U., editor. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Volume Vol. 126. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p 219-230.
16. Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(2):174-9.
17. Haslam RJ, Dickinson NT, Jang EK. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb Haemost* 1999;82(2):412-23.

18. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999;83(5A):3C-12C.
19. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92(3):639-46.
20. Nolte C, Eigenthaler M, Horstrup K, Honig-Liedl P, Walter U. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating platelet inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1994;48(8):1569-75.
21. Fisch A, Michael-Hepp J, Meyer J, Darius H. Synergistic interaction of adenylate cyclase activators and nitric oxide donor SIN-1 on platelet cyclic AMP. *Eur J Pharmacol* 1995;289(3):455-61.
22. Grunberg B, Negrescu E, Siess W. Synergistic phosphorylation of platelet rap1B by SIN-1 and iloprost. *Eur J Pharmacol* 1995;288(3):329-33.
23. Nicholson CD, Challiss RA, Shahid M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12(1):19-27.
24. Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* 1975;255(5511):720-2.
25. Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem* 2000;381(5-6):389-96.
26. George JN, Nurden AT, Phillips DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Engl J Med* 1984;311(17):1084-98.
27. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(5):695-704.
28. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84(2):289-97.
29. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998;94(5):657-66.
30. Caen JP, Nurden AT, Jeanneau C, Michel H, Tobelem G, Levy-Toledano S, Sultan Y, Valensi F, Bernard J. Bernard-Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality. Its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the factor VIII von Willebrand protein. *J Lab Clin Med* 1976;87(4):586-96.

31. Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5(1):97-119.
32. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* 2001;20(9):2120-30.
33. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998;91(8):2645-57.
34. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):91-105.
35. Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Biol Chem* 1991;266(3):1415-21.
36. Brass LF, Hoxie JA, Kieber-Emmons T, Manning DR, Poncz M, Woolkalis M. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:17-36.
37. Kim S, Foster C, Lecchi A, Quinton TM, Prosser DM, Jin J, Cattaneo M, Kunapuli SP. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood* 2002;99(10):3629-36.
38. Geiger. Anti-aggregatory drugs: I. Platelet receptor antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents* 1999;9(10):1389-1414.
39. Rink TJ, Sage SO. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* 1990;52:431-49.
40. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987;262(3):992-1000.
41. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997;389(6647):183-6.
42. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 1999;5(10):1199-202.
43. Leon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett* 1997;403(1):26-30.
44. Hoppel G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409(6817):202-7.

45. Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 1999;104(12):1731-7.
46. Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP- induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol* 1998;103(3):858-66.
47. Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998;92(1):152-9.
48. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):8070-4.
49. Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert JM. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett* 1998;422(3):291-5.
50. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 1998;273(4):2030-4.
51. Knight DE, Niggli V, Scrutton MC. Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Biochem* 1984;143(2):437-46.
52. Davies TA, Drotts DL, Weil GJ, Simons ER. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Biol Chem* 1989;264(33):19600-6.
53. Rink TJ, Sanchez A, Hallam TJ. Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets. *Nature* 1983;305(5932):317-9.
54. Yamada K, Iwahashi K, Kase H. K252a, a new inhibitor of protein kinase C, concomitantly inhibits 40K protein phosphorylation and serotonin secretion in a phorbol ester- stimulated platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144(1):35-40.
55. Watson SP, McNally J, Shipman LJ, Godfrey PP. The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. Evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol trisphosphate by thrombin. *Biochem J* 1988;249(2):345-50.
56. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001;86(1):222-32.
57. Nieswandt B, Schulte V, Zywiec A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002;277(42):39493-8.

58. Dorsam RT, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem* 2002;277(49):47588-95.
59. Savi P, Pflieger AM, Herbert JM. cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7(2):249-52.
60. Pulcinelli FM, Pesciotti M, Pignatelli P, Riondino S, Gazzaniga PP. Concomitant activation of Gi and Gq protein-coupled receptors does not require an increase in cytosolic calcium for platelet aggregation. *FEBS Lett* 1998;435(1):115-8.
61. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Kim YB, Kunapuli SP. Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* 1999;82(4):1322-6.
62. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* 2002;277(48):46035-42.
63. Dangelmaier C, Jin J, Smith JB, Kunapuli SP. Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost* 2001;85(2):341-8.
64. Zhang J, Shattil SJ, Cunningham MC, Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or beta-phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of alphaIIb beta3 integrin. *J Biol Chem* 1996;271(11):6265-72.
65. Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *Faseb J* 2001;15(11):2019-21.
66. Cole B, Robison GA, Hartmann RC. The role of cyclic AMP in platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 1971;185:477-87.
67. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 1987;238(4827):650-6.
68. Keularts IM, van Gorp RM, Feijge MA, Vuist WM, Heemskerk JW. alpha(2A)-adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels. *J Biol Chem* 2000;275(3):1763-72.
69. Manganello JM, Djellas Y, Borg C, Antonakis K, Le Breton GC. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A(2) receptor-associated Galpha(13). *J Biol Chem* 1999;274(39):28003-10.

70. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem* 1996;271(10):5545-51.
71. El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, Patel G, Goulding D, Lupu F, Wojcikiewicz RJ, Authi KS. Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* 2000;95(11):3412-22.
72. Chen M, Stracher A. In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem* 1989;264(24):14282-9.
73. Hettasch JM, Sellers JR. Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266(18):11876-81.
74. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 1994;269(20):14509-17.
75. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, Zimmer M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(14):8120-5.
76. Macphee CH, Reifsnyder DH, Moore TA, Lerea KM, Beavo JA. Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets. *J Biol Chem* 1988;263(21):10353-8.
77. Turko IV, Francis SH, Corbin JD. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J* 1998;329(Pt 3):505-10.
78. Wardell MR, Reynolds CC, Berndt MC, Wallace RW, Fox JE. Platelet glycoprotein Ib beta is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1989;264(26):15656-61.
79. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 2000;404(6774):197-201.

80. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 2000;267(9):2760-7.
81. Walsh MT, Foley JF, Kinsella BT. The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for prostacyclin-mediated desensitization. *J Biol Chem* 2000;275(27):20412-23.
82. Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):4888-93.
83. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1998;273(32):20029-35.
84. Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem* 1992;205(2):471-81.
85. Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch BM, Walter U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *Embo J* 1992;11(6):2063-70.
86. Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* 1995;14(8):1583-9.
87. Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D, Walter U. Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):7956-60.
88. Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, Walter U. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett* 1996;399(1-2):103-7.
89. Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel B, Pistor S, Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Reinhard M, Walter U, et al. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *Embo J* 1995;14(7):1314-21.
90. Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* 1999;274(33):23549-57.



91. Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J* 1999;18(1):37-48.
92. Smolenski A, Poller W, Walter U, Lohmann SM. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 2000;275(33):25723-32.
93. Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 2000;275(40):30817-25.
94. Garcia Arguinzonis MI, Galler AB, Walter U, Reinhard M, Simm A. Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J Biol Chem* 2002;277(47):45604-10.
95. Geiger J. Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10(5):865-90.
96. Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci* 1996;143(1-2):1-13.
97. Diener HC. Antiplatelet drugs in secondary prevention of stroke. *Int J Clin Pract* 1998;52(2):91-7.
98. Diener HC. Dipyridamole trials in stroke prevention. *Neurology* 1998;51(3 Suppl 3):S17-9.
99. Gorelick PB. Stroke prevention therapy beyond antithrombotics: unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy: an invited review. *Stroke* 2002;33(3):862-75.
100. Gresele P, Zoja C, Deckmyn H, Arnout J, Vermynen J, Verstraete M. Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 1983;50(4):852-6.
101. Gresele P, Arnout J, Deckmyn H, Vermynen J. Mechanism of the antiplatelet action of dipyridamole in whole blood: modulation of adenosine concentration and activity. *Thromb Haemost* 1986;55(1):12-8.
102. Ferrandon P, Barcelo B, Perche JC, Schoffs AR. Effects of dipyridamole, solufazine and related molecules on adenosine uptake and metabolism by isolated human red blood cells. *Fundam Clin Pharmacol* 1994;8(5):446-52.
103. Neri Serneri GG, Masotti G, Poggesi L, Galanti G, Morettini A. Enhanced prostacyclin production by dipyridamole in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1981;21(1):9-15.
104. Mehta J, Mehta P, Hay D. Effect of dipyridamole on prostaglandin generation by human platelets and vessel walls. *Prostaglandins* 1982;24(6):751-61.

105. Mehta J, Mehta P. Dipyridamole and aspirin in relation to platelet aggregation and vessel wall prostaglandin generation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4(4):688-93.
106. Costantini V, Talpacci A, Bastiano ML, Boschetti E, Cipolloni S, Bisacci R, Nenci GG. Increased prostacyclin production from human veins by dipyridamole: an in vitro and ex vivo study. *Biomed Biochim Acta* 1990;49(4):263-71.
107. Costantini V, Talpacci A, Cipolloni S, Boschetti E, Bisacci R, Tristaino B, Nenci GG. Effect of aspirin and dipyridamole treatment on prostacyclin production by human veins. *Thromb Res* 1990;58(2):109-17.
108. Ahn HS, Crim W, Romano M, Sybertz E, Pitts B. Effects of selective inhibitors on cyclic nucleotide phosphodiesterases of rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 1989;38(19):3331-9.
109. Gillespie PG, Beavo JA. Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyridamole and M&B 22,948. *Mol Pharmacol* 1989;36(5):773-81.
110. Sakuma I, Akaishi Y, Fukao M, Makita Y, Makita MA, Kobayashi T, Matsuno K, Miyazaki T, Yasuda H. Dipyridamole potentiates the anti-aggregating effect of endothelium-derived relaxing factor. *Thromb Res Suppl* 1990;12:87-90.
111. Dresse A, Chevolet C, Delapierre D, Masset H, Weisenberger H, Bozler G, Heinzl G. Pharmacokinetics of oral dipyridamole (Persantine) and its effect on platelet adenosine uptake in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1982;23(3):229-34.
112. Geiger J, Honig-Liedl P, Schanzenbacher P, Walter U. Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors. *Eur J Pharmacol* 1998;351(2):235-46.
113. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(8):2007-11.
114. Thebault JJ, Blatrix CE, Blanchard JF, Panak EA. Effects of ticlopidine, a new platelet aggregation inhibitor in man. *Clin Pharmacol Ther* 1975;18(4):485-90.
115. McTavish D, Faulds D, Goa KL. Ticlopidine. An updated review of its pharmacology and therapeutic use in platelet-dependent disorders. *Drugs* 1990;40(2):238-59.
116. Hass WK, Easton JD, Adams HP, Jr., Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S, Kamm B. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1989;321(8):501-7.
117. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J, Turpie AG. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet* 1989;1(8649):1215-20.
118. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997;54(5):745-50; discussion 751.

119. Savi P, Herbert JM, Pflieger AM, Dol F, Delebasse D, Combalbert J, Defreyn G, Maffrand JP. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem Pharmacol* 1992;44(3):527-32.
120. Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y, Herbert JM. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994;72(2):313-7.
121. Schror K. Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 1995;50(1):7-28.
122. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348(9038):1329-39.
123. Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Matsumoto M, Matsumoto S, Ohishi T, Soga T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol* 2001;60(3):432-9.
124. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ, Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem* 2001;276(11):8608-15.
125. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999;82(3):1145-52.
126. Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of serotonin. *Methods Enzymol* 1989;169:205-10.
127. Ledergerber D, Hartmann RW. Development of a screening assay for the in vitro evaluation of thromboxane A2 synthase inhibitors. *J Enzyme Inhib* 1995;9(4):253-61.
128. Morris AJ, Frohman MA, Engebrecht J. Measurement of phospholipase D activity. *Anal Biochem* 1997;252(1):1-9.
129. Authi KS, Evenden BJ, Crawford N. Metabolic and functional consequences of introducing inositol 1,4,5- trisphosphate into saponin-permeabilized human platelets. *Biochem J* 1986;233(3):707-18.
130. Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B, Walter U. Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para- chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* 1992;43(12):2591-600.
131. Dickinson NT, Jang EK, Haslam RJ. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. *Biochem J* 1997;323(Pt 2):371-7.

132. Banga HS, Simons ER, Brass LF, Rittenhouse SE. Activation of phospholipases A and C in human platelets exposed to epinephrine: role of glycoproteins IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(23):9197-201.
133. Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W. Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. *Hypertension* 1998;31(2):603-7.
134. Selheim F, Froyset AK, Strand I, Vassbotn FS, Holmsen H. Adrenaline potentiates PI 3-kinase in platelets stimulated with thrombin and SFRLN: role of secreted ADP. *FEBS Lett* 2000;485(1):62-6.
135. Habib A, FitzGerald GA, Maclouf J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 1999;274(5):2645-51.
136. Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A. Estrogen stimulates arachidonoyl ethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* 2002;100(12):4040-8.
137. Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Carey SS, Shayman JA, Boxer LA. Regulation of polymorphonuclear leukocyte degranulation and oxidant production by ceramide through inhibition of phospholipase D. *Blood* 2002;99(4):1434-41.
138. Haslam RJ, Coorssen JR. Evidence that activation of phospholipase D can mediate secretion from permeabilized platelets. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:149-64.
139. Choi WS, Chahdi A, Kim YM, Fraundorfer PF, Beaven MA. Regulation of phospholipase D and secretion in mast cells by protein kinase A and other protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* 2002;968:198-212.
140. Cockcroft S. Phospholipase D: regulation by GTPases and protein kinase C and physiological relevance. *Prog Lipid Res* 1996;35(4):345-70.
141. Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(26):15300-5.
142. Martinson EA, Scheible S, Marx-Grunwitz A, Presek P. Secreted ADP plays a central role in thrombin-induced phospholipase D activation in human platelets. *Thromb Haemost* 1998;80(6):976-81.
143. Halenda SP, Wu H, Jones AW, Shukla SD. Phospholipase D in platelets and megakaryocytic cells. *Chem Phys Lipids* 1996;80(1-2):21-6.
144. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(10):2281-5.
145. Packham MA, Bryant NL, Guccione MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Effect of the concentration of Ca<sup>2+</sup> in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents. *Thromb Haemost* 1989;62(3):968-76.

146. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):E101-6.
147. Pfeifer A, Nurnberg B, Kamm S, Uhde M, Schultz G, Ruth P, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinase blocks pertussis toxin-sensitive hormone receptor signaling pathways in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995;270(16):9052-9.
148. Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S. Comparison of the pharmacodynamic effects of the platelet ADP receptor antagonists clopidogrel and AR-C69931MX in patients with ischaemic heart disease. *Platelets* 2002;13(7):407-13.
149. Baurand A, Eckly A, Bari N, Leon C, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* 2000;84(3):484-91.
150. Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999;5(9):1010-7.
151. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2000;275(39):30069-74.
152. Jang EK, Davidson MM, Crankshaw D, Haslam RJ. Synergistic inhibitory effects of atriopeptin II and isoproterenol on contraction of rat aortic smooth muscle: roles of cGMP and cAMP. *Eur J Pharmacol* 1993;250(3):477-81.
153. Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* 2003.
154. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* 2000;87(11):999-1005.
155. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002;90(4):E58-65.
156. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on

- activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001;103(17):2188-94.
157. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmuller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Munzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002;105(10):1170-5.

## 8. ABKÜRZUNGEN UND MASSEINHEITEN

### 8.1 Abkürzungen

8CPT oder 8pCPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio)guanosin-3',5'-cyclomonophosphat
A3P5P	Adenosin-3', 5' bisphosphat
AC	Adenylyl Cyclase
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
Adr (Epi)	Adrenalin (Epinephrin)
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cAMP	Adenosin 3',5'-cyclomonophosphat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Guanosin 3',5'-cyclomonophosphat
CHO <i>cells</i>	<i>chinese hamster ovary cells</i>
DAG	Diacylglycerol
DELFLIA	<i>Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay</i>
ddA	2',5'-Dideoxyadenosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin Tetraacetic Acid, Disodium Salt</i> (di-Natrium-ethylendiamintetraacetat)
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EHNA	9- <i>erythro</i> -(2-Hydroxy-3-n-nonyl)adenin
Epi (Adr)	Epinephrin (Adrenalin)
ESPS-2	<i>European Stroke Prevention Study 2</i>
GC	Guanylyl Cyclase
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
GP	Glykoprotein
G <sub>s</sub>	stimulatorisches G-Protein
GTP	Guanosin 3',5'-bisphosphat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OPT	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
p.o.	per oral
PAR	<i>protease activated receptor</i> (Protease-aktivierter Rezeptor)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer)
PDE	Phosphodiesterase
PG-E <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PG-I <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> ; Prostacyclin
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PPP	<i>platelet poor plasma</i> (Plättchenarmes Plasma)
PRP	<i>platelet-rich plasma</i> (Plättchenreiches Plasma)
RPE	R-Phycoerythrin
SDS	<i>Sodium-dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser157	Serin an Position 157
Ser239	Serin an Position 239
SNP	<i>Sodium nitroprusside</i> (Natrium Nitroprussid)
TCA	<i>Tri-chloro-acetic acid</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
U46619	<i>(15S)-Hydroxy-9,11-epoxymethanopropa-5Z,13E-dienoic acid</i>
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
vWF	von Willebrand Faktor
WP	<i>washed platelets</i> (gewaschene Plättchen)



## 8.2 Maßeinheiten

A	Ampère
Bq	Becquerel
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = $37 \times 10^9$ Bq)
cpm	<i>counts per minute</i> (Anzahl pro Minute)
Da	<i>dalton</i> (g/mol)
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
G	Gramm
h	<i>hour</i> (Stunde)
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/Liter)
min	Minute
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
Std	Stunde
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit, Umsatz von $1 \mu\text{mol}$ Substrat / min)
V	Volt
N	nano ( $10^{-9}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
M	milli ( $10^{-3}$ )
K	kilo ( $10^3$ )

### 8.3 Stimulationsreagenzien und Inhibitoren

8pCPT-cGMP	selektiver Aktivator der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK)
Apyrase	lösliche Ectonukleotidase, die ADP enzymatisch abbaut
ARC-69931MX	selektiver Inhibitor des ADP Rezeptors P2Y <sub>12</sub>
ddA	Inhibitor der Adenylyl Cyclase (AC)
Iloprost; PG-E <sub>1</sub>	stimulieren beide die Bildung von cAMP und die Phosphorylierung von VASP
PA	Phosphatidsäure; Produkt der Phospholipase D
PMA	Aktivator der Proteinkinase c (PKC)
PtCh	Phosphatidylcholin; Substrat der Phospholipase D
Ro-318220	Inhibitor der Proteinkinase C (PKC)
SNP	stimuliert die Bildung von cGMP und die Phosphorylierung von VASP
SQ-22,536	Inhibitor der Adenylyl Cyclase (AC)
U46619	stabiles TxA <sub>2</sub> -Analogon; stimuliert den Thromboxanrezeptor TPα
Yohimbin	selektiver Inhibitor des adrenergen α <sub>2A</sub> Rezeptors

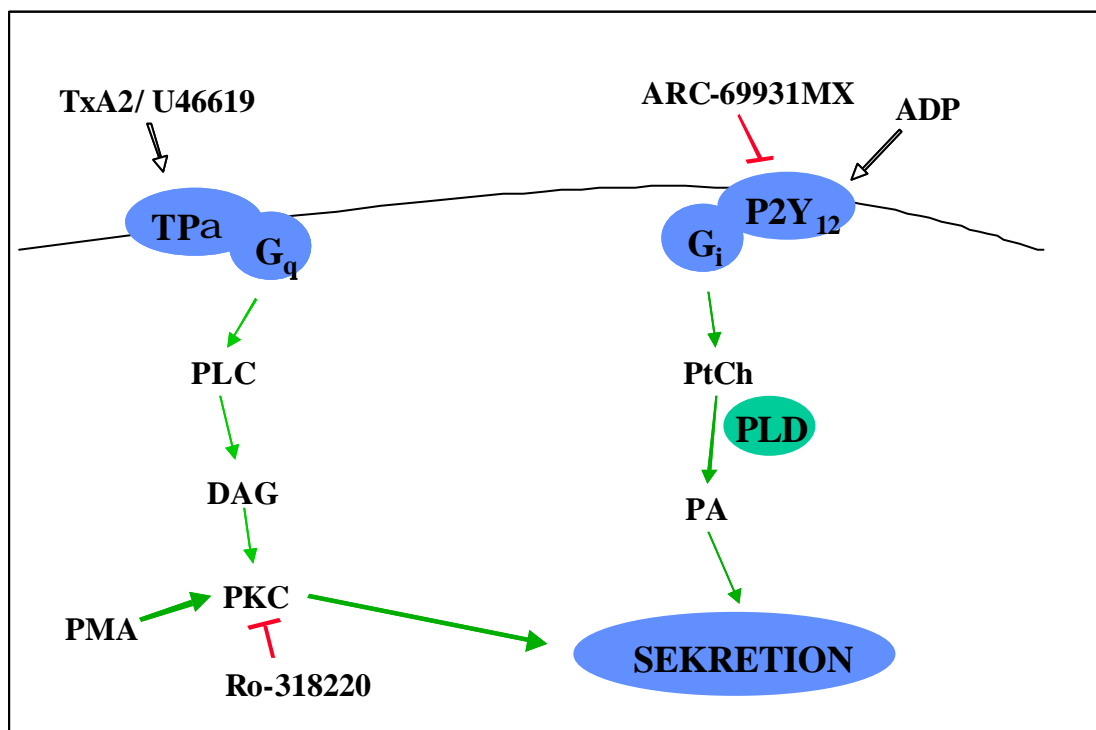


Abbildung 26: Die Wirkungen von Stimulationsreagenzien und Inhibitoren, die in Kapitel 5.2 verwendet wurden, in der neu definierten Signaltransduktion von Thrombozyten während der Sekretion (siehe Kapitel 6.2).

## Publikationen

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Walter U., Geiger J. Inhibition of platelet P2Y<sub>12</sub> and  $\alpha$ <sub>2A</sub> receptor signaling by cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 433-439

Aktas B., Utz A., Hoenig-Liedl P., Geiger J., Walter U. Dipyridamol enhances NO/cGMP mediated VASP phosphorylation and signalling in human platelets: in-vitro and in-vivo studies. *Stroke* 2003; 34(3): 764-769

Aktas B., Sapper M., Walter U., Geiger J. Thromboxane-stimulated platelet secretion and P-Selectin expression requires cAMP-independent signaling of the P2Y<sub>12</sub> receptor. *manuscript in preparation*

Aktas B., Geiger J., Walter U. Mechanism of dipyridamol action: in-vitro and in-vivo studies with healthy volunteers. (2001) *Clinical Study Report for Boehringer Ingelheim Trial 9.142*

Schulte V., Rabie T., Prostedna M., Aktas B., Grüner S., Nieswandt B. Targeting of the collagen-binding site on glycoprotein VI is not essential for in-vivo depletion of the receptor. *Blood* 2003, May 15;101(10):3948-52

Voit S., Udelhoven M., Lill G., Aktas B., Nieswandt B., Schrör K. and Weber A.A. The C-terminal peptide of thrombospondin-1 stimulates distinct signaling pathways but induces an activation-independent agglutination of platelets and other cells. *FEBS Lett.* 2003 Jun 5;544(1-3):240-5

## Posterbeiträge

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Walter U., Geiger J. Regulation of platelet P2Y<sub>12</sub> and epinephrin receptor mediated responses by cGMP-dependent protein kinase. 1<sup>st</sup> European Meeting on Vascular Biology and Medicine, D-Nuernberg, september 29<sup>th</sup>-October 1<sup>st</sup>, 1999

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Walter U., Geiger J. The adenylyl cyclase coupled platelet P2Y and alpha-2A receptor are regulated by cGMP-dependent protein kinase. 12<sup>th</sup> Protein Kinase Symposium, D-Bad Brueckenau, august 31<sup>st</sup> to september 3<sup>rd</sup>, 2000

Aktas B., Sapper M., Walter U., Geiger J. Thromboxane-induced serotonin secretion is potentiated via Gi-coupled receptors in human platelets. XV<sup>th</sup> European Symposium on Blood Platelets, F-Strasbourg, october 19<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2000

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Utz A., Walter U., Geiger J. Mechanism of dipyridamol action: in-vitro and in-vivo studies. XVII Congress ISTH, F-Paris, july 6<sup>th</sup> –12<sup>th</sup>, 2001

Aktas B., Sapper M., Walter U., Geiger J. Thromboxane-induced serotonin secretion is potentiated via Gi-coupled receptors in human platelets. XVII Congress ISTH, F-Paris, july 6<sup>th</sup> –12<sup>th</sup>, 2001

### **Kurzreferate und Vorträge**

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Walter U., Geiger J. Regulation of platelet P2YAC and epinephrin receptor mediated responses by cGMP-dependent protein kinase. Deutsche Gesellschaft für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, D-Mainz, march 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2000

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Geiger J., Walter U. Dipyridamole effects at physiological plasma concentrations on platelets in-vitro and in-vivo. Symposium der Medizinischen Klinik Wuerzburg, D-Bad Brueckenau, february 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>, 2001

Aktas B., Hoenig-Liedl P., Geiger J., Walter U. Dipyridamole effects at physiological plasma concentrations on platelets in-vitro and in-vivo. Deutsche Gesellschaft für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, D-Mainz, march 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2001

Aktas B., Sapper M., Walter U., Geiger J. Thromboxane-stimulated platelet secretion and P-Selectin expression requires cAMP-independent signaling of the P2Y12 receptor. XVIth Platelet Meeting, NL-Maastricht-Rolduc, october 11<sup>th</sup>-13<sup>th</sup>, 2001

Aktas B. Dipyridamole effects at physiological plasma concentrations on platelets in-vitro and in-vivo. Boehringer Ingelheim, D-Ingelheim a. Rh., june 7<sup>th</sup>, 2001

Aktas B. Phospholipase D-a novel effector for P2Y12 signalling: Essential role of Gi-coupled receptors in human platelet secretion. sanofi-synthelabo, F-Toulouse, april 30<sup>th</sup>, 2001.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Walter. Ihm möchte ich danken für die Bereitstellung und seine vorbildliche Unterstützung der Arbeit, die weit über ein notwendiges Maß hinaus ging.

Frau Prof. Dr. Petra Högger danke ich für die kritische Durchsicht meines Dissertationsentwurfes und für die zahlreichen wertvollen Anmerkungen. Auch danke ich ihr für die Übernahme des Koreferates.

Ich danke besonders Herrn Dr. Jörg Geiger für seine hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die je nach Notwendigkeit mal Begleitung, mal Führung oder mal kritisches Abwarten bedeutete.

Frau Petra Hönig-Liedl danke ich für ihre Herzlichkeit mit der sie mir ein grundlegendes Verständnis für das Arbeiten im Labor auf eine einmalige Art und Weise vermittelte.

Für eine ausgesprochen angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Biochemie und Pathobiochemie bedanken, im besonderen bei Maisa Garcia-Arguinzonis und Jochen Brich, Catherine Bruel, Annette Galler, Elke Butt-Dörje, Lilo Fischer, Elfi Walter, Mick Burkhardt und Gunnar-Ingj Kristjansson.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisert von der Boehringer Ingelheim GmbH danke ich für seine konstruktive und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Dipyridamoluntersuchungen und bei der Erstellung des veröffentlichten Manuskripts.

Herrn Dr. Bob Humphries von der AstraZeneca GmbH möchte ich für die Bereitstellung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptorantagonisten ARC-69931MX danken. Ohne diesen Antagonisten wären die Untersuchungen zur Sekretion nicht möglich gewesen.

**Lebenslauf**

Name	Barsom Aktas
Geburtsdatum	4. Dezember 1972
Geburtsort	Ochsenfurt
Familienstand	ledig
Beruf	Apotheker
Ausbildung	
1979-1983	Grundschule Ochsenfurt
1983-1992	Gymnasium Marktbreit
1993-1997	Studium der Pharmazie, Universität Würzburg
1998	Approbation als Apotheker
1999-2002	Doktorarbeit am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg
seit 2002	wissenschaftlicher Angestellter am Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg