

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Thrombin-vermittelte Regulation von P2Y₁₂-ADP-
Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen des
Menschen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Helene Drießen

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Rauch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rassaf

Für meine Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rauch, B.H., et al., *Regulation of functionally active P2Y12 ADP receptors by thrombin in human smooth muscle cells and the presence of P2Y12 in carotid artery lesions*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2434-42.

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar [1]. In den Industrieländern steht dabei die Koronare Herzkrankheit, also die Arteriosklerose der Herzkranzarterien, an erster Stelle [2]. Plättchen spielen bei der Entstehung, wie auch bei den Komplikationen der Arteriosklerose eine wichtige Rolle [3]. Entsteht ein Schaden in der Gefäßwand, wie zum Beispiel nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, wird das Endothel und dessen Thrombozyten hemmende Funktion geschädigt. Weiterhin wird unter dem Endothel liegendes aggregationsförderndes Gewebe frei, welches zu einer Aktivierung der Blutgerinnung führt, welche die Produktion von Thrombin verursacht. Schon kleine Mengen Thrombin bewirken an Blutplättchen ein Ausschütten von ADP. ADP verstärkt die durch Thrombin und Kollagen hervorgerufene Plättchenaktivierung. Die erleichterte Aktivierbarkeit der Thrombozyten und die im atherosklerotischen Gefäß veränderten Strömungseigenschaften des Blutes, können eine Thrombose oder Embolie verursachen. Die Folge sind Schlaganfall oder Herzinfarkt [4]. Antiplättchen Substanzen haben sich in der Prävention dieser Ereignisse etabliert [3]. Neben Aspirin existieren mit der Gruppe der P2Y₁₂-ADP-Rezeptor-Antagonisten (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) hochpotente Medikamente, deren Wirksamkeit in zahlreichen Studien nachgewiesen ist [5]. Die Gabe dieser sogenannten „Thienopyridine“ zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse ist weit verbreitet. Sie wirken am ADP Rezeptor P2Y₁₂, der hauptsächlich in Gehirn und auf Blutplättchen bekannt ist. Es existiert bisher eine Arbeit, die die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auf humanen glatten Muskelzellen (hSMC) beschreibt und ihm außerdem vasokonstriktische Eigenschaften zuweist [6]. Welche Funktionen der P2Y₁₂-Rezeptor auf hSMC hat, durch welche äußeren Reize er beeinflusst wird und über welche Signalübertragungswege er Signale vermittelt ist größtenteils noch unklar. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen wurden hSMC auf die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors hin untersucht. Western Blots zeigten in Lysaten von venösen hSMC mehrere Banden, ähnlich zu denen in Plättchenlysaten, die als Positivkontrolle verwendet wurden. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin führte zu einer Steigerung der Expression des Rezeptors. Die Untersuchung der Transkriptionsebene und der Zelloberflächenexpression des Rezeptors mittels PCR und Durchflusszytometrie, sowie Versuche mit arteriellen hSMC brachten dazu passende Ergebnisse. In immunhistochemischen Färbungen von Schnitten durch humane Karotisplaques wurde eine deutliche Anreicherung des P2Y₁₂-Rezeptors in atherosklerotischem Gewebe und seine Co-Lokalisation mit M-Aktin und TF festgestellt. Da ADP via P2Y₁₂ in Blutplättchen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von ERK1/2 und der Hemmung der VASP-Phosphorylierung spielt, wurden diese Signalkaskaden auch in hSMC untersucht. Western Blot und Durchflusszytometrie lieferten jedoch keine verwertbaren Ergebnisse. Die Untersuchung der DNA-Synthese und Proliferation von hSCM zeigte, dass die thrombin-induzierte Steigerung der P2Y₁₂-Rezeptor-Expression auf der Zelloberfläche die DNA-Synthese von hSMC fördert und in einer erhöhten Zellzahl resultiert. Mittels Real-time PCR konnte gezeigt werden, dass in hSMC die P2Y₁₂-mRNA-Expressionssteigerung überwiegend durch den Thrombin Rezeptor PAR-1 vermittelt ist. Unter Bedingungen erhöhter Thrombinkonzentrationen im Blut, wie dies an Orten von atherosklerotischen Plaques und Thrombose der Fall ist, kommt es also in hSMC via PAR-1 zu einer Hochregulation von P2Y₁₂-Rezeptoren. ADP bewirkt über P2Y₁₂-Rezeptoren die Stimulation von Mitogenese und Proliferation von hSMC, was zur Progression der Erkrankung beitragen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ACS	<i>Acute coronary syndrome</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
APC	Aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COX ₂	Cyclooxygenase-2
DAG	Diazylglyzerin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extrazellulär-signalregulierte Kinase
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

hSMC	<i>human vascular smooth muscle cells</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
Ip	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositol-3-Phosphat
JNK	c-jun-Amino-Terminus-Kinase
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KON	Kontrolle
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
MeSADP	<i>Methylthioadenosine diphosphate</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> = Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i> = glatte Gefäßmuskelzellen
Tab.	Tabelle
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin (Fluoreszenzfarbstoff)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween™-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TXA2	Thromboxan A2
U	<i>Unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzkrankheit (KHK)	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Ätiologie	2
1.1.4	Pathogenese.....	2
1.1.5	Therapie der KHK – Thrombozytenaggregationshemmer	7
1.1.6	Prognose.....	7
1.2	Thrombozyten	8
1.3	ADP.....	10
1.4	Thrombin.....	11
1.5	Familie der P2 Rezeptoren	13
1.5.1	Der P2Y ₁₂ Rezeptor.....	14
1.5.2	Die Rolle des P2Y ₁₂ Rezeptors in der Blutgerinnung.....	15
1.6	Thienopyridine	16
1.7	Humane glatte Muskelzellen.....	17
1.8	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Substanzen	19
2.2	Puffer und Lösungen	21
2.3	Antikörper	23
2.4	Geräte und Material.....	25
2.5	Zellkultur	27
2.6	Herstellung von Thrombozytenlysaten	29
2.7	Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen	30
2.8	Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR).....	31
2.9	Real-Time PCR	32

2.10	Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)	33
2.10.1	Proteinextraktion aus humanen glatten Muskelzellen	33
2.10.2	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	33
2.10.3	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	33
2.10.4	Immunodetektion (Western Blot).....	34
2.10.5	<i>Strippen</i> von PVDF-Membranen.....	34
2.10.6	Densitometrische Auswertung.....	35
2.11	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
2.12	cAMP Assay	38
2.13	Anfärben von Gewebsschnitten (Immunhistochemie)	39
2.14	Bestimmung der Proliferationsrate von humanen SMC	40
2.15	Bestimmung der DNA-Syntheserate von humanen SMC.....	41
2.16	Statistik.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	P2Y ₁₂ -Expression in humanen glatten Muskelzellen der Vena Saphena.....	43
3.1.1	Thrombin induziert die Expression der P2Y ₁₂ -mRNA in humanen glatten Muskelzellen .	43
3.1.2	Thrombin induziert die P2Y ₁₂ -Protein-Expression in humanen glatten Muskelzellen	45
3.1.3	Thrombin induziert die P2Y ₁₂ -Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche von humanen glatten Muskelzellen.....	49
3.1.4	Die Induktion von P2Y ₁₂ -Expression wird über PAR vermittelt.....	51
3.2	P2Y ₁₂ -Expression in arteriellen glatten Muskelzellen humaner Aorta	53
3.2.1	Thrombin induziert die P2Y ₁₂ -Protein Expression in arteriellen humanen glatten Muskelzellen der Aorta	53
3.3	Thrombin induzierter P2Y ₁₂ -Rezeptor moduliert cAMP-Spiegel in humanen glatten Muskelzellen.....	54
3.4	Thrombin induzierter P2Y ₁₂ -Rezeptor fördert die DNA-Synthese und Proliferation von humanen glatten Muskelzellen	56
3.5	P2Y ₁₂ -Expression in humanen Karotisplaques	58
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	62

4	Diskussion	63
5	Schlussfolgerungen	73
	Literaturverzeichnis.....	74
6	Danksagung.....	1
7	Eidesstattliche Versicherung.....	2

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

1.1.1 Definition

Bei der Koronaren Herzkrankheit (KHK) handelt es sich um die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien [7]. Die Arteriosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess, der durch die Akkumulation von Lipiden, Makrophagen, Lymphozyten und glatten Muskelzellen in der Intima großer Arterien charakterisiert ist [8]. Die daraus folgende Verdickung der Gefäßwand (Plaque) bleibt oft asymptomatisch (sub-klinische Erkrankung, asymptomatische KHK, stumme Ischämie). Erreichen die atherosklerotischen Plaques im fortgeschrittenen Stadium jedoch eine ausreichende Größe, können sie das Gefäßlumen einengen und durch eine Minderversorgung des Gewebes distal der Koronarstenose Symptome verursachen (symptomatische KHK, stabile Angina Pectoris) [7]. Die wichtigste klinische Komplikation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien ist jedoch nicht die langsam progrediente Einengung des Gefäßlumens, sondern der akute Gefäßverschluss aufgrund der Entstehung eines Thrombus auf einem rupturierten oder erodierten Plaque [7, 9]. Ein solcher thrombotischer Gefäßverschluss ist mit lebensbedrohlichen ischämischen Ereignissen assoziiert, wie das akute Koronarsyndrom, zu dem die instabile Angina Pectoris, der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod gehören [10-12]. Der akute Myokardinfarkt oder der plötzliche Herztod sind oft die ersten klinischen Manifestationen der KHK [13].

1.1.2 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. In den Industrieländern steht dabei die KHK (Koronare Herzkrankheit), also die Arteriosklerose der Herzkranzarterien, an erster Stelle [14]. Statistiken der WHO haben jedoch auch gezeigt, dass die Atherothrombose nicht mehr nur ein Problem der industrialisierten Welt ist [15] und die Prävalenz dieser Erkrankungen besonders in sich entwickelnden Nationen steigt [16-18].

1.1.3 Ätiologie

Nach der „*response to injury*“ Hypothese, ist die Arteriosklerose eine Reaktion auf eine Verletzung des Endothels, die durch Lipoproteine oder andere Risikofaktoren ausgelöst wurde. Epidemiologische Studien haben eine Reihe von Umweltfaktoren und genetischen Risikofaktoren identifiziert, die mit dieser Erkrankung assoziiert werden. Man unterscheidet Hauptrisikofaktoren von anderen Risikofaktoren. Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Arteriosklerose gehören neben hohen Plasmakonzentrationen von LDL- und VLDL-Cholesterin und erniedrigten Plasmakonzentrationen von HDL-Cholesterin auch die arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Nikotinabusus, eine positive Familienanamnese und steigendes Lebensalter. Des Weiteren zählen eine atherogene Diät, Adipositas, körperliche Inaktivität, Lipidstoffwechselstörungen, Glukosetoleranzstörungen, Entzündungszustände, Thromboseneigung, erhöhte Homozysteinkonzentrationen im Plasma und Hyperfibrinogenämie zu den Risikofaktoren der KHK [8, 9].

1.1.4 Pathogenese

Die normale Arterienwand ist in drei Schichten aufgebaut: Intima, Media und Adventitia [19, 20] (Abb.1). Die Intima ist die innerste dieser drei Wandschichten. Sie besteht aus einem einschichtigen Endothel und darunter liegender subendothelialer Matrix. Das Endothel bildet die innere Auskleidung des Gefäßes und steht in direktem Kontakt mit dem Blut. Es ist auf einer Basalmembran verankert. Die *Lamina elastica interna* stellt die Grenze zur *Tunica Media* dar. Im gesunden Gefäß ist die Intima eine sehr dünne Schicht und enthält nur vereinzelt glatte Muskelzellen. Die mittlere Schicht der Gefäßwand ist die *Tunica media*. Sie besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen umgeben von einer elastin- und kollagenreichen Matrix. Die Adventitia bildet die äußerste Schicht und Besteht aus Bindegewebe und Fibroblasten. Sie ist durch die *Lamina elastica externa* von der Media abgegrenzt. Fibroblasten lassen sich im gesunden Gefäß nur in der Adventitia finden [9, 19-21]. Die Intima ist die Schicht der Arterienwand die hauptsächlich von atherosklerotischen Läsionen (Atheromen) betroffen ist [19, 22].

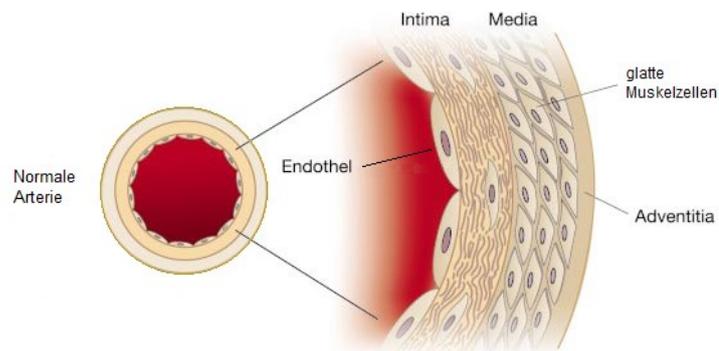


Abbildung 1 Aufbau einer gesunden Arterie (modifiziert nach Libby 2002)

Die normale menschliche Koronararterie hat einen typischen dreischichtigen Aufbau. Die schmale Intima aus Endothel und subendothelialer Matrix bildet die innerste Schicht, gefolgt von der Media aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen in einer elastin- und kollagenreichen Matrix und der Adventitia (modifiziert nach [21]).

Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung die sich vornehmlich in der Intima großer und mittelgroßer Arterien abspielt [2]. Sie beginnt schon in der frühen Kindheit und schreitet im Erwachsenenalter asymptomatisch voran [9]. Das Tempo der Progression variiert erheblich, aber normalerweise dauert es Jahrzehnte bis eine fortgeschrittene atherosklerotische Läsion entstanden ist, die eine klinisch manifeste Erkrankung verursacht [17]. Während ihrer Progression durchläuft sie verschiedene Stadien, denen charakteristische Läsionen zugeordnet werden können [2]. Drei klassische Läsionen können voneinander unterschieden werden: Fettstreifen (*fatty streaks*), fibröse Plaques und die komplizierte oder auch fortgeschrittene Läsion [13]. Am Anfang steht meist eine Verletzung oder Dysfunktion des Endothels („*response-to-injury*“ Hypothese) [2, 18], welches mit seinen interzellulären *Tight Junctions* normalerweise wie eine selektiv permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe funktioniert [3]. Leukozyten haften nur selten an gesundem Endothel [14]. Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer gesteigerten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile, erhöht seine Haftfähigkeit für Leukozyten und Thrombozyten über die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und führt zum Verlust seiner antikoagulatorischen Eigenschaften [2, 18] (Abb.2). Das Endothel bildet in diesem Kontext außerdem Chemokine, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren [18].

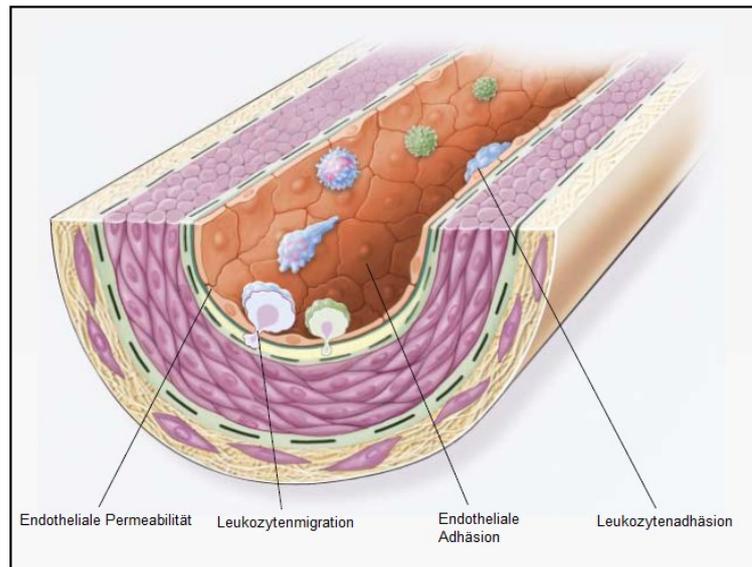


Abbildung 2 Endotheliale Dysfunktion (modifiziert nach Ross 1999)

Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile. Es kommt zur Hochregulation von Leukozytenadhäsionsmolekülen (L-Selektin) und endothelialen Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin). Die Migration von Leukozyten in die Arterienwand wird durch oxidiertes LDL, Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren angeregt (modifiziert nach [2]).

Durch diese Veränderungen kommt es zur Akkumulation von Lipiden in der subendothelialen Matrix [3, 13], zu Plättchenadhäsion, Rekrutierung von Leukozyten und T-Lymphozyten in die Gefäßwand, zur Stimulation der Migration von SMC in die Intima und deren Proliferation [3, 18]. Das in der Intima angereicherte LDL wird durch Oxidation oder enzymatische Spaltung modifiziert und aktiviert die darüber liegenden Endothelzellen, welche daraufhin vasoaktive Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren [2, 3, 16]. Die in die Intima eingewanderten Monozyten proliferieren und differenzieren zu Makrophagen. Diese phagozytieren das oxidierte LDL und werden zu „Schaumzellen“ [3]. Es entstehen die so genannten Fettstreifen („*fatty streaks*“) [13] (Abb.3). Die Makrophagen werden durch das aufgenommene LDL aktiviert und setzen ebenfalls Zytokine, Chemokine, hydrolytische Enzyme und Wachstumsfaktoren frei [2, 16]. Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmoleküle führen zur Leukozytenmigration über das Endothel welches zusammen mit SMC und Monozyten chemotaktische Moleküle bildet, die Monozyten und T-Zellen in die Gefäßwand locken [2]. Mit der Zeit sterben die Schaumzellen ab und die frei werdenden Lipide tragen zur Entstehung eines nekrotischen Zentrums bei [3] (Abb. 4).

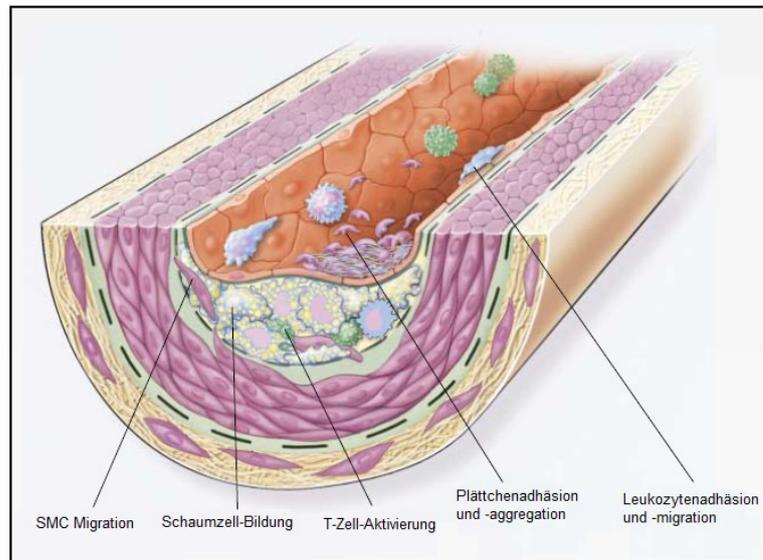


Abbildung 3 *Fatty Streak* (modifiziert nach Ross 1999)

„Fettstreifen“ bestehen aus Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und glatten Muskelzellen, deren Migration in die Arterienwand durch Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF angeregt wurde. Eingewanderte T-Zellen werden durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert, und die Aufnahme von oxidierten LDL durch Makrophagen führt zur Entstehung von Schaumzellen. Leukozyten haften am Endothel und werden durch chemotaktische Moleküle aus Endothel, SMC, Monozyten und T-Zellen in die Läsion rekrutiert. Plättchenadhäsion und -aggregation wird durch Moleküle wie P-Selektin, Fibrin, Tissue Faktor und TXA2 stimuliert (modifiziert nach [2]).

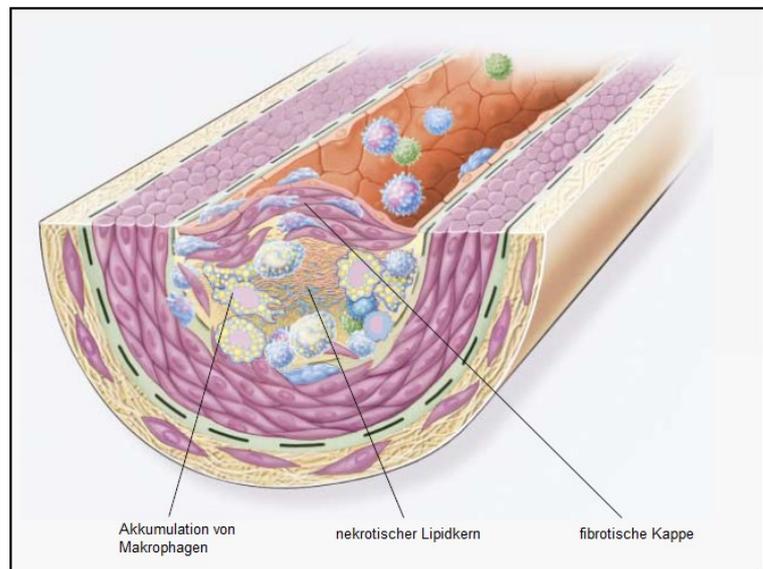


Abbildung 4 Komplizierte Läsion (modifiziert nach Ross 1999)

Entstehung eines nekrotischen Zentrums durch Nekrose, Apoptose, Proteolyse und Akkumulation von Lipiden. Bildung einer fibrösen Kappe, welche das nekrotische Zentrum vom Lumen abschirmt. Die Läsionen dehnen sich durch anhaltende Leukozytenmigration und Makrophagenakkumulation aus (modifiziert nach [2]).

Die von Plättchen Endothel und Makrophagen freigesetzten Wachstumsfaktoren regen SMC an, durch Lücken in der Lamina elastica interna [13] in die Intima einzuwandern, zu Proliferieren und extrazelluläre Matrix zu sezernieren [3, 5, 6]. Es kommt zu einer fokalen Verdickung der Intima mit wachsenden Mengen von extrazellulären Lipiden, und der Entstehung der typischen fibrotischen Kappe aus SMC und extrazellulärer Matrix [3, 13], was zu der Bildung eines fibrösen Plaques (Fibroatherom) führt [3, 9]. Durch Migration weiterer mononukleärer Zellen aus dem Blut in die Gefäßwand begleitet von Zellproliferation, Produktion extrazellulärer Matrix und der Akkumulation von Lipiden, wachsen die Läsionen [2, 3] (Abb.4). Hinzu kommen Kalzifizierung und Neovaskularisation. Durch Blutungen aus den fragilen neu gebildeten Mikrogefäßen und Freisetzung von Cholesterin aus den Erythrozytenmembranen wächst das nekrotische Zentrum [19]. Nach ihrer Aktivierung sezernieren Makrophagen Metalloproteinasen und andere proteolytische Enzyme, welche zu einer Ausdünnung der fibrotischen Kappe führen. An solchen Stellen kann es zum Einreißen der fibrotischen Kappe oder zur Ulzeration des fibrotischen Plaques kommen [2]. Dadurch wird hoch thrombogenes Material in den Blutstrom freigesetzt und es entsteht eine Thrombose, die verheerende Folgen haben kann [12, 19] (Abb.5).

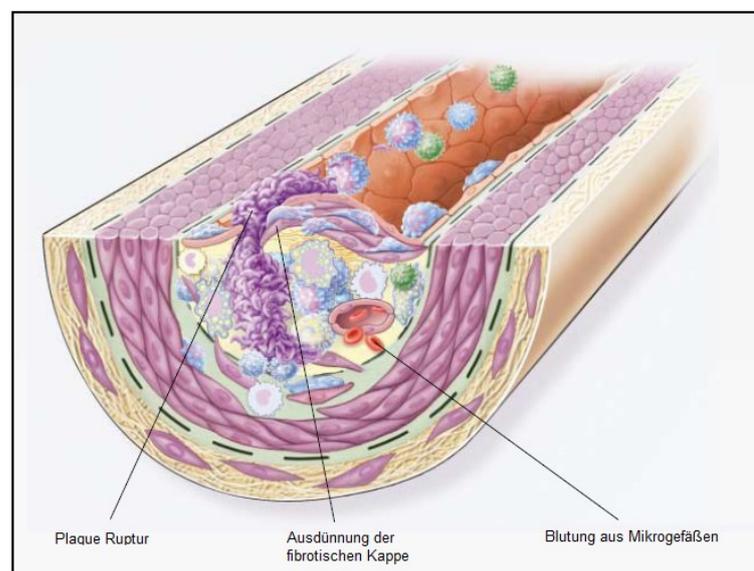


Abbildung 5 Instabiler fibrotischer Plaque (modifiziert nach Ross 1999)

Eingewanderte und aktivierte Makrophagen sezernieren Metalloproteinasen und andere proteolytische Enzyme, welche die fibrotische Kappe ausdünnen und Matrix abbauen und Mikrogefäße arrodieren. Dies führt zu Blutungen aus den Vasa Vasorum und zu Ulzeration des Plaques oder Ruptur der fibrotischen Kappe was Thrombusbildung und Gefäßverschluss zur Folge haben kann (modifiziert nach [2]).

1.1.5 Therapie der KHK – Thrombozytenaggregationshemmer

Neben der kausalen Therapie, also dem Ausschalten von Risikofaktoren und der optimalen Einstellung von Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, wird die KHK hauptsächlich symptomatisch behandelt. Hierbei handelt es sich entweder um eine interventionelle oder operative Revaskularisation oder um eine primär medikamentöse Therapie. Eine zentrale Rolle spielen dabei Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation reduziert die Wahrscheinlichkeit eines thromboembolischen Ereignisses und somit die Gefahr an einem akuten Koronarsyndrom zu erkranken oder an einem Herzinfarkt zu versterben [20].

1.1.6 Prognose

Zu den Manifestationsformen der symptomatischen KHK gehören Angina Pectoris, Herzinfarkt, die ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod. Schon einen Tag nach einem Herzinfarkt versterben ca. 40% der Patienten. Die häufigste Todesursache ist hierbei das Kammerflimmern. In den darauf folgenden 2 Jahren versterben weitere 5-10 % aller Infarktpatienten an einem plötzlichen Herztod. Durch systemische Thrombolyse kann die Sterblichkeit im Krankenhaus von 15% auf 10% gesenkt werden, durch Primär-PCI sogar auf 5% [27]. ASS, Thienopyridine, Betablocker und ACE-Hemmer senken die Frühletalität des Herzinfarktes. Durch die Gabe von Clopidogrel oder Prasugrel zusätzlich zur ASS- Therapie konnten kardiovaskuläre Ereignisse und Tod um 20% gesenkt werden [28] ([29] CURE-Studie, [30] Triton-TIMI 38). Durch Langzeittherapie mit Thrombozytenaggregationshemmern lässt sich die Mortalität innerhalb des ersten Jahres nach Infarkt um ca. 15% senken. Das Infarktrisiko sinkt um ca. 30% [27]

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten entstehen durch Abschnürungen aus dem Zytosol von Megakaryozyten des Knochenmarks. Sie sind kernlos, enthalten aber zahlreiche Zellorganellen wie Mitochondrien, Granula und Lysosomen. Sie sind die kleinsten im Blut zirkulierenden Zellen mit einem äquatorialen Durchmesser von 2-3µm und haben eine Lebenszeit von circa 7-10 Tagen [24]. Ihre primäre Funktion ist die Sicherung der primären Hämostase [31, 32]. Durch das Erkennen einer Läsion, Rekrutierung weiterer Plättchen, ihre Vernetzung untereinander und die Aktivierung der Gerinnungskaskade machen Plättchen eine schnelle Blutstillung nach einer Gefäßverletzung und den Erhalt der Integrität des Gefäßsystems möglich [24]. Plättchen spielen aber auch bei thromboembolischen Komplikationen fortgeschrittener Arteriosklerose eine entscheidende Rolle. Durch ihre Aktivierung und Aggregation nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaque kommt es zu der Ausbreitung intrakoronarer Thrombi, die Myokardischämie und Myokardinfarkt zur Folge haben [24, 33]. Des Weiteren wird das Plättchen immer mehr als eine Quelle von Entzündungsmediatoren geschätzt [34]. Durch die Freisetzung dieser Mediatoren sind Plättchen maßgeblich an der Entstehung und der Progression der Arteriosklerose beteiligt [3, 31, 35]. Die elektronendichten Granula der Thrombozyten enthalten ADP, Serotonin und Kalzium [36]. Die zahlreichen α -Granula enthalten vWF, Fibrinogen, Tissue Faktor [37], Gerinnungsfaktoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. *platelet derived growth factor* PDGF [36]. Diese stimulieren die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und führen zur Hyperplasie der Intima [35]. Proinflammatorische Zytokine und Chemokine fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und die Extravasation von Monozyten [31]. Die Lysosomen der Plättchen enthalten saure Proteasen, saure Glykosidasen und saure Phosphatasen [24]. Über die Expression von P-Selektin auf der Plättchenoberfläche führt kommt es zur Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten und der Aktivierung des Komplementsystems, was die Entzündung weiter fördert. Dadurch tragen sie zu inflammatorischen und prokoagulatorischen Reaktionen und zur Exazerbation von Arteriosklerose bei [31]. Die Plättchenmembran besteht aus einer asymmetrischen Doppelschicht von Phospholipiden [24]. Nach der Aktivierung der Plättchen kommt es zu einer Translokation negativ geladenem Phosphatidylserins von der inneren Schicht der Plättchenmembran auf die Plättchenoberfläche [37-39]. Dadurch entsteht eine

prokoagulatorische Oberfläche, die Gerinnungsfaktoren bindet und für die Bildung des Tenase- und Prothrombinasekomplexes während der Gerinnungskaskade notwendig ist [39]. Glykoproteine in der Membran der Thrombozyten bilden Rezeptoren [24]. Der GP Ib-V-IX Komplex bildet mit seiner Ib-Untereinheit einen Rezeptor für den vWF und vermittelt das Initiale Haften der Plättchen an den Ort der Gefäßverletzung [10, 31, 32]. Durch ihre multiplen Kollagen-Rezeptoren wie das Glykoprotein Ia-IIa und die Bindung von vWF an aktiviertes GP IIb-IIIa wird die zunächst reversible Bindung zu einer festen Adhäsion [31]. Außerdem exprimieren Plättchen drei Nukleotidrezeptoren: P2X₁, P2Y₁ und P2Y₁₂, die an der Plättchenaggregation beteiligt sind. Der P2X₁-Rezeptor ist ein Kationenkanal, der durch ATP aktiviert wird. P2Y₁ und P2Y₁₂ sind zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch ADP aktiviert werden. Während der P2X₁- und der P2Y₁-Rezeptor zu Formveränderung der Plättchen und Initiation der Aggregation führen, ist der P2Y₁₂-Rezeptor für die Vervollständigung und Verstärkung der Plättchenaggregation zuständig [40] (Drei-Rezeptor-Modell [41, 42]).

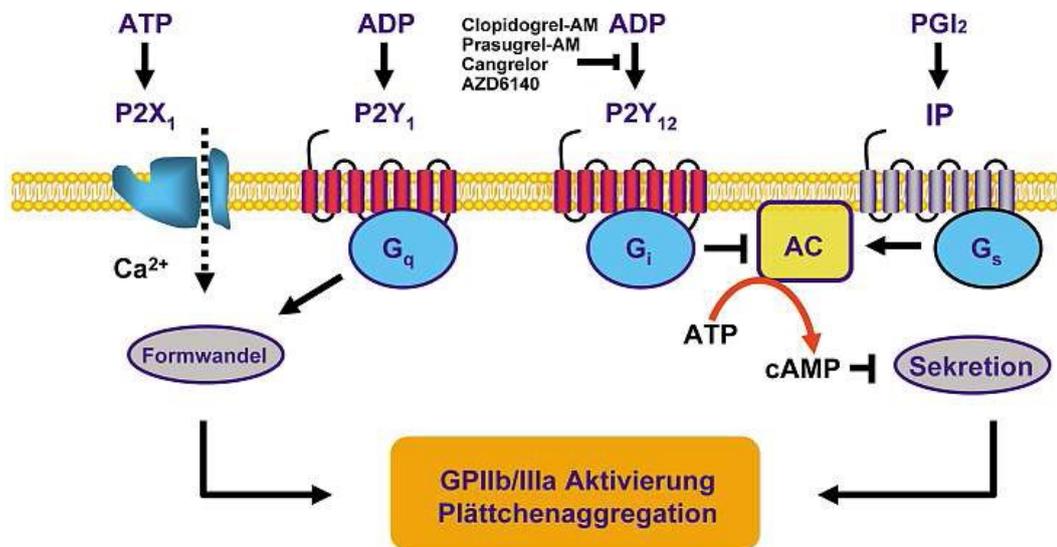


Abbildung 6 P2-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten (Schrör 2007)

Nach der Bindung von ATP an den P2X₁-Rezeptor kommt es zu Kalziumeinstrom und der Formveränderung der Plättchen. Der P2Y₁-Rezeptor ist an G_q gekoppelt und verantwortlich für die Mobilisierung intrazellulären Kalziums, Formveränderung der Plättchen und Initiierung der Plättchenaggregation. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist G_i-gekoppelt. Er vervollständigt und verstärkt die ADP induzierte Plättchensekretion und -aggregation [43].

1.3 ADP

Extrazelluläre Nukleotide können von verschiedensten Zellen freigesetzt werden, wie zum Beispiel von Nervenzellen, Plättchen und Endothelzellen [44]. Adeninnukleotide binden an P2-Rezeptoren, die in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden, z.B. auch in Endothel, Epithel, SMC, Blutzellen, Mastozyten und Neuronen. Sie regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse [45]. ADP ist in hohen Konzentrationen in den elektronendichten Plättchengranula gespeichert. Nach der Aktivierung der Plättchen durch Agonisten wie Kollagen oder Thrombin wird ADP ausgeschüttet und fördert die Plättchenaggregation indem es an zwei G-Proteingekoppelte ADP-Rezeptoren auf Plättchen bindet, P2Y₁ und P2Y₁₂ [6, 43, 45, 46]. Über die Bindung an diese Rezeptoren induziert ADP die Formveränderung der Plättchen, den Kalziumeinstrom und die Hemmung der Adenylatzyklase. ADP verstärkt so seine eigenen Effekte und die anderer Aktivatoren der Blutgerinnung. Zusätzlich aktiviert ADP den Fibrinogenrezeptor und führt dazu, dass Plättchen an Fibrinogen binden und verklumpen [47]. ADP Rezeptoren sind potenzielle Ziele für antithrombotische Medikamente [45].

1.4 Thrombin

Thrombin (Faktor IIa) entsteht während der plasmatischen Gerinnung durch den Prothrombinasekomplex (FX, FV, Ca^{2+} , Phospholipide) aus Prothrombin (Dahlbäck 2000). Die Serinprotease ist das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade und hat viele wichtige Funktionen. Als einer der stärksten Plättchenaktivatoren [48] löst Thrombin die Formveränderung, Degranulation und Aggregation der Thrombozyten aus [49, 50]. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin und führt zu der Bildung eines unlöslichen Fibrinnetzes. Über die Aktivierung der Faktoren V, VIII und IX verstärkt Thrombin die Gerinnung (positive Rückkoppelung). Die Aktivierung des Faktor XIII führt zur Stabilisierung und Retraktion des Fibringerinnsels [51]. Neben seinen stark gerinnungsfördernden Eigenschaften kann Thrombin, abhängig von der Situation in der es gebildet wurde, auch antikoagulatorisch wirksam sein. Am Ort einer Gefäßverletzung ist Thrombin stark prokoagulatorisch wirksam. In einem intakten Gefäßsystem hat Thrombin durch die Bindung an Thrombomodulin jedoch eine gerinnungshemmende Wirkung. Thrombomodulin ist ein Membranprotein der Endothelzellen, welches Thrombin bindet, seine Substratspezifität verändert und dazu führt, dass Thrombin Protein C aktiviert, anstatt Fibrinogen zu spalten. Aktiviertes Protein C (APC) kann die an Phospholipide gebundenen Kofaktoren Va und VIIIa durch Spaltung deaktivieren, was zu einer Inhibition des Gerinnungssystems führt. Der Vitamin-K-abhängige Kofaktor Protein S unterstützt die antikoagulatorische Aktivität von APC [39].

Thrombin aktiviert Plättchen über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) [10, 49]. Auf glatten Muskelzellen führt Thrombin über die Bindung an PAR-1, -3, -4 außerdem zu einer erhöhten Mitogenese und Migration von humanen glatten Muskelzellen und zu proinflammatorischen Reaktionen.

PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine extrazelluläre proteolytische Spaltung in ein transmembranöses Signal umwandeln [52]. Es wurden vier verschiedene PARs identifiziert. Während es sich bei PAR-1, PAR-3 und PAR-4 um Thrombin-Rezeptoren handelt, wird der PAR-2 durch Trypsin aktiviert. Die proteolytische Abspaltung eines Teils des N-Terminus führt zu der Freilegung eines neuen N-Terminus, der wie ein an den Rezeptor gebundener Ligand funktioniert [49, 52].

Die Bindungsstelle für den Liganden liegt in den extrazellulären Schleifen. Da der Ligand an den Rezeptor gebunden ist und nicht wegdiffundieren kann, hat er eine hoch effektive lokale Konzentration am Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung, die sich über die Plasmamembran ins Innere der Zelle fortsetzt und zum Austausch von GDP gegen GTP an dem mit dem Rezeptor assoziierten G-Protein führt [49].

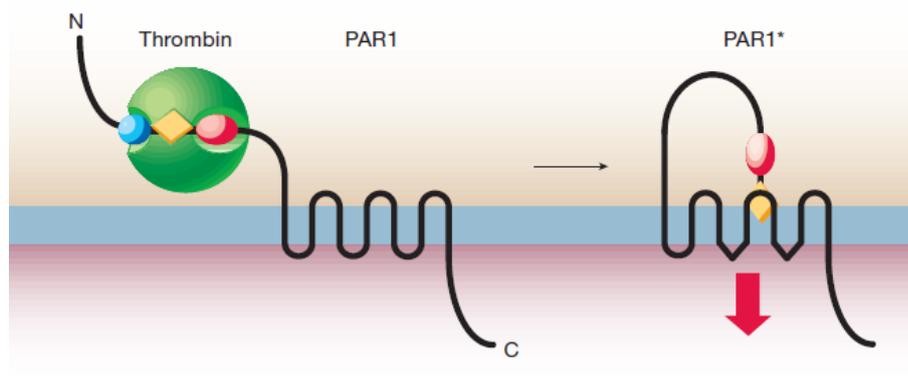


Abbildung 7 Aktivierung von PAR durch Thrombin (Coughlin 2000)

Thrombin (in grün dargestellt) bindet an die N-terminale Domäne des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und spaltet die Peptidbrücken zwischen den Aminosäuren Arginin 41 und Serin 42. Dadurch wird ein neuer N-Terminus freigelegt, der wie ein gebundener Ligand funktioniert [52].

Humane Plättchen exprimieren PAR-1 und PAR-4. PARs vermitteln das Signal über ein G_q -Protein, was zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat und es entstehen die beiden *second messenger* Inositol-3-Phosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 wiederum trägt zur Kalziummobilisation aus internen Speichern bei, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Das erhöhte intrazelluläre Kalzium reguliert viele Vorgänge die zur Plättchenaktivierung führen; dazu gehört die p38 MAP-Kinase abhängige Aktivierung der Phospholipase A_2 , die membranständige Phospholipide hydrolysiert und so Arachidonsäure und Thromboxan A_2 bildet [10, 49].

1.5 Familie der P2 Rezeptoren

Extrazelluläre Purine (Adenosin, ADP und ATP) und Pyrimidine (UDP und UTP) sind wichtige Signalmoleküle, die diverse biologische Effekte über Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermitteln. Es gibt zwei Hauptfamilien von Purinrezeptoren. Man unterscheidet die Adenosin- oder P1-Rezeptoren von P2-Rezeptoren [46, 53], welche hauptsächlich durch die Adeninnukleotide ATP und ADP aktiviert werden, die von Plättchen, Endothelzellen, sympathischen Nervenendigungen und Immunzellen freigesetzt werden können. Anhand ihrer molekularen Struktur und Signaltransduktion lässt sich die Familie der P2-Rezeptoren in zwei Gruppen unterteilen. Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren), bei den P2Y-Rezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (metabotrope Rezeptoren) [6, 53]. P2X-Rezeptoren haben 2 Transmembrandomänen und eine große extrazelluläre Schleife, während P2Y-Rezeptoren 7 Transmembrandomänen enthalten [44]. Zwei Mitglieder der P2Y-Familie, der G_q -gekoppelte $P2Y_1$ - und der G_i -gekoppelte $P2Y_{12}$ -Rezeptor, sind durch ihre besondere Rolle bei der Plättchenaggregation von besonderem Interesse [54]

1.5.1 Der P2Y₁₂ Rezeptor

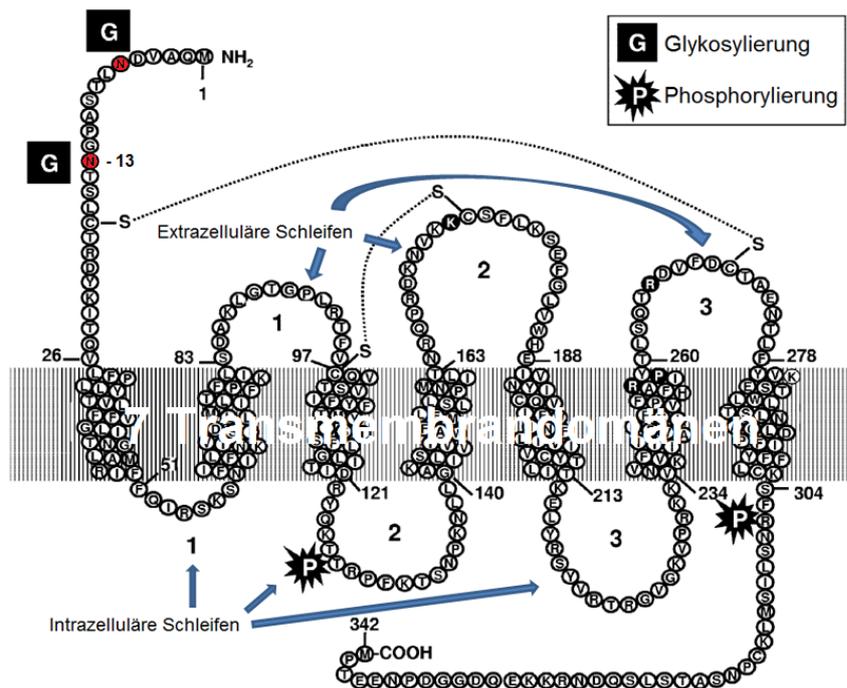


Abbildung 8 Sekundärstruktur des P2Y₁₂-Rezeptors (modifiziert nach Cattaneo 2011)

Der P2Y₁₂-Rezeptor enthält 342 Aminosäuren. Er gehört zu der Familie der P2Y-Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen und drei intrazellulären sowie drei extrazellulären Schleifen (1, 2, 3). Am Amino-Terminus befinden sich 2 potenzielle Glykosylierungsstellen an Aminosäure 6 und 13 (rot), die für die Signaltransduktion wichtig sind (modifiziert nach [55]).

Der P2Y₁₂-Rezeptor wurde ursprünglich in humanen Blutplättchen und im Gehirn identifiziert [45, 56]. Nachfolgende Studien haben gezeigt, dass der Rezeptor auch in Mikroglia [57], Retina [58], bovinen chromaffinen Zellen [59] und im Endothel von Rattenhirnkapillaren exprimiert ist [3, 6]. Kürzlich wurde die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auch in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen [60], und es wurde eine Rolle bei der Gefäßkontraktion angenommen [6]. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist an das inhibitorische G-Protein G₁₂ gekoppelt und induziert mit seiner β/γ-Untereinheit über Aktivierung der IP₃-Kinase Sekretion der elektronendichten Plättchengranula. Über die α₁-Untereinheit des G₁₂-Proteins wird die Adenylatzyklase inhibiert, welche für die vollständige Plättchenaktivierung und Aggregation wichtig ist. Zusätzlich spielt die G₁₂-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Integrins αIIbβ₃ (GPIIb/IIIa) [3, 56, 61]. In früheren Veröffentlichungen wurde der P2Y₁₂-Rezeptor auch P2Y_{ADP} [62], P2Y_{AC} [47], P2T [56], P2Y_{Cyc} [63], oder P2T_{ac} [64, 65], HORK3 [66] und SP1999 [67] genannt. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist ein Glykoprotein mit 7 Transmembrandomänen

[44]. Das geschätzte Molekulargewicht des Rezeptors beträgt 41,7 kDa. An seinem extrazellulären Amino-Terminus befinden sich zwei potentielle Glykosylierungsstellen an der Aminosäure 6 und 13, die *in vivo* glykosyliert vorliegen. Dadurch kommt es zu einer Veränderung des Molekulargewichts und in Immunoblots zur Darstellung von Banden im Bereich von ca. 64 kDa [44]. Der gereinigte Rezeptor zeigt in der SDS-PAGE eine diffuse Bande bei ca. 42-52 kDa. Die Behandlung mit N-Glykosidase führte zu einer weniger diffusen und schneller wandernden Bande bei etwa 42 kDa [54]. Die N-Glykosylierung des Rezeptors ist für die Signaltransduktion essenziell, für die Bindung eines Liganden oder seine Expression an der Zelloberfläche ist das Anhängen von Polysacchariden jedoch nicht von Bedeutung [44].

Aus klinischer Sicht ist P2Y₁₂ ein sehr wichtiger Rezeptor, seit pharmakologische Studien gezeigt haben, dass er das Ziel der weit verbreiteten antithrombotischen Medikamente Ticlopidin und Clopidogrel ist. [41]. Aufgrund seiner sehr spezifischen Gewebeverteilung ist der P2Y₁₂-Rezeptor ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer antithrombotischer Substanzen [56]. Ob der P2Y₁₂-Rezeptor bei entzündlichem Geschehen in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand beteiligt ist und ob P2Y₁₂-Antagonisten, unabhängig von ihren plättchenhemmenden Effekten an verletzten Gefäßgebieten direkte antiinflammatorische Aktivität besitzen, ist noch nicht bekannt.

1.5.2 Die Rolle des P2Y₁₂ Rezeptors in der Blutgerinnung

Der Plättchen-ADP-Rezeptor P2Y₁₂ spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Blutgerinnung. Bindung von ADP führt zu Plättchenaktivierung und Aggregation. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist für die Stabilisierung von Thrombozytenaggregaten und für die potenzierende Wirkung von ADP verantwortlich [40]. Da bei Arteriosklerose die Formation eines Thrombus zu einem akuten Ereignis wie Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann, ist der Plättchen P2Y₁₂-Rezeptor wichtiges Ziel präventiver blutgerinnungshemmender Therapie. Kürzlich wurde der P2Y₁₂-Rezeptor auch auf humanen glatten Muskelzellen (hSMC) identifiziert [6]. In den folgenden Untersuchungen wurde deshalb der Frage nachgegangen, welche Funktion der Rezeptor auf diesen Zellen übernimmt, wie er Signale transduziert, und ob die P2Y₁₂-Rezeptor Antagonisten auch an den P2Y₁₂-Rezeptoren der hSMC in der Gefäßwand einen therapeutischen Effekt haben.

1.6 Thienopyridine

P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten, wie die Thienopyridine, sind als Antiplättchensubstanzen weit verbreitet [3]. Sie hemmen irreversibel und selektiv die Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors durch ADP und dadurch die Aktivierung von GPIIb/IIIa [68]. Unter den Antiplättchensubstanzen hat sich Clopidogrel in Monotherapie, oder in Kombination mit ASS in der Behandlung atherothrombotischer Erkrankungen bewährt [5]. Clopidogrel spielt besonders bei der Therapie der KHK, des akuten Koronarsyndroms und nach Coronarintervention mit Stenteinlage eine wichtige Rolle. Die Thienopyridine Clopidogrel und Ticagrelor reduzierten laut klinischen Studien die Inzidenz von Myokardinfarkt und Schlaganfall [41]. Durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen der reaktiven Thiolgruppe von Clopidogrel und zwei Zystinresten (Cys 17 und Cys 270) der extrazellulären Domäne des P2Y₁₂-Rezeptors entsteht eine irreversible Bindung [69]. Neben ihrer Rolle als Inhibitoren der Plättchenaggregation, deutet vieles darauf hin, dass diese Verbindungen auch antiinflammatorische Aktivität aufweisen. Bei Patienten mit Arteriosklerose wurden unter Therapie mit P2Y₁₂-Antagonisten geringere Plasmalevel von Entzündungsparametern wie CD40 Ligand, C-reaktives Protein, P-Selektin und Plättchen-Leukozyten-Aggregate gemessen [70] und es wurde kürzlich gezeigt, dass der Plättchen P2Y₁₂-Rezeptor die Reaktion der Gefäßwand auf Verletzung oder Thrombose beeinflusst [71].

1.7 Humane glatte Muskelzellen

Die Proliferation humaner glatter Muskelzellen (hSMC) ist ein typisches Ereignis bei der Pathogenese der Arteriosklerose. Dieses SMC Verhalten ist mit einer Transformation vom kontraktilem zu einem sekretorischen Phänotyp assoziiert. Der sekretorische Phänotyp der SMC ist durch den Verlust der Myofibrillen, die Bildung von Matrixproteinen und die Reaktion auf Wachstumsfaktoren mit Zellproliferation gekennzeichnet [72]. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist der *Platelet-derived growth factor* (PDGF). Bindung des PDGF an seinen Rezeptor stimuliert die Tyrosinkinase, welche wiederum zu einer mitogenetischen Antwort der glatten Muskelzelle führt. Die Signalübertragung beinhaltet die MAP-Kinase-Kaskade. Arterielle glatte Muskelzellen synthetisieren extrazelluläre Matrixbestandteile wie Kollagen, elastische Faserproteine und Glykosaminoglykane (Mucopolysaccharide) und können als Analoge zu den Fibroblasten der Sehnen, den Chondroblasten des Knorpels und den Osteoblasten des Knochens betrachtet werden. Das ist deshalb von Bedeutung, da Kollagen ein Hauptbestandteil von fibrösen und komplizierten Läsionen ist. SMC spielen bei der Entstehung der Arteriosklerose eine fundamentale Rolle. Sie akkumulieren, bilden extrazelluläre Matrixkomponenten, in Gegenwart erhöhter Konzentrationen von extrazellulärem Lipoprotein reichern sie intrazellulär Lipide an und sie fördern die extrazelluläre Ablagerung von Lipiden [19].

1.8 Zielsetzung

Nach einer Gefäßverletzung wird das unter dem Endothel liegende Gewebe des Gefäßes frei, welches verschiedene Proteine enthält, die zu einer Aktivierung der Blutgerinnung führen. Zu einem der wichtigsten Faktoren die dabei eine Rolle spielen gehört der Tissue Faktor. Kommt dieser in Kontakt mit Blut kommt es zu einer Aktivierung einer Reihe von Gerinnungsfaktoren (FVII und FX) die eine Produktion von Thrombin verursachen. Schon kleine Mengen Thrombin bewirken an Blutplättchen ein Ausschütten von ADP. ADP verstärkt die durch Thrombin und Kollagen hervorgerufene Plättchenaktivierung indem es an spezifische G-Proteingekoppelte Rezeptoren an der Plättchenoberfläche bindet. Einer der wichtigsten Rezeptoren ist dabei der P2Y₁₂-Rezeptor. In die Plättchenmembran integriert, bewirkt er nach Bindung von ADP eine vermehrte Bildung und Ausschüttung von Thrombin, welches wiederum selbst prokoagulatorisch wirksam ist. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist auf humanen Plättchen nachgewiesen und als bewährtes Ziel antithrombotischer Therapie bekannt. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass der P2Y₁₂-Rezeptor auch auf anderen Geweben exprimiert ist, und dass P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten neben ihrer gerinnungshemmenden Wirkung auch antiinflammatorisch wirksam sind. Der P2Y₁₂-Rezeptor wurde zuletzt auf SMC detektiert. Thrombin ist ein bekannter mitogener Stimulus für SMC, die durch ihre Migration und Proliferation in der Intima mittelgroßer und großer Arterien an der Entstehung und Proliferation atherosklerotischer Läsionen beteiligt sind.

In diesem Zusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragen nachgegangen werden:

- Lässt sich der Nachweis des P2Y₁₂-Rezeptors auf humanen glatten Muskelzellen reproduzieren?
- Welchen Effekt hat Thrombin, welches *in vivo* nach einer Gefäßverletzung vermehrt gebildet wird, auf die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors in humanen glatten Muskelzellen?
- Durch welche Signalkaskade wird der Effekt von Thrombin auf die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors vermittelt?
- Welche Funktion hat der P2Y₁₂-Rezeptor in humanen glatten Muskelzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Komplettpakete

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	BioRad, München
ADP (Adenosindiphosphat)	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Amidoschwarz	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	BioRad, München
α -Thrombin	Dr. J. Stürzebecher, Institut für Vaskuläre Medizin, Jena
Bradford-Reagenz	BioRad, München
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
DAB Substrate Kit (Immunhistochemie)	Zytomed Systems, Berlin
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
EZ-Label TM FITC Protein Labeling Kit	Thermo Scientific, Bonn
Fast Red	DAKO, Hamburg
FCS (<i>Fetal calf serum</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
Hämalaun	Sigma-Aldrich, München
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma-Aldrich, München
Iloprost (Ilomedin ®)	Bayer, Leverkusen
Lumi-Light-Western blotting substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
Fermentas 1kb Marker	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot
2-(Methylthio)-adenosin-5'-diphosphat (2-MeSADP)	Sigma-Aldrich, München
2-(Methylthio)-adenosin-5'-monophosphat (2-MeSAMP)	Sigma-Aldrich, München
PageRuler TM Prestained Protein Ladder (Protein-Standard)	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
PAR-1 (AP1, TFFLRN)	Biosynthan, Berlin
PAR-3 (AP3, TFRGAP)	Biosynthan, Berlin
PAR-4 (AP4, AYPGQV)	Biosynthan, Berlin
PLT VASP/P2Y12 Test Kit # 7014	BIOCYTEX, Marseille

R-138727 (Prasugrel)	Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
SYBR Green [®] PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR Green QuantiTect Primer Assays PAR-1: Hs_F2R_1_SG PAR-2: Hs_F2RL1_1_SG PAR-3: Hs_F2RL2_1_SG PAR-4: Hs_F2RL3_1_SG GAPDH: Hs_GAPDH_2_SG	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan [®] Gene Expression Assays P2Y12: Hs_P2RY12_3SG GAPDH: Hs99999905_m1	Applied Biosystems, Darmstadt
[3H]-Thymidin	Hartmann Analytics, Braunschweig
Tri-Reagent	Sigma- Aldrich, München
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Qiagen [®] OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
ACD-Puffer	25,0 g Natriumcitrat 15,0 g Citronensäure 20,0 g Dextrose ad 100,0 ml pH 4,5
Blockierungs-Puffer	1x TBST 3 % BSA (Bovines Serumalbumin)
Citrat-Puffer	0,135 M Kaliumchlorid 0,015 M Natriumcitrat
„Destain“	125 ml Isopropanol 50 ml Essigsäure Ad 500 ml H ₂ O
10x HBSS (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	1,37 M NaCl 54 mM KCl 2,5 mM Na ₂ HPO ₄ 4,4 mM KH ₂ PO ₄ 42 mM NaHCO ₃ 13 mM CaCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 7,0
1x HBSS (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	50 ml 10x HBSS 0,5 g Glucose 0,5 g BSA 5 ml HEPES 1M (pH 7,8) 0,5 ml CaCl ₂ 1M 0,4 ml MgSO ₄ 1M ad 500 ml H ₂ O bidest
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1 x PBS)	137 mM NaCl 9,6 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
10 x Laufpuffer	250 mM Tris (Trishydromethylaminomethan) 1,9 mM Glycin 1 % SDS
Lysepuffer (4xLämmli)	25% 1M Tris-HCL pH 6,8 35% Glycerol 8% SDS 1 Messerspitze Bromphenolblau

	10% 1M DTT
RIA-Puffer	50 mM Tris/HCL pH 7,5 (3,029 g Tris) 4 mM EDTA pH 8,0 ad 500 ml
Sammelgel	2,5 ml 1 M Tris/HCL pH 6,8 1,25 ml PA 6,25 ml H ₂ O 100 µl SDS 100 µl APS 14 µl TEMED
SDS Lysepuffer (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	4% SDS 20% Glycerol 0,0625 M NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ pH 7.0 100 mM DTT (Dithiothreitol) 0,1% Bromphenol Blau
SC- Zusatz (Zellkultur)	6,25 ml NEAS (Nicht-essentielle Aminosäuren) 100x 6,25 ml Na-Pyruvat 100x 6,25 ml L-Glutamin 100x 3,125 ml Penicillin/Streptomycin 100x
„Stripping“- Puffer	0,2 M NaOH
TBE	89mM Tris 89mM Borsäure 2 mM EDTA (pH 8,0)
Trenngel (10%)	3,75 ml 0,5 M Tris/HCL pH 8,8 5 ml Polyacrylamid 6,25 ml H ₂ O 150 µl SDS 150 µl APS 14 µl TEMED
1x Transfer-Puffer	1 x Laufpuffer 20 % Methanol 0,01 % SDS
10 x TBS	100 mM Tris / HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
1x TBST	1 x TBS 0,1 % Tween 20
TBSTM	TBST 5 % Milchpulver

2.3 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Rabbit anti-human Anti-Purinergic Receptor P2Y12 (P4871) extracellular loop</i>	Sigma-Aldrich, München	1:500
<i>Rabbit anti-human Anti-P2Y12 Platelet ADP Receptor antibody (P6997) intracellular domain</i>	Sigma-Aldrich, München	1:1000
<i>Rabbit-AK IgG polycl. (unspezifisch)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Goat anti-human tissue factor antibody (4501)	American Diagnostica	1:40
Monoclonal anti-human M-actin (clone HHF35)	DAKO, Hamburg	1:40
Monoklonal anti-human CD42 (8226) antibodies	Abcam, Cambridge, UK	1:40
<i>Rabbit anti-human Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody #9101</i>	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt	1:1000
<i>Rabbit anti-human p44/42 MAPK (ERK 1/2) Antibody, Lot:16, #9102</i>	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt	1:1000
Anti-β-Aktin	Abcam, Cambridge, UK	1:20.000
<i>Phospho-VASP (Ser 157) Antibody #3111S</i>	Cell Signaling	1:1000

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2005, Lot #L1205, HRP conjugated, store at 4°C, (200µl/0,5ml)</i>	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
<i>Goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2004, Lot #K0504, store at 4°C, (200µl/0,5 ml)</i>	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
<i>Donkey anti-rabbit-FITC</i>	Santa Cruz Biotechnology	1:2000

2.4 Geräte und Material

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte/Material:	Bezeichnung:	Hersteller:
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
Blot-Membran	PVDF-Membran Immobilon-P [®]	Roche Diagnostics GmbH, Erlangen
Durchflusszytometer	EPIC-XL [®]	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer (Protein)	Mini-PROTEAN [®] 3 Electrophoresis Cell, Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell, PowerPac [®] 200/300	BioRad, München
Filmauswertung (Scanner und Software)	GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One [®] Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich BioRad, München
Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Kamera und Software	Olympus BX 50, IX 50 Colorview II Kamera mit SIS software (Soft Imaging System)	Olympus, Hamburg Soft Imaging System, Münster
Fotopapier	Hyperfilm [™]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gel-Dokumentation	Gel-Doc System GS-800	BioRad, München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Immunfluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE 2000 PFS microscope equipped NIS Elements Software V. 3.0	Nikon, Düsseldorf
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Plattenlesegerät	Microplate Reader Model 550	Biorad, München
Protein-Transfer (Western-Blot)	PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab, Erlangen
Realtime-PCR-Gerät	Applied Biosystems 7300	Applied Biosystems, Darmstadt

RNA, DNA-Messung (Spectrophotometer)	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg
UV-Lichttisch	Olympus U-RFL-T	Olympus, Münster
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge Minifuge GL	Beckman Coulter, Krefeld, Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

2.5 Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen des Menschen wurden uns freundlicherweise von der Herzchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf nach Einwilligung des Spenders, mit der Genehmigung der Ethik-Kommission und der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, zur Verfügung gestellt. Humane arterielle und venöse glatte Muskelzellen wurden durch Explant-Technik [92] aus humaner *Vena saphena* (VS) und humaner Aorta (A) isoliert. Dafür wurden die Gefäße durch einen Längsschnitt eröffnet und in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) eingelegt. Nach vorsichtigem Abschaben des Endothels und dem Entfernen der *Media* von der *Adventitia* wurden die Präparate in etwa 1 mm große Segmente geschnitten und in 6-Well Platten mit DMEM bei 37 °C und unter 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Alle 48 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt. Durch das Auswachsen der glatten Muskelzellen aus der *Media* der Explantate und ihrer Proliferation entstand nach etwa ein bis zwei Wochen eine konfluierende Zellschicht am Boden der Kulturplatten. Ihre Identifizierung als glatte Muskelzellen erfolgte zum einen durch ihr typisches „*hill and valley*“ Wachstumsmuster und zum anderen durch Immunfluoreszenz-Färbung mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen *smooth muscle* α -Aktin [92].

Zur Kultivierung wurden die glatten Muskelzellen in Zellkulturgefäßen ausgesät. Hierbei handelte es sich je nach Versuchsansatz um 6-Well Platten (9,6cm²/Well), 12-Well (3,8cm²/Well), 24-Well Platten (1,9cm²/Well), 48-Well Platten (0,75cm²/Well) oder 96 Well Platten (0,32cm²/Well). Die Passagierung erfolgte in T175-Flaschen (175 cm²). Die Kultivierung erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Invitrogen) mit Zusatz von 15 % FCS (Fetal calf serum, Invitrogen), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1,9 mM L-Glutamin, 9,6 mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂. Nach Erreichen einer Subkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,5 mM) zur weiteren Passagierung abgelöst. Für die Versuche wurden SMC der Passagen 3-9 verwendet.

Vor der Stimulation mit den angegebenen Substanzen wurden alle Zellen für 48 Stunden in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin sowie Glukosezusatz (gesamt 4,5 g/l) gehalten, um ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Das serumfreie DMEM wurde nach 24 Stunden durch frisches ersetzt.

2.6 Herstellung von Thrombozytenlysaten

Als Positivkontrolle bei der Untersuchung des P2Y₁₂-Rezeptors auf glatten Muskelzellen dienten Thrombozytenlysate. Dafür wurden freiwilligen Spendern 2 ml Blut abgenommen und mit 200 µl 10% ACD (*Acid-Citrate-Dextrose*) versetzt um die Gerinnung zu hemmen und das Verklumpen der Blutplättchen zu verhindern. Daraufhin wurden die Blutproben in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und 45 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und abermals 35 Sekunden bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das übrig bleibende Pellet mit 150 µl Lämmli-Puffer resuspendiert, für 5 min bei 95° gekocht und anschließend bei -20° gelagert.

2.7 Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten humanen glatten Muskelzellen erfolgte mittels Tri-Reagent[®] (Sigma-Aldrich). Nach Abnahme des Nährmediums wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Tri-Reagent[®] pro Kammer einer 6-Well Platte lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zelllysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch je 200µl Chloroform ergänzt. Es folgte die Ausschüttelung der wässrigen, phenolhaltigen Phase des Tri-Reagents[®] gegen das Chloroform. Danach wurden die Proben erneut kurz bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C und 13000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der entstandene, mit RNA angereicherte wässrige Überstand wurde in sterile Eppendorf-Gefäße überführt und es wurden 400-450 µl (je nach Menge des gewonnenen Überstands) Isopropanol hinzugefügt. Die Ausfällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Ende der Ausfällung wurden die Proben erneut bei 4 °C und 13000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Die erhaltenen RNA-Pellets wurden daraufhin mit 70% Ethanol gewaschen und weitere 20 Minuten zentrifugiert (s.o.). Nach restloser Entfernung des Ethanols wurden die Pellets in 22 µl RNase-freiem Wasser bei 65 °C durch Schütteln resuspendiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die in RNase-freiem Wasser aufgenommene RNA wurde mit einem Nanodrop-1000 (Peqlab, Erlangen) bei 260 nm photometrisch vermessen.

2.8 Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCRs erfolgten in einem Mastercycler (Eppendorf). Als *Template* für die RT-PCR wurde 250ng-1µg RNA/µl eingesetzt. Die Synthese und Amplifizierung der cDNA erfolgte in einem Gesamtansatz von 25 µl. Dieser enthielt 1x PCR Puffer, 0,15 mM GAPDH-Primer (Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) als internen Standard, 1µM spezifischen Primer (P2Y12), 10 mM dNTP und einen Enzym-Mix (Qiagen® One-Step RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden). Bei den Konzentrationen der Oligonukleotide und der Primer handelte es sich um Erfahrungswerte, die sich, ausgehend von den üblichen Konzentrationen für einen 20µl Ansatz (0,6 µM für den spezifischen Primer und 0,6 µM für GAPDH) ergaben. Die RT-PCR erfolgte über 32 Zyklen. Zunächst wurden die Ansätze für 30 Minuten auf 50 °C erhitzt, danach für 15 Minuten auf 95 °C. Die Denaturierung der cDNA erfolgte dann bei 94°C für eine Minute, die optimale *Annealing*-Temperatur für den selbst entwickelten P2Y12 Primer berechnete sich auf 55 °C. Das *Annealing* dauerte pro Zyklus ebenfalls eine Minute. Die Elongation fand eine Minute lang bei 72 °C statt. Zum Schluss inkubierten die Proben weitere 10 Minuten bei 72 °C.

Die Auftrennung des RT-PCR-Ansatzes erfolgte elektrophoretisch in Agarose-Gelen unter Zusatz von Ethidiumbromid (0,4 µg/ml). Zum Beladen der Gele wurden jeweils 18 µl des Gesamtansatzes mit 2 µl Laufpuffer/Blaumarker versetzt. Während der gesamten Pipettiervorgänge befanden sich die RNA, Oligonukleotide und Primer fortlaufend auf Eis. RNA, Oligonukleotide und die Primer wurden vor Gebrauch für 2 Minuten auf 65 °C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Außerdem wurden alle Substanzen vor Gebrauch gründlich durchmischt. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und mittels einer Geldoc™ 1000 Apparatur und der Software Quantity One® Version 4.1.0 (BioRad, München) ausgewertet. Zur Normalisierung wurde das Fluoreszenz-Signal des zu untersuchenden Gens durch das der GAPDH-Bande geteilt. Die Werte der stimulierten Proben wurden als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

2.9 Real-Time PCR

Für die *Real-time* PCR wurde 1 µg Gesamt-RNA zunächst mittels *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) in einem *Mastercycler Gradienten* (Eppendorf, Hamburg) in cDNA umgeschrieben. Die Detektion der cDNA erfolgte daraufhin mittels TaqMan® Reagent und TaqMan®-Primer-Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die PCR erfolgte im 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Durch diese Methode ist eine spezifische Detektion der PCR-Produkte möglich. Dies geschieht mittels einer Sonde aus ca. 20 bis 30 Nukleotiden, welche spezifisch an die zu untersuchende Sequenz bindet. An ihrem 5'-Ende ist ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein) kovalent gebunden. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird durch einen *Quencher* (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin) am 3'-Ende der Sonde unterdrückt, solange sie sich in ausreichender Nähe zueinander befinden. Trifft nun während der Expansionsphase der PCR die Ampli-Taq®-DNA-Polymerase auf die fluoreszenzmarkierte Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase hydrolysiert und der Reporterfarbstoff wird räumlich vom *Quencher* getrennt. Dabei entsteht ein stark sequenzspezifisches Signal welches mittels *Sequence Detection Software v1.2.3* detektiert wurde. Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert, deren Expression über den gesamten Zeitverlauf konstant blieb. Regulatorische Effekte durch die Stimulation von PAR 1-4 wurden durch das Vergleichen der Ergebnisse der Proben mit der jeweiligen Kontrolle ermittelt.

2.10 Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

2.10.1 Proteinextraktion aus humanen glatten Muskelzellen

Nach dem Entfernen des Nährmediums wurden die behandelten Zellen mit PBS gewaschen und jede Kammer der 6-Well Platte mit 120 µl 4x Lämmli-Puffer + 10% DTT versetzt. Anschließend wurde das Zell-Lysat gründlich abgekratzt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden zur Denaturierung für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und schließlich bei -20 °C gelagert.

2.10.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Protein-Lysate wurden mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Es wurden jeweils gleiche Volumina pro Spur aufgetragen und die Gleichmäßigkeit der Proteinkonzentration pro Spur wurde anschließend mit β -Aktinkontrollen im Western Blot gesichert. Abhängig von der Größe der Kämme betrug das Volumen 15-30 µl pro Tasche. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichts-Marker (*Prestained Protein Ladder*, 10-180 kDa) und eine Positivkontrolle in Form von Thrombozyten-Lysaten auf das Gel aufgebracht. Der Gellauf erfolgte in Laufpuffer bei 120-200 V für 45-80 Minuten in einer Gelelektrophorese Kammer (Biorad, München).

2.10.3 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Nach dem Auftrennen der Proteine in der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran, welche zuvor in Methanol equilibriert und mit bidestilliertem Wasser gewaschen wurde. Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose Membran erfolgte mit einer Semi-Dry-Apparatur in Transferpuffer und fand bei konstant 10 V für ca. 50-55 Minuten statt.

2.10.4 Immunodetektion (Western Blot)

Nach Beendigung des Vorgangs wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch Blockierungslösung (3%BSA in TBST) 2 Stunden lang blockiert. Die Inkubation in Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer Verdünnung von 1:500-1:1000 in Blockierlösung. Am folgenden Tag wurden die Membranen drei mal 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen, wobei bei jedem Waschvorgang frischer Waschpuffer verwendet wurde. HRP-gekoppelte *anti-rabbit* und *anti-mouse* Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200-1:5000 eingesetzt und für 1 Stunde in 1xTBST inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut gründlich gewaschen (3x 30 Minuten). Die Banden wurden mittels *Lumi-light Western blotting substrate* sichtbar gemacht. Dieses wurde für 10 Minuten auf die Membranen gegeben, anschließend wurde die Chemilumineszenz durch Auflegen von Fotopapier sichtbar gemacht.

2.10.5 Strippen von PVDF-Membranen

Zur Sicherung der Gleichmäßigkeit der Proteinkonzentration pro Spur des Polyacrylamid-Gels wurden die PVDF- Membranen im Anschluss gestrippt und mit β -Aktin Antikörper umgesetzt. Dazu wurde die jeweilige Membran zunächst für 10 Minuten in TBST gewaschen. Bereits getrocknete Membranen wurden vor diesem ersten Waschvorgang zusätzlich 10 Sekunden in Methanol geschwenkt. Im Anschluss wurden die Membranen 5 Minuten in H₂O geschwenkt und für weitere 5 Minuten mit „*Stripping*-Puffer“ (0,2 M NaOH) behandelt. Nach erneutem 5-minütigem Schwenken in H₂O wurden die Membranen für 90 Minuten in TBST-M blockiert und über Nacht bei 4°C in Anti- β -Aktin Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgten drei 10minütige Waschvorgänge mit TBST bevor die Membran eine Stunde in Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 inkubierte. Nach erneutem Waschen wurden die Banden wie oben beschrieben sichtbar gemacht.

Dieser Vorgang wurde ebenfalls durchgeführt, wenn weitere Proteine auf der gleichen Membran dargestellt werden sollten oder um bereits mit einem anderen Antikörper untersuchte Proteine zu detektieren.

2.10.6 Densitometrische Auswertung

Die Blots wurden gescannt und die Auswertung der Banden erfolgte mit Quantity One[®].

2.11 Durchflusszytometrie (FACS)

Als Ergänzung zur Untersuchung der P2Y₁₂-Expression mittels Immunoblot-Analyse und PCR erfolgte die durchflusszytometrische Messung von Antikörperfluoreszenzen um die P2Y₁₂-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche der glatten Muskelzellen zu ermitteln.

Dazu wurden die Zellen in 6-Well Platten ausgesät und wie in 3.1.3. beschrieben mit Thrombin stimuliert. Am Ende der Stimulation wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen durch vorsichtige Zugabe von 1 ml kaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml Citrat/PBS (10%) (0,135 M Kaliumchlorid, 0,015 M Natriumzitat) hinzugegeben und die Zellen darin für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen sich gut von der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt hatten, wurden diese in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 35 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet aus humanen glatten Muskelzellen mit 60 µl warmen 3%BSA/PBS resuspendiert. Nun wurde je 3 µl Erstantikörper (Anti-P2Y₁₂) in neuen Eppendorfcups vorgelegt und jeweils 50 µl der insgesamt 60 Mikroliter Zellsuspension hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Erstantikörper dauerte 15 Minuten. Es folgte die Zugabe von 5 µl des mit FITC markierten Zweitantikörpers (*Donkey anti-rabbit-FITC*). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln waren die Zellen für die Messung vorbereitet. Diese erfolgte mittels eines EPICS® XLTM Durchflusszytometers (Beckman Coulter, Krefeld), welches Zellpopulationen anhand ihrer Streulichteigenschaften eingrenzt und es möglich macht glatte Muskelzellen als solche zu identifizieren. Dazu passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Das Streulicht der einzelnen Zellpopulationen variiert aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Zellwandstruktur und intrazellulären Bestandteilen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC=*forward scatter*) als Maß für das Volumen der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC=*sideward scatter*) für die Beschaffenheit der Zelle wird vom Gerät erfasst und gegeneinander in ein Diagramm aufgetragen. Hierdurch lassen sich gezielt einzelne Zellpopulationen isolieren.

Wenn entsprechende Antikörper gebunden sind können zusätzlich Antikörperfluoreszenzen gemessen und quantifiziert werden.

Für die Isotyp-Kontrolle wurde ein unspezifischer *Rabbit*-IgG-Antikörper verwendet um unspezifische Bindungen zu messen und sie später bei der Auswertung der Ergebnisse herausrechnen zu können. Die Isotyp-Kontrolle stammte von der gleichen Spezies (*rabbit*) und war an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der eingesetzte Antikörper.

Mit der System IITM 3.0 Software wurden jeweils 5000 Zellen gemessen und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Durch die Subtraktion des Mittelwertes des Isotyps („Mittlere Fluoreszenzintensität“ Mn X) von dem Wert der Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe erfolgte die Quantifizierung. Der jeweils resultierende Wert der stimulierten Proben wurde auf den Wert der Kontrolle normalisiert.

2.12 cAMP Assay

Humane glatte Muskelzellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer Subkonfluenz kultiviert. Vor Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Stimulanzen wurden sie für 48 Stunden in serumfreien Medium gehungert. Alle Experimente wurden in zweifacher Ausfertigung durchgeführt, wobei je eine der zwei 24-Well Platten für 6 Stunden mit 120 µl Thrombin pro Well (3U/ml) vorinkubiert wurde. Für jede cAMP Messung waren 3 Wells vorgesehen. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 400 µl des 37°C warmen 1x HBSS gewaschen. Nach Absaugen des 1x HBSS wurden je 200µl des 37°C warmen, in HBSS verdünnten 1M IBMX hinzugegeben und 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Fünf Minuten zeitversetzt erfolgte nun die Zugabe der zu testenden Substanzen und deren 10-minütige Inkubation bei 37°C. Prasugrel wurde in einer Konzentration von 10 µM, MeSADP in einer Konzentration von 1µM und Iloprost in einer Konzentration von 1nM eingesetzt. Bei kombinierter Stimulation von Prasugrel mit MeSADP und/oder Iloprost wurde zunächst mit Prasugrel für 10 Minuten vorstimuliert und danach MeSADP und Iloprost simultan für weitere 10 Minuten hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Absaugen des Überstands und Zugabe von je 200 µl eiskaltem 96% EtOH gestoppt. Nach Verdampfen des EtOH bei 37°C im Inkubator wurden je 300 µl RIA-Puffer hinzugegeben und die Zellen bei -80°C für 48 Stunden zum Platzen gebracht. Nach Auftauen der Platten bei Raumtemperatur wurde der RIA-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Intrazelluläres cAMP wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt.

Zur Proteinbestimmung wurden je 200 µl 0,1 M NaOH in die Wells geben und für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Es wurden je 5 µl der Proben in 3-facher Ausfertigung in die Wells zweier 96-Well Platten gegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Maßstab diente eine Verdünnungsreihe eines 1:10 verdünnten Proteinstandards. Zum Schluss wurde Färbelösung (Bio Rad Protein) im Verhältnis 1:5 verdünnt und davon je 200µl pro Well hinzugegeben. Die Analyse der Proben erfolgte mit Microplate Manager[®] 4.0 Bio-Rad Laboratories bei 595/630 nm.

2.13 Anfärben von Gewebsschnitten (Immunhistochemie)

Zur Untersuchung der P2Y₁₂-Expression *in vivo* wurden Immunfärbungen an humanen Atherektomie-Proben durchgeführt, die uns mit der schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten und der Genehmigung der Ethik-Kommission der HHU freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Von den in Paraffin eingebetteten Proben wurden 3 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt, welche zunächst mit Xylol entparaffinisiert, mit Ethanol dehydriert und dann mit PBS gewaschen wurden. Eine 20-minütige Behandlung der Proben mit 3% H₂O₂ in Methanol in Dunkelheit bei Raumtemperatur diente der Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität. Die Demaskierung der Antigene erfolgte mittels 0,1 mM/L Natriumcitrat, mit 0,1 M/l Zitronensäure (pH 6) bei 96 °C für 20 Minuten. In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Präparate nun zunächst 60 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 10%FCS/1%BSA geblockt. Daraufhin wurde der Primär-Antikörper gegen P2Y₁₂ in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen anschließend dreimal 5 min in PBS-Puffer gewaschen. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Gewebsschnitte für eine Stunde in einer feuchten Kammer mit dem in BSA/PBS verdünnten Zweitantikörper-Enzym-Konjugat inkubiert und zum Schluss noch dreimal 5 Minuten gewaschen. Durch die Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper wird das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) oxidiert und es bildet sich ein braunes Präzipitat, welches in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

2.14 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen SMC

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in 96-Well Platten ausgesät. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte jeweils in Quadrupeln. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in serumfreien Medium gehalten und 6 Stunden später mit Thrombin stimuliert. 2-MeS-ADP wurde 6 Stunden nach Vorinkubation mit Thrombin hinzugefügt. Medium und Stimuli wurden nach 48 Stunden erneuert. Nach 96 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Formalin/(Para)formaldehydlösung 2 Stunden lang fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Hoechst 33342 für 15 Minuten. Die Bilder wurden in 40-facher Vergrößerung aufgenommen und die Zellkerne mittels *Image J analysis software* gezählt.

2.15 Bestimmung der DNA-Syntheserate von humanen SMC

Die Messung der DNA-Neusynthese zur Bestimmung der proliferativen Aktivität in humanen glatten Muskelzellen erfolgte mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation. Dazu wurden SMC in 24-Well Zellkulturplatten ausgesäht und nach Erreichen einer 60-70%igen Konfluenz für 24 Stunden zunächst in FCS-freiem Medium und dann weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten (insgesamt 48 h „Hungern“). Danach wurden die Zellen mit Thrombin (10nM) stimuliert. 2-MeS-ADP (1µM) wurde 6 Stunden danach hinzugefügt. Der Inhibitor R-138272 wurde jeweils 20-30 min vor der Stimulation vorinkubiert. 18-20 Stunden nach Stimulation wurde [³H]-Thymidin (Hartmann Analytics, Braunschweig) hinzugegeben. Nach insgesamt 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (1 ml pro Well) und einmal mit 10% Trichloressigsäure (TCA) gewaschen. Danach wurde die DNA durch Inkubation in 0.1M NaOH (450µl pro Well) für 1h bei RT gelöst. Die gelöste DNA (je 450µl) wurde daraufhin in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 5ml Szintillations-Cocktail versetzt. Die Radioaktivität wurde durch Flüssig-Szintillationszählung im Szintillationsdetektor 6000IC (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gemessen.

2.16 Statistik

Die Mittelwerte der Messungen aus n unabhängigen Experimenten wurden berechnet und dazugehörige Standardfehler wurden angegeben. Ein Unterschied von 0,05 wurde als signifikant erachtet ($p \geq 0,05$). Hatte ein Versuchsansatz mehr als drei zu vergleichende Versuchsgruppen, wurden die Daten mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test ausgewertet. Unterschiede zwischen zwei Messungen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem „Student’s t-Test“ ermittelt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software.

3 Ergebnisse

3.1 *P2Y₁₂-Expression in humanen glatten Muskelzellen der Vena Saphena*

Die Untersuchung der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auf humanen glatten Muskelzellen des Menschen erfolgte auf verschiedenen Ebenen. Die Untersuchung der Transkriptregulation erfolgte mittels RT-PCR. Western Blots zur Detektion von P2Y₁₂-Protein wurden mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Die Untersuchung der Proteinexpression an der Oberfläche der glatten Muskelzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.1.1 Thrombin induziert die Expression der P2Y₁₂-mRNA in humanen glatten Muskelzellen

Im atherosklerotisch veränderten Gefäß kommt es zu einer vermehrten Bildung von Thrombin. Thrombin ist ein Aktivator der Blutgerinnung, bindet aber auch an sogenannte „Protease-aktivierte Rezeptoren“ (PAR-1, -3, -4) auf glatten Muskelzellen und führt so zu einer erhöhten Mitogenese, Migration und proinflammatorischen Reaktionen. Ob die erhöhten Thrombinkonzentrationen die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors beeinflussen, war ein Schwerpunkt meiner Arbeit.

Zunächst sollte der Einfluss von Thrombin auf die P2Y₁₂-Expression auf Transkriptionsebene untersucht werden. Dies erfolgte mittels RT-PCR. Zu diesem Zweck wurden humane glatte Muskelzellen in 6-Well Platten ausgesät, bis zu einer Subkonfluenz kultiviert und anschließend für 48 Stunden in serumfreien Medium „gehungert“ um ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Im Anschluss wurden die Zellen für fünf verschiedene Zeitintervalle (1h, 3h, 6h, 16h, 24h) mit Thrombin stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen. Die Werte wurden auf GAPDH normalisiert. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, führte die Stimulation kultivierter humaner glatter Muskelzellen mit Thrombin (30nM) zu einer vorübergehenden Steigerung der mRNA-Transkription mit einem Maximum nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf das 1,5- bis 2-fache des Ausgangswertes um sich nach 24 Stunden wieder auf Werte im Ausgangsniveau zu normalisieren. Nach einer Inkubation von 6 Stunden ließ sich ein erneuter, allerdings nicht signifikanter, kurzfristiger Anstieg der Transkription beobachten.

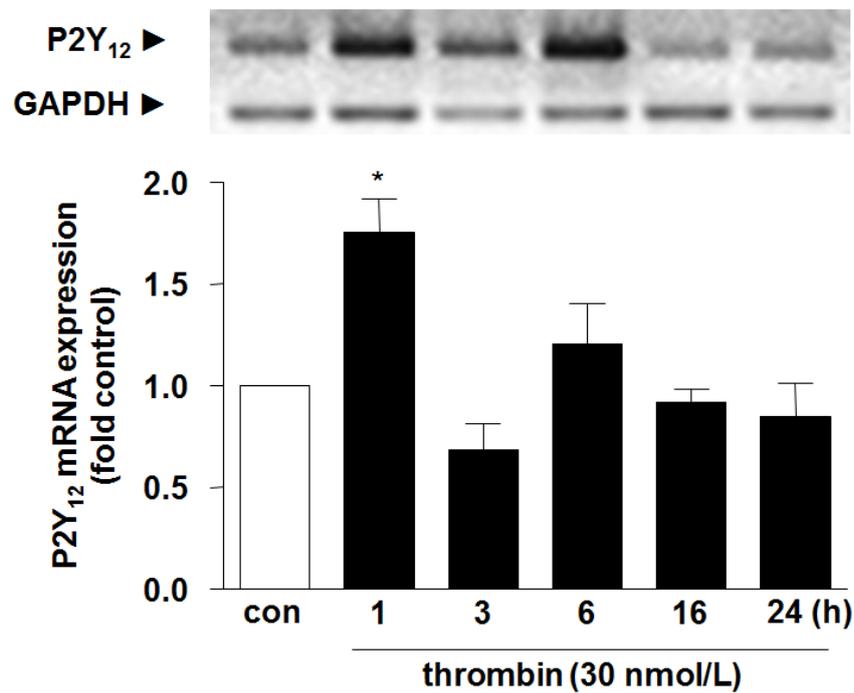


Abbildung 9 Regulation der P2Y₁₂-mRNA Expression in humanen glatten Muskelzellen durch Thrombin

Repräsentative Gelelektrophorese mit zugehöriger GAPDH Kontrolle und quantitative Auswertung der PCRs (n=6). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte glatte Muskelzellen. P2Y₁₂ wurde auf GAPDH normalisiert. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (3U/ml) erfolgte für fünf verschiedene Zeitintervalle über einen Zeitraum von 24 Stunden und führte zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression mit einem Maximum nach 1 Stunde und einem zweiten nicht signifikanten Anstieg nach 6 Stunden. (*p<0,05, n=6)

3.1.2 Thrombin induziert die P2Y₁₂-Protein-Expression in humanen glatten Muskelzellen

Zur Detektion von P2Y₁₂-Protein wurden Western Blots mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. In diesen markierte der gleiche Antikörper sowohl in Plättchen als auch in humanen glatten Muskelzellen mehrere Banden, bei denen es sich um verschieden glykosylierte Formen des Rezeptors handeln könnte [44, 54]. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden zu den Zeitpunkten 1,3,6,16 und 24 Stunden mit Thrombin stimuliert. Die eingesetzte Konzentration entsprach den unter physiologischen Bedingungen bei der Bildung von Thromben freigesetzten Thrombin-Konzentrationen von 3 U/ml. Die detektierten Banden wurden auf β -Aktin normalisiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen. Als Positivkontrolle wurden Lysate aus humanen Plättchen eingesetzt.

3.1.2.1 Detektion des P2Y₁₂-Rezeptors durch einen Antikörper gegen die extrazellulären Aminosäurereste 125-142 mit einem N-terminalen Zystein als Immunogen (P4871)

Western Blots mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des P2Y₁₂-Rezeptors zeigten eine deutliche Hochregulation der Expression des P2Y₁₂-Rezeptorproteins in humanen glatten Muskelzellen nach deren Stimulation mit Thrombin. Der Antikörper markierte sowohl in Plättchenlysaten als auch in Lysaten von humanen glatten Muskelzellen mehrere Banden zwischen 56 und 72 kDa, was sich mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen deckt. In früheren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass der gereinigte P2Y₁₂-Rezeptor in der SDS-PAGE eine diffuse Bande bei ca. 42-52 kDa [54] bzw. 64 kDa [44] zeigt und die Behandlung mit einer N-Glykosidase oder dem N-Glykosidaseinhibitor Tunicamycin zu einer weniger diffusen und schneller wandernden Bande bei etwa 42kDa führt [44, 54]. Die statistische Analyse zeigte bereits nach 1 Stunde einen Anstieg des P2Y₁₂-Proteins, der im Verlauf weiterhin kontinuierlich zunahm. Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Stimulation mit Thrombin ließ sich eine signifikante Hochregulierung von P2Y₁₂ auf das 2- bis 3- fache des Ausgangswertes beobachten, welche über 16 Stunden erhalten blieb um nach 24 Stunden wieder leicht abzunehmen. Dennoch blieb die Steigerung der Proteinmenge über die gesamten 24 Stunden deutlich erhöht (Abb.10).

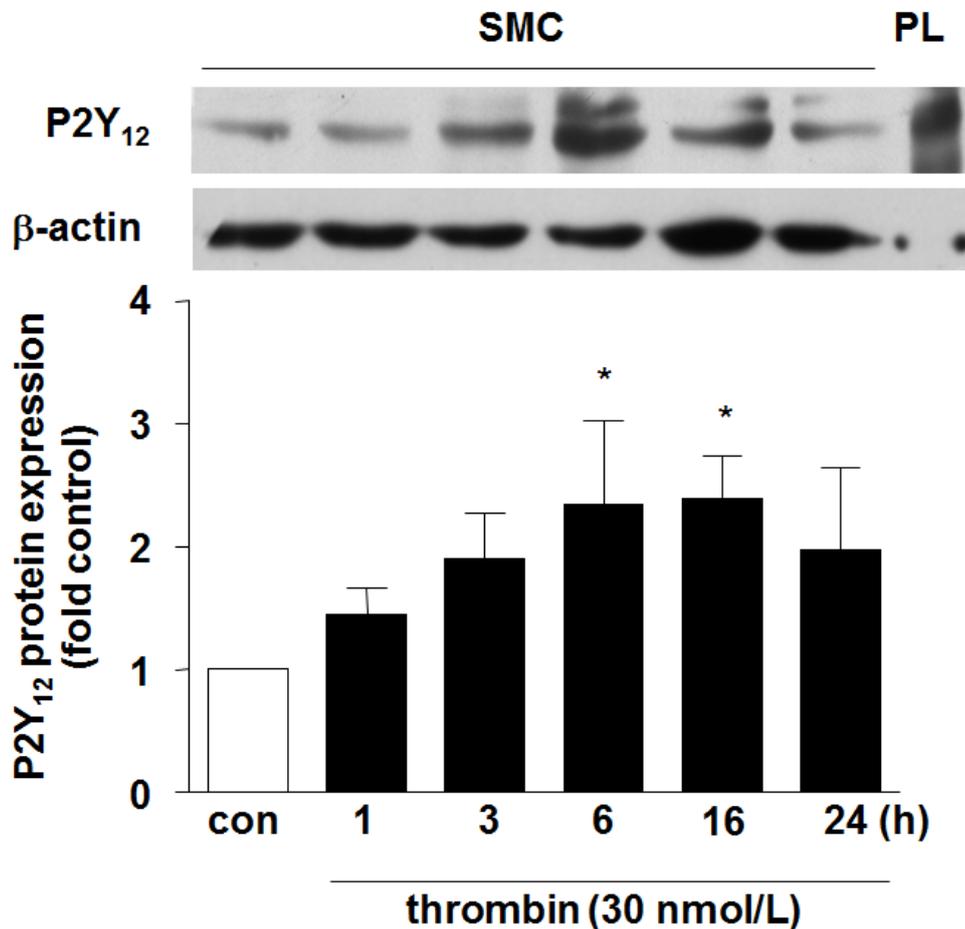


Abbildung 10 Einfluss von Thrombin auf die Proteinexpression des P2Y₁₂-Rezeptors in humanen glatten Muskelzellen

Repräsentativer Western Blot mit zugehöriger β-Aktin Kontrolle und quantitative Auswertung der Westernblots (n=6). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte glatte Muskelzellen. Als Positivkontrolle dienten humane Plättchenlysate. P2Y₁₂ wurde gegen β-Aktin normalisiert. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (3U/ml) erfolgte zu fünf verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 24 Stunden und führte zu einer signifikanten Steigerung der Proteinexpression mit einem Maximum nach 6 Stunden. Dieser Effekt blieb über 24 Stunden erhalten. (*p<0,05, n=6)

3.1.2.2 Detektion des P2Y₁₂-Rezeptors durch einen Antikörper gegen die dritte zytoplasmatische Schleife des P2Y₁₂ Rezeptors (P6997)

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit dem ersten Antikörper wurden durch Western Blots mit einem Antikörper gegen ein intrazelluläres Epitop des P2Y₁₂-Rezeptors bestätigt. Diese ließen ebenfalls eine deutliche Aufregulation des P2Y₁₂-Rezeptorproteins in humanen glatten Muskelzellen durch Thrombin erkennen. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, begann die Proteinmenge bereits 1 Stunde nach Zugabe von Thrombin zu steigen und erreichte nach 3 Stunden das 2 bis 3-fache des Ausgangswertes (nicht signifikant). Nach 6 Stunden ließ sich eine signifikante Steigerung der Proteinexpression beobachten, die über 24 Stunden anhielt und dort mit Werten um das 3 bis 4-fache des Ausgangsniveaus ihr Maximum zu erreichen. Die Thrombin-induzierte Expression von P2Y₁₂-mRNA war mit einer verstärkten Expression von P2Y₁₂-Protein nach 6 Stunden Stimulation assoziiert und dieser Effekt wurde über 24 Stunden beibehalten.

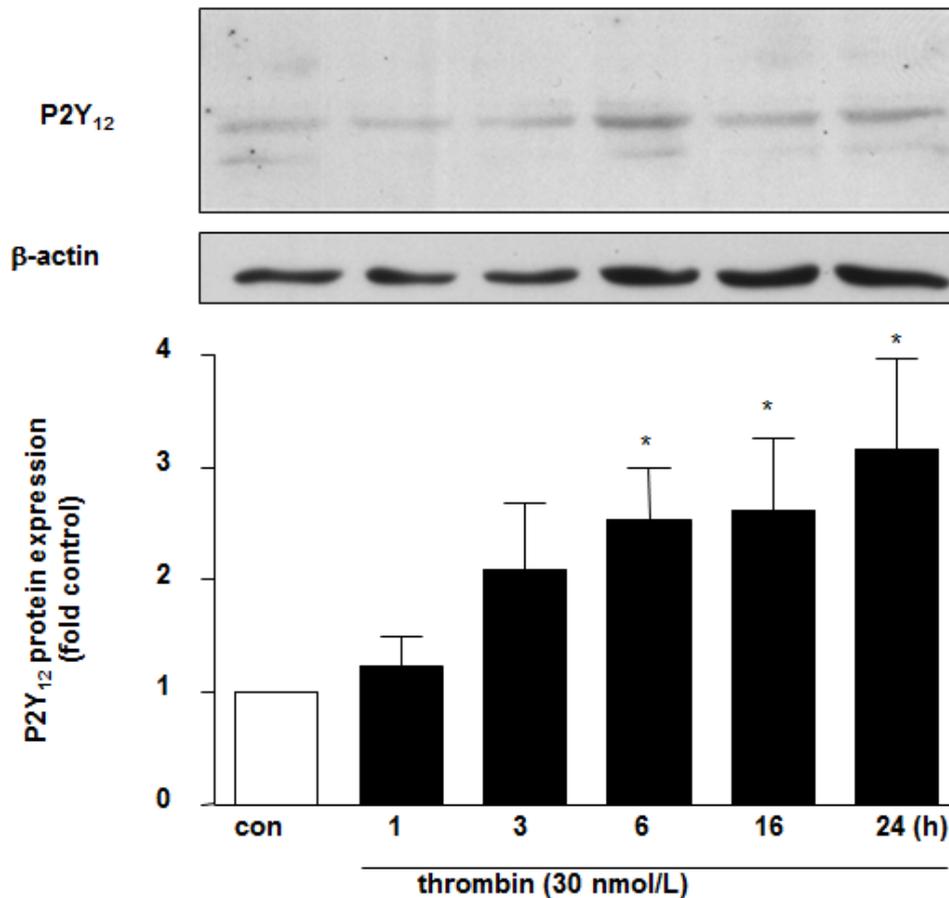


Abbildung 11 Einfluss von Thrombin auf die Proteinexpression des P2Y₁₂-Rezeptors in humanen glatten Muskelzellen

Repräsentativer Western Blot mit zugehöriger β-Aktin Kontrolle und quantitative Auswertung der Westernblots (n=8). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte glatte Muskelzellen. Als Positivkontrolle dienten humane Plättchenlysate (nicht abgebildet). P2Y₁₂ wurde gegen β-Aktin normalisiert. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (3U/ml) erfolgte für 1,3,6,16 und 24 Stunden und zeigte eine kontinuierliche signifikante Steigerung der Proteinexpression über den gesamten Zeitraum mit einem Maximum nach 24 Stunden. (*p<0,05, n=8)

3.1.3 Thrombin induziert die P2Y₁₂-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche von humanen glatten Muskelzellen

Ergänzend zu den Untersuchungen auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgte die Detektion des P2Y₁₂-Rezeptors auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden humane glatte Muskelzellen wie für die Immunoblot-Analyse in 6-Well Platten ausgesät, bis zu einer Subkonfluenz kultiviert, für 48 Stunden in serumfreien Medium „gehungert“ und für fünf verschiedene Zeitintervalle (1h, 3h, 6h, 16h, 24h) mit Thrombin stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen. Für die Isotyp-Kontrolle wurde unspezifisch bindender Anti-rabbit-IgG verwendet. Das Histogramm in Abbildung 12 zeigt eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals humaner glatter Muskelzellen nach einer 6-stündigen Stimulation mit Thrombin im Vergleich zu Kontrolle und Isotypenkontrolle.

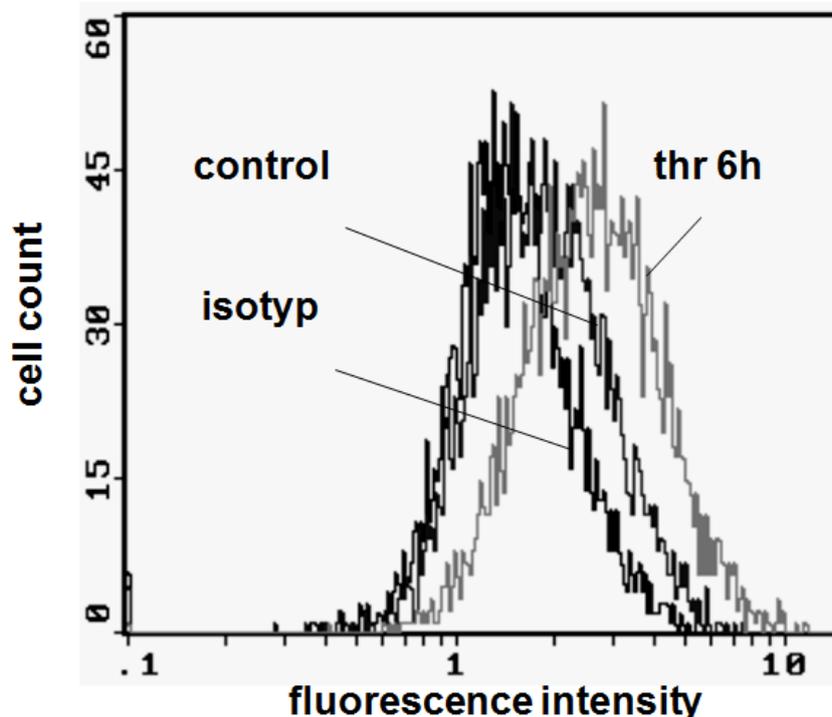


Abbildung 12 Thrombin induziert die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors an der Zelloberfläche humaner glatter Muskelzellen

Repräsentatives Histogramm durchflusszytometrischer Messungen (n=8). Abgebildet sind Isotypenkontrolle (*isotyp*), Expressionslevel unstimulierter Zellen (*control*) und Expressionslevel nach 6-stündiger Stimulation mit Thrombin (30nM) (*thr 6h*). Zellzahl (*cell count*), Fluoreszenzintensität (*fluorescence intensity*)

Die quantitative Auswertung der Durchflusszytometrie ergab eine signifikante Steigerung der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auf der Gefäßmuskelzelle 6 Stunden nach der Stimulation der Zellen mit Thrombin (30nM). Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, blieb diese Hochregulation auch nach 16 und 24 Stunden erhalten.

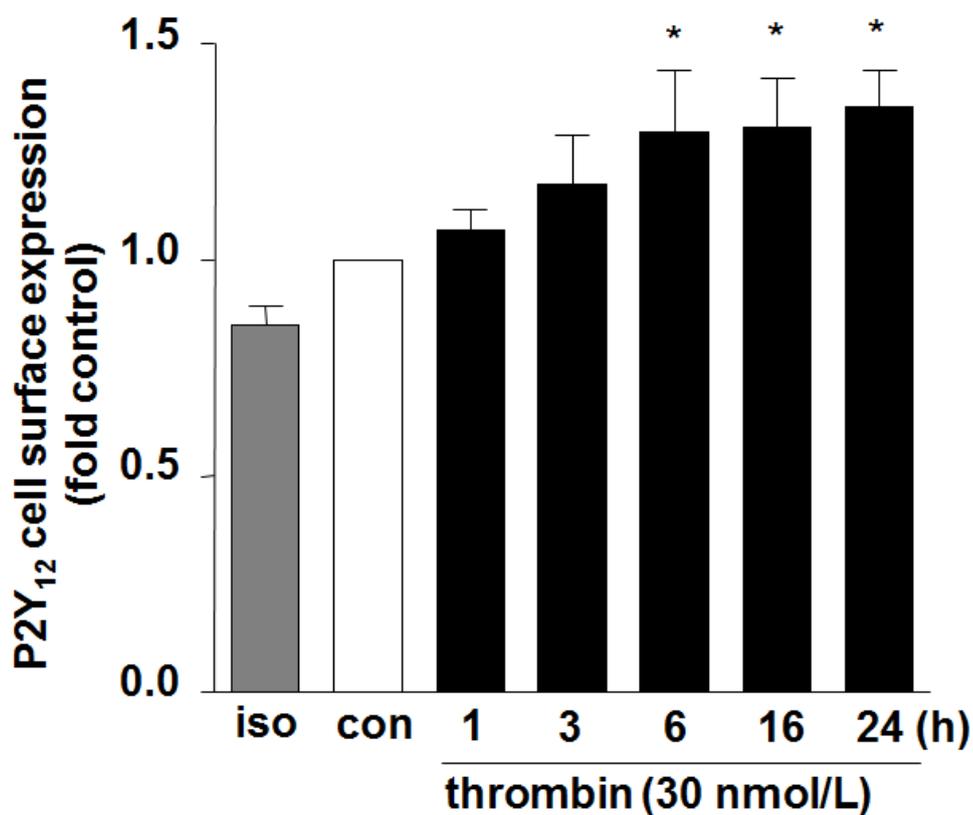


Abbildung 13 Regulation der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors an der Oberfläche humaner glatter Muskelzellen durch Thrombin

Quantitative Auswertung der Durchflusszytometrie (n=8), Zelloberflächenexpression von P2Y₁₂ im Zeitverlauf über 24 Stunden. Stimulation humaner glatter Muskelzellen mit Thrombin (30nM) zu fünf verschiedenen Zeitpunkten führte zu einer signifikanten Hochregulation von P2Y₁₂ auf der Zelloberfläche nach 6 Stunden. Dieser Effekt blieb über 24 Stunden erhalten. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte glatte Muskelzellen (con). Isotypenkontrolle (iso). (*p<0,05, n=8)

3.1.4 Die Induktion von P2Y₁₂-Expression wird über PAR vermittelt

Die Serin-Protease Thrombin ist neben ihrer Rolle als einer der Hauptaktivatoren der Gerinnungskaskade auch als mitogener und proliferativer Stimulus für glatte Gefäßmuskelzellen bekannt [93]. Durch seine proteolytische Aktivität aktiviert Thrombin die „Protease aktivierten Rezeptoren“ PAR-1, PAR-3 und PAR-4 auf der Zelloberfläche von Thrombozyten. In dieser Arbeit wurde erstmals der direkte Einfluss von Thrombin auf die P2Y₁₂-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Bei den Versuchen wurde eine Thrombinkonzentration von 3 U/ml (30 nM) eingesetzt, da sie der Konzentration entspricht, die unter physiologischen Bedingungen bei der Bildung von Thromben entsteht [93].

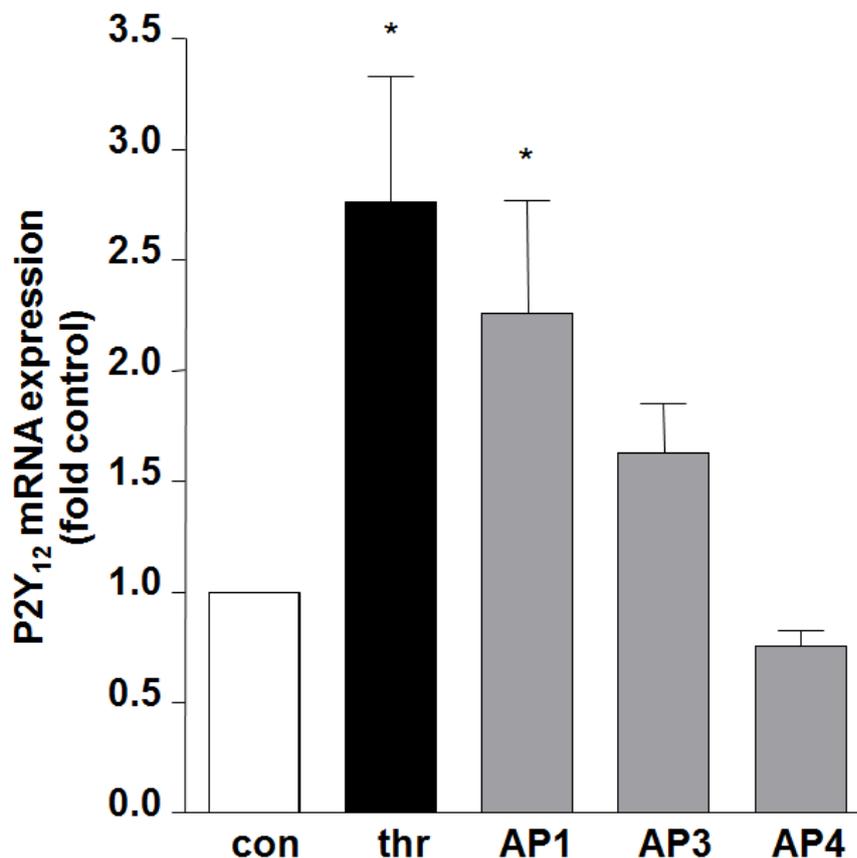


Abbildung 14 P2Y₁₂-mRNA Expression nach Stimulation humaner glatter Muskelzellen mit aktivierenden Peptiden (AP) für PAR-Rezeptoren und Thrombin

Quantitative Auswertung der Real-time PCR (n=6). P2Y₁₂-mRNA wurde durch TaqMan® Real-time PCR gemessen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte glatte Muskelzellen. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (3nmol/L) und spezifischen AP für PAR-1, -3 und -4 (100 µmol/L) erfolgte für 1 Stunde, und führte zu einer signifikanten Steigerung der mRNA Expression. Dieser Effekt wurde durch AP1 nachgeahmt. (*p<0,05, n=6)

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Steigerung der P2Y₁₂-mRNA-Expression auf die PAR-Rezeptor aktivierenden Eigenschaften des Thrombins zurückzuführen ist, wurden spezielle aktivierende Peptide für PAR-1,3,4e (AP 1,3,4) eingesetzt. Die Exposition von humanen glatten Muskelzellen mit AP 1,3 und 4 (je 100µmol/L) über 1 Stunde zeigte, dass das Ansprechen auf Thrombin durch AP1 und AP3 nachgeahmt wurde, wobei AP1 als einziges Peptid einen signifikanten Effekt zeigte. Thrombin-induzierte proinflammatorische und mitogenetische Reaktionen in vaskulären Zellen werden durch Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 vermittelt. Diese Daten zeigen, dass in hSMC die P2Y₁₂-mRNA-Expressionssteigerung überwiegend durch den Thrombin Rezeptor PAR-1 vermittelt ist (Abb. 14).

3.2 P2Y₁₂-Expression in arteriellen glatten Muskelzellen humaner Aorta

Da es sich bei der Koronaren Herzkrankheit um die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien handelt, und die Arteriosklerose eine chronisch entzündliche Erkrankung vornehmlich der mittelgroßen und großen elastischen und muskulären Arterien ist [8] wurden ergänzende Untersuchungen mit humanen arteriellen glatten Muskelzellen der Aorta durchgeführt.

3.2.1 Thrombin induziert die P2Y₁₂-Protein Expression in arteriellen humanen glatten Muskelzellen der Aorta

Die Ergebnisse aus humanen glatten Muskelzellen der *Vena Saphena* wurden an humanen glatten Muskelzellen der Aorta bestätigt und zeigen, dass sowohl arterielle wie auch venöse humane glatte Muskelzellen nach Thrombinstimulation eine gesteigerte P2Y₁₂-Expression zeigen. Die Induktion der P2Y₁₂-Expression durch Thrombin wurde ebenfalls in humanen glatten Muskelzellen der Aorta beobachtet. Die Immunoblot Analyse bestätigte eine deutliche 2- bis 3- fache Hochregulierung von P2Y₁₂ nach 6 Stunden Stimulation mit Thrombin. Als Kontrolle dienten unstimulierte humane arterielle glatte Muskelzellen (Abb.15).

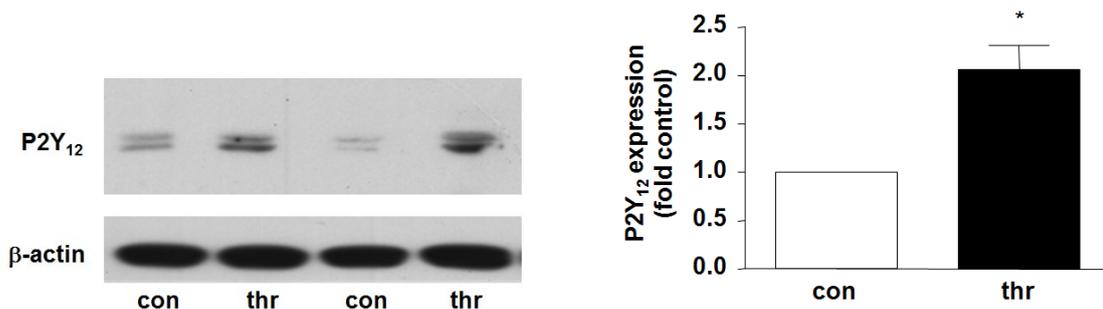


Abbildung 15 Einfluss von Thrombin auf die Proteinexpression des P2Y₁₂-Rezeptors in arteriellen humanen glatten Muskelzellen der Aorta

links: Repräsentativer Western Blot mit zugehöriger β-Aktin Kontrolle. Als Kontrolle dienen unstimulierte humane glatte Muskelzellen der Aorta (Con), Dargestellt ist die Hochregulation von P2Y₁₂ in arteriellen glatten Muskelzellen nach 6-stündiger Stimulation mit Thrombin (thr)

rechts: Quantitative Auswertung der Western Blots (n=8), Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, die Werte wurden auf β-Aktin normalisiert. Thrombinstimulation über 6 Stunden führte zu einer signifikanten Steigerung der P2Y₁₂-Proteinexpression auf das 2 bis 2,5-fache des Ausgangswertes.

3.3 Thrombin induzierter P2Y₁₂-Rezeptor moduliert cAMP-Spiegel in humanen glatten Muskelzellen

Die Signaltransduktion des G_i-Protein gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors erfolgt mittels Inhibition der Adenylatzyklase und daraus resultierender Reduktion der Plasmalevel von cAMP in Plättchen. Folglich untersuchten wir den möglichen Effekt der thrombin-induzierten P2Y₁₂-Expression auf die cAMP-Spiegel in humanen glatten Muskelzellen. Um die endogene Aktivität von Prostaglandinen zu imitieren, von denen angenommen wird, dass sie zu den Antiplättchen-Effekten der P2Y₁₂-Inhibition *in vivo* beitragen, wurde intrazelluläres cAMP durch Stimulation mit dem Prostacyclin Analogon Iloprost (1nM) angehoben. Der spezifische P2Y₁- und P2Y₁₂-Agonist 2-MeSADP (1µM) [94, 95] senkt über Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor via G_i-Protein und Hemmung der Adenylatzyklase die cAMP-Spiegel. Prasugrel (10µM) hemmt die Wirkung von ADP am P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel und verhindert die ADP-induzierte Reduktion der cAMP-Spiegel. Da Prasugrel als Prodrug zur Aktivierung einer hepatischen Metabolisierung bedarf, wurde für die Zellkulturexperimente der aktive Metabolit R-138727 eingesetzt. Die Zellen wurden wie in 2.12 beschrieben stimuliert (Abb.16).

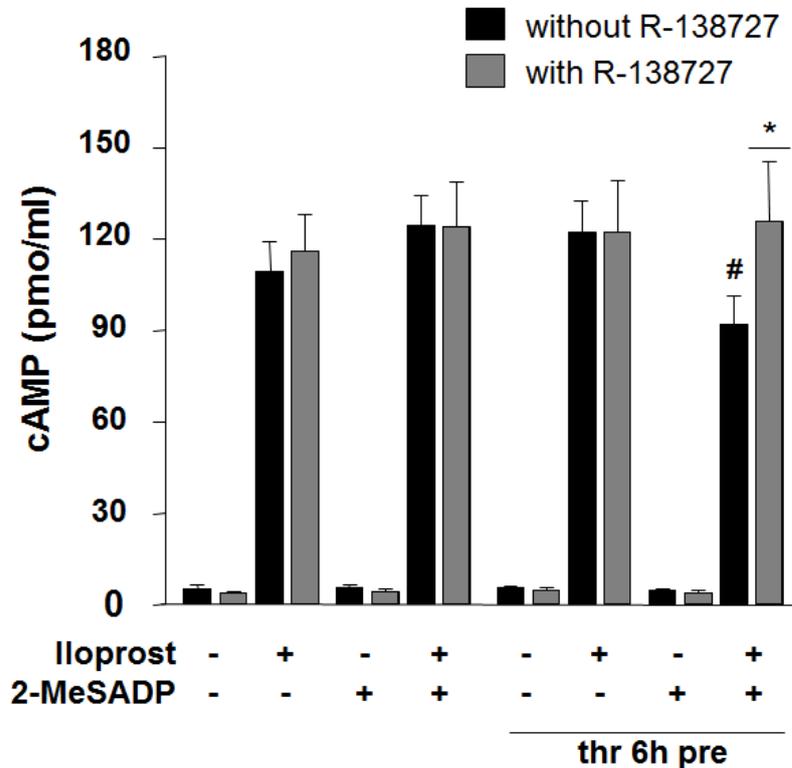


Abbildung 16 Thrombin-induzierter P2Y₁₂ moduliert die cAMP-Level in humanen glatten Muskelzellen

Durch Iloprost wurden die cAMP-Spiegel angehoben, um den Effekt von endogenem Prostazyklin zu imitieren. In Zellen, die für 6 Stunden mit Thrombin vorbehandelt wurden, konnte der selektive P2Y-Agonist 2-Methylthio-ADP die cAMP Spiegel signifikant reduzieren. Dieser Effekt konnte durch den selektiven P2Y₁₂-Antagonisten R-138727 unterdrückt werden (*p<0,05, wie bezeichnet), (#p<0,05 Ilo+Thr vs. Ilo+Thr+2-MeSADP)

In Zellen die für 6 Stunden mit Thrombin vorbehandelt wurden reduzierte der P2Y-Agonist 2-MeSADP die cAMP Spiegel bis zu 25% (Abb. 16). Das wurde durch den spezifischen Antagonisten R-138727 verhindert, was auf eine P2Y₁₂-vermittelte Reduktion der cAMP-Spiegel durch G_i Protein hinweist. Die funktionelle Bedeutung der Hemmung der cAMP-Spiegel durch thrombin-induzierte P2Y₁₂-Expression, wie zum Beispiel sekretorische Funktionen der glatten Muskelzellen in Arteriosklerose-Plaques muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.4 Thrombin induzierter P2Y₁₂-Rezeptor fördert die DNA-Synthese und Proliferation von humanen glatten Muskelzellen

Eine wichtige Funktion von Thrombin ist die Stimulation der SMC-Proliferation. Um die funktionelle Bedeutung der thrombin-induzierten P2Y₁₂-Expression in humanen glatten Muskelzellen zu erforschen, wurde die DNA Synthese mittels Inkubation der humanen glatten Muskelzellen mit Tritiumthymidin gemessen. In Zellen, die nicht mit Thrombin vorbehandelt waren, wurde die mitogenetische Antwort durch simultane Zugabe von 2-MeSADP und Thrombin nicht verändert. Allerdings war die DNA-Synthese signifikant verstärkt, wenn 2-MeSADP nach einer 6-stündigen Vorbehandlung der Zellen mit Thrombin hinzugegeben wurde. Diese 2-MeSADP induzierte Steigerung der Mitogenese wurde durch den P2Y₁₂-Antagonisten R-138272 verhindert, welcher allein keinen Effekt auf die Mitogenese der humanen glatten Muskelzellen hat. Ein ähnlich inhibitorischer Effekt wurde mit einem anderen selektiven P2Y-Rezeptor-Antagonisten beobachtet, 2-Methylthio-AMP.

Diese Daten legen nahe, dass eine thrombin-induzierte Steigerung der P2Y₁₂-Rezeptor-Expression die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen fördert.

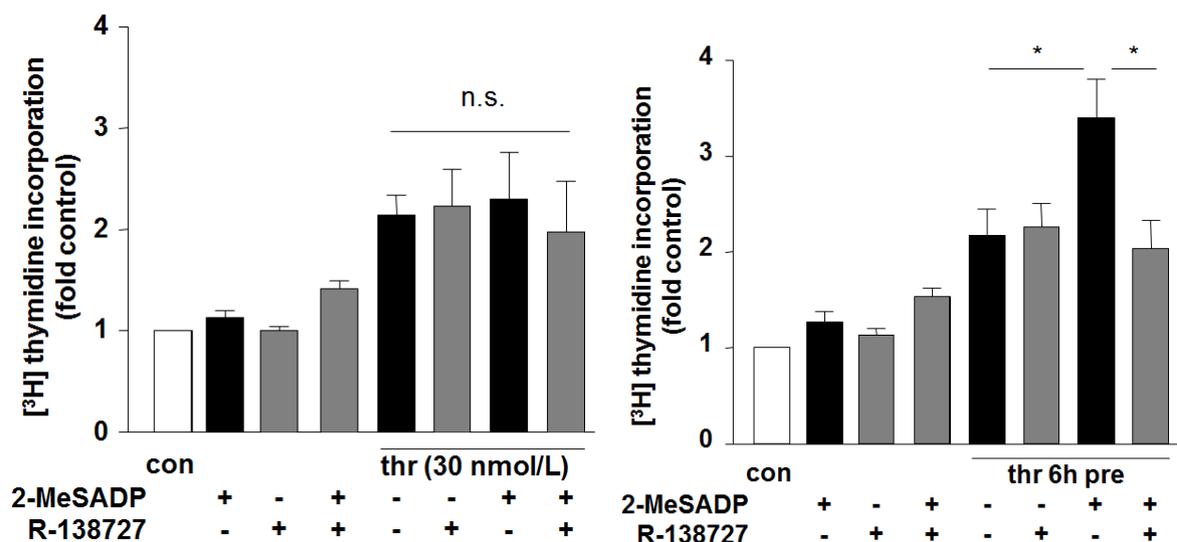


Abbildung 17 Thrombin-induzierte Mitogenese in humanen glatten Muskelzellen

Bestimmung der DNA-Syntheserate durch die Inkorporation von [³T]thymidin. Zellen wurden mit 2-MeSADP (1µmol/L), R-138272 (10µmol/L) und Thrombin (30nmol/L) über einen Stimulationszeitraum von 24h inkubiert. Links ohne, rechts mit 6h Vorinkubation mit Thrombin. (*p<0,05, n=6)

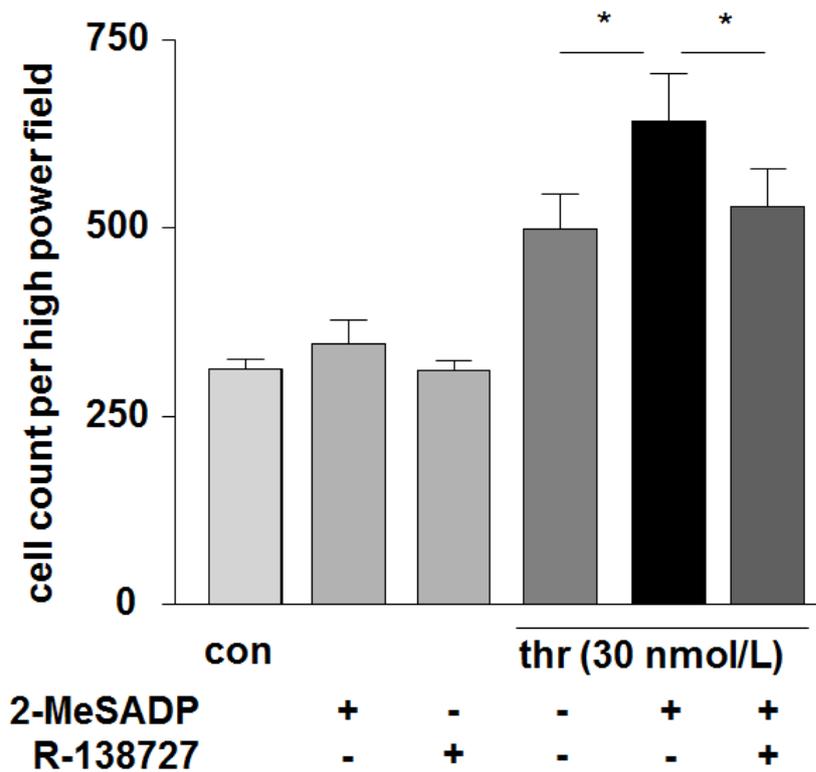


Abbildung 18 Steigerung der Anzahl von hSMC durch Stimulation mit Thrombin über 4 Tage

Inkubation der Zellen mit 2-MeSADP (1µmol/L), R-138727 (10µmol/L) und Thrombin (30nmol/L). Auszählung der Zellzahl (*cell count*) im Hauptgesichtsfeld (HPF, *high power field*) nach 4 Tagen Inkubation. (*p<0,05, n=4)

Die Steigerung der DNA-Synthese von mit Thrombin vorbehandelten hSMC nach Stimulation mit 2-MeSADP resultierte außerdem nach 4 Tagen in einer erhöhten Zellzahl (Abb.18).

3.5 P2Y₁₂-Expression in humanen Karotisplaques

Um zu ermitteln, ob der P2Y₁₂-Rezeptor auch *in vivo* in humanen glatten Muskelzellen exprimiert ist, wurden Karotisplaques von Patienten, die sich einer Thrombendarteriektomie unterzogen hatten, auf P2Y₁₂-Expression untersucht. Herr Andreas Böhm fertigte dazu eine P2Y₁₂-spezifische Immunfärbung der Karotisplaques an, welche uns freundlicherweise von Professor Fischer zur Verfügung gestellt wurden. Es wurde mit demselben Antikörper gearbeitet, der zuvor auch schon bei den Immunoblots verwendet wurde.

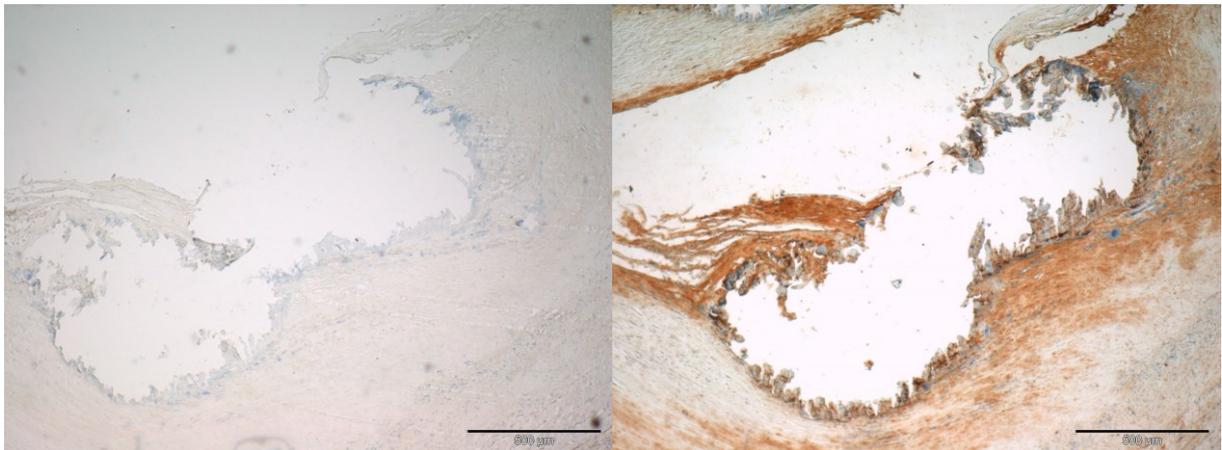


Abbildung 19 Immunhistochemische Färbung humaner Karotisplaques nach Endarteriektomie (40x)

Der linke Gewebsschnitt diente als Isotyp-Kontrolle für unspezifische Färbung. Er wurde mit unspezifischem IgG-Antikörper und HRP-konjugiertem anti-rabbit Sekundäntikörper behandelt. Die rechte Abbildung zeigt einen mit P2Y₁₂-Antikörper und HRP-konjugiertem anti-rabbit Sekundäntikörper behandelten Schnitt. Der P2Y₁₂-Rezeptor wird durch bräunliche Färbung sichtbar. Die Plaques sind in 40-facher Vergrößerung dargestellt.

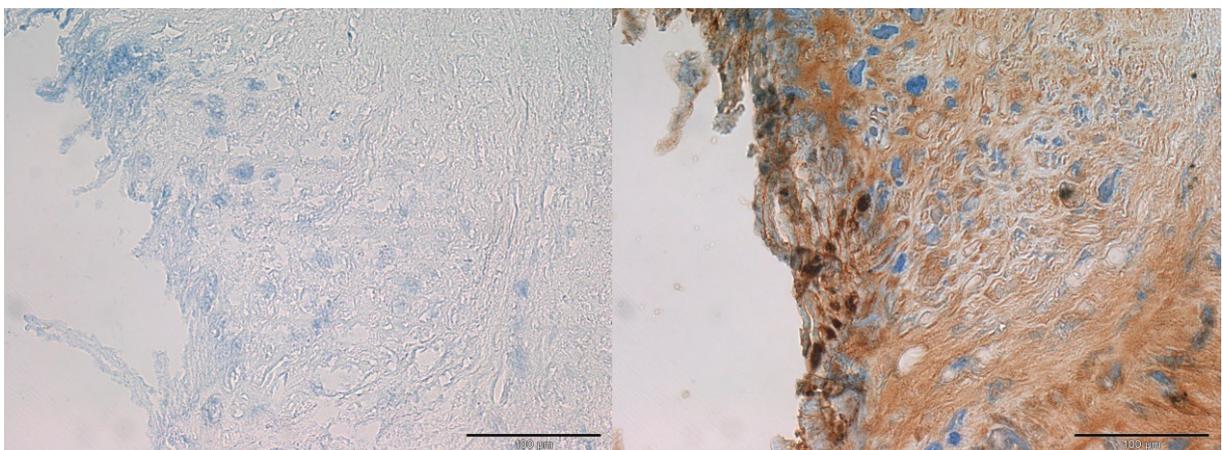


Abbildung 20 Immunhistochemische Färbung humaner Karotisplaques nach Endarteriektomie (10x)

Darstellung der Gewebsschnitte in 100-facher Vergrößerung. Links ist die Isotyp-Kontrolle abgebildet. Auf der rechten Abbildung ist die braune, P2Y₁₂-spezifische Immunfärbung zu erkennen.

In Abbildung 19 ist die deutliche Braunfärbung des P2Y₁₂-Rezeptors im atherosklerotischen Gewebe zu erkennen. Des Weiteren wurde in atherosklerotischen Plaques von 10 verschiedenen Patienten durch spezifische Immunfärbung der P2Y₁₂-Rezeptor nachgewiesen.

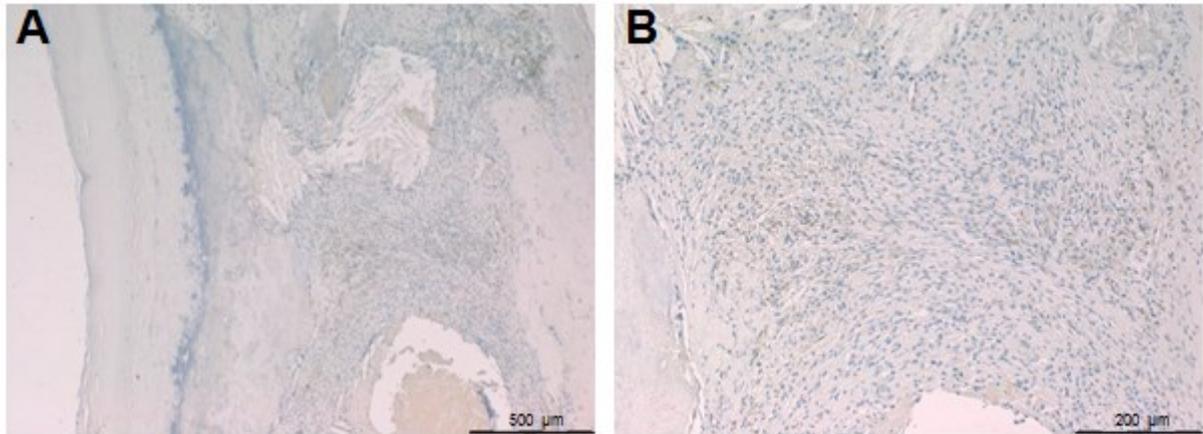


Abbildung 21 Isotyp-Kontrolle

Abb. A zeigt einen Schnitt durch einen Karotisplaque in 40-facher Vergrößerung. Abb. B zeigt einen Ausschnitt in 100-facher Vergrößerung. Beide Schnitte wurden mit unspezifischem IgG- und HRP-konjugiertem-Antikörper behandelt, um die unspezifische Färbung als Kontrolle für die darauffolgende spezifische Färbung darzustellen.

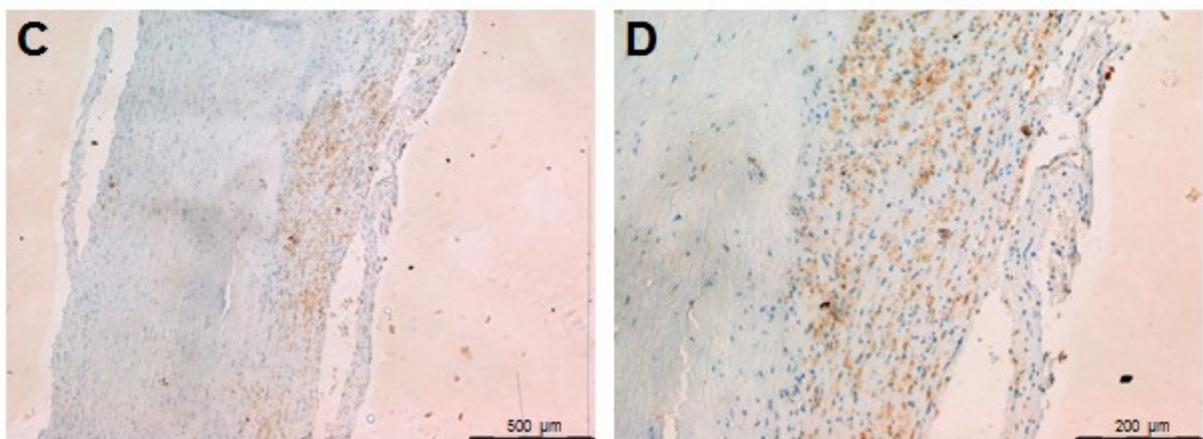


Abbildung 22 P2Y₁₂-spezifische Immunfärbung

C: 40-fache Vergrößerung, P2Y₁₂ (braun), D: 100-fache Vergrößerung, P2Y₁₂ (braun)

Es wurde eine Co-Lokalisation mit TF- und M-Aktin beobachtet. Das deutet darauf hin, dass Tissue Faktor tragende glatte Muskelzellen Quelle und Ziel der thrombin-induzierten P2Y₁₂-Expression sind.

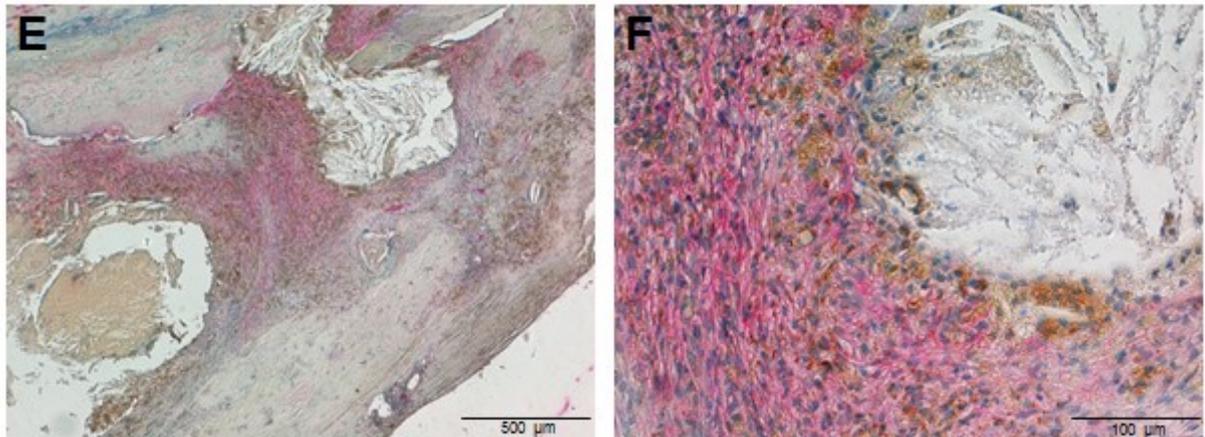


Abbildung 23 Co-Lokalisation von P2Y₁₂ und M-Aktin

Als Marker für hSMC wurden die Schnitte in Abbildung E und F für M-Aktin (rot) angefärbt. Durch gleichzeitige Färbung des P2Y₁₂-Rezeptors (braun) lässt sich eine Co-Lokalisation mit M-Aktin exprimierenden Zellen (hSMC) erkennen.

Für CD42 und CD68 wurde daraufhin ebenfalls eine spezifische Immunfärbung angefertigt (nicht abgebildet), jedoch keine Immunfärbung beobachtet und somit die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die beobachtete P2Y₁₂ Expression aus anderen Quellen, wie Plättchen oder Makrophagen stammt.

Weil der Beginn der Thrombinbildung streng abhängig von dem Vorhandensein des Tissue Faktors ist, und in atherosklerotischen Plaques eine verstärkte Expression des Tissue Faktors beobachtet wurde, wurde das Gewebe der atherosklerotischen Plaques aus humaner *Arteria Carotis* auch auf Tissue Faktor angefärbt. Tissue Faktor Expression ließ sich in zellreichen Arealen und war mit M-Aktin co-lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurde für den Plättchen Marker CD 42 in P2Y₁₂-positiven Plaque-Arealen keine Anfärbung beobachtet, was darauf hinweist, dass das nachgewiesene P2Y₁₂ Protein nicht aus Plättchen stammt und nahelegt, dass Tissue Faktor tragende Gewebe unter den humanen glatten Muskelzellen die Hauptquelle für die Thrombin-induzierte P2Y₁₂ Hochregulation ist.

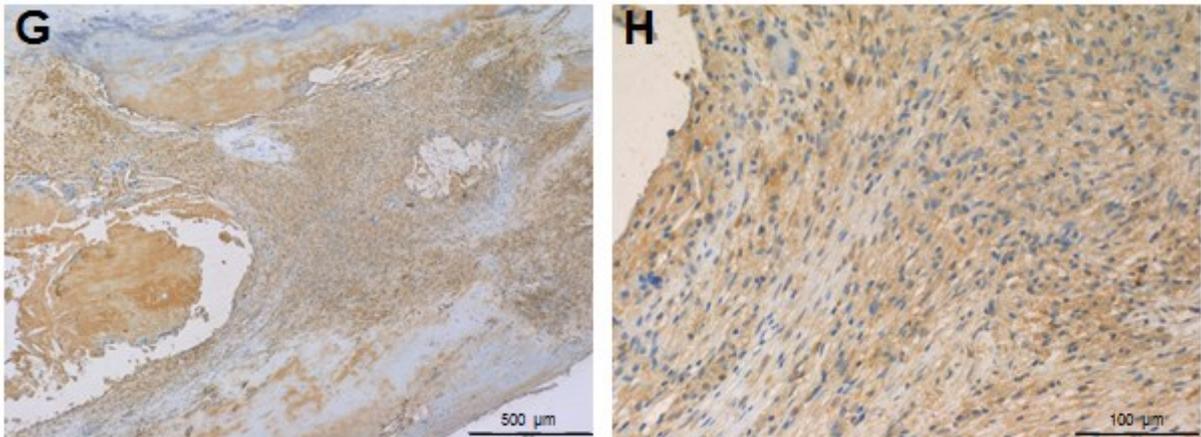


Abbildung 24 Tissue Faktor

Plaques aus humaner *Arteria Carotis* wurden auf Tissue Faktor angefärbt. Tissue Faktor Expression ließ sich in zellreichen Arealen immunhistochemisch nachweisen (braun). G: 40x, H 400x.

Interessanterweise scheint die P2Y₁₂-Expression an Orten von Gefäßschäden lokal konzentriert zu sein. Wie Abbildung 23E und F zeigt, sah man intensive Signale in der Nähe eines Nekrosezentrums. Diese lokal gesteigerte P2Y₁₂-Expression könnte durch die lokal erhöhte Thrombin Produktion an instabilen Plaques bedingt sein. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ließ sich eine Anreicherung mit Tissue Faktor an der verletzlichen Oberfläche der Plaques beobachten, das heißt, an dem Ort wo die Thrombin-Bildung stattfindet.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Stimulation von humanen glatten Muskelzellen (hSMC) mit Thrombin resultierte in einer gesteigerten Expression von P2Y₁₂-mRNA, totalem zellulären P2Y₁₂-Protein und Expression des P2Y₁₂-Rezeptors an der Zelloberfläche. Thrombin-induzierte proinflammatorische und mitogenetische Reaktionen in vaskulären Zellen werden durch Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, -3 und -4 vermittelt. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass überwiegend der Thrombin Rezeptor PAR-1 daran beteiligt ist. Immunoblot Analyse bestätigte eine deutliche 2- bis 3- fache Hochregulierung von P2Y₁₂ nach 6 Stunden Stimulation mit Thrombin, welche über 24 Stunden erhalten blieb. Dieses Ergebnis wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern erzielt, die entweder ein extrazelluläres oder ein intrazelluläres Epitop des P2Y₁₂-Rezeptors nachwies. Die Ergebnisse aus hSMC der *Vena Saphena* wurden mit hSMC der Aorta bestätigt und zeigen, dass sowohl arterielle wie auch venöse humane glatte Muskelzellen nach Thrombinstimulation eine gesteigerte P2Y₁₂-Expression zeigen. Humane Karotisplaques von Patienten, die sich einer Thrombendariektomie unterzogen hatten, wurden analysiert und auf die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors *in vivo* untersucht. In allen Proben der atherosklerotischen Plaques wurde der P2Y₁₂-Rezeptor mit einer spezifischen Immunfärbung nachgewiesen und eine Co-Lokalisation mit TF- und M-Aktin beobachtet. Das deutet darauf hin, dass TF tragende glatte Muskelzellen Quelle der thrombin-induzierten P2Y₁₂-Expression sind. Die P2Y₁₂-Expression scheint an Orten von Gefäßschäden konzentriert zu sein. Thrombin-induzierter P2Y₁₂ moduliert die cAMP-Spiegel in humanen glatten Muskelzellen. Nur in Zellen, die mindestens für 6 Stunden mit Thrombin vorbehandelt wurden, konnte der selektive P2Y-Agonist 2-Methylthio-ADP die cAMP-Spiegel signifikant reduzieren. Dieser Effekt konnte durch den selektiven P2Y₁₂-Antagonisten R-138727, dem aktiven Metaboliten von Prasugrel, unterdrückt werden, was darauf hinweist, dass die Inhibition von cAMP nach Hochregulierung von P2Y₁₂ durch Thrombin G_i-vermittelt ist. 2-MeSADP induzierte nach einer 6-stündigen Vorbehandlung der Zellen mit Thrombin in SMC die Steigerung der Mitogenese. Dieser Effekt wurde durch den P2Y₁₂-Antagonisten R-138272 verhindert. Ein ähnlich inhibitorischer Effekt wurde mit einem anderen selektiven P2Y-Rezeptor-Antagonisten beobachtet, 2-Methylthio-AMP. Die thrombin-induzierte Steigerung der P2Y₁₂-Rezeptor-Expression scheint also die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen zu fördern.

4 Diskussion

Die Arteriosklerose ist ein diffuser pathologischer Prozess, der strukturelle Veränderungen in der Intima und Media arterieller Gefäße beinhaltet, angetrieben durch Lipidansammlung, Entzündung und SMC Migration. Obwohl diese Plaques lange klinisch stumm sein können, sind sie anfällig für eine Ruptur oder Erosion, besonders in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. In der Folge kommt es zu Plättchenaktivierung und -aggregation, welche zu einem akuten thrombotischen Ereignis führt. Durch ein solches Ereignis wird ein zuvor stabiles Krankheitsbild schnell akut lebensbedrohlich, insbesondere bei Erkrankung der Herzkranz- oder Zerebralarterien. Um solchen dramatischen Ereignissen vorzubeugen, hat sich die Therapie der KHK-Patienten mit Antiplättchen-Substanzen bewährt. Clopidogrel ist ein selektiver P2Y₁₂-Antagonist. Seine gute Wirksamkeit in der Prävention atherothrombotischer Ereignisse ließ auf die zentrale Rolle des P2Y₁₂-Rezeptors bei der Plättchenaggregation und Thrombusbildung schließen. Der P2Y₁₂-Rezeptor vermittelt als Gi-gekoppelter Rezeptor über ein Absinken der cAMP-Spiegel in Thrombozyten eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung im Rahmen einer Thrombusbildung, sowohl unter physiologischen (Wundheilung), als auch unter pathologischen Bedingungen (Arteriosklerose, Embolien). Bis vor einiger Zeit wurde angenommen, dass sich der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ fast ausschließlich auf Thrombozyten befindet [56]. Studien haben gezeigt, dass der P2Y₁₂-Rezeptor auf wenigen anderen Geweben wie z.B. Mikroglia [57] oder Endothel von Rattenhirnkapillaren [3, 6] exprimiert ist. Durch seine selektive Verteilung im Gewebe ist er nach wie vor wichtiges Ziel für die medikamentöse Therapie der KHK und Prävention des ACS. Die im klinischen Gebrauch etablierten P2Y₁₂-ADP-Rezeptor-Antagonisten kommen aus der Gruppe der Thienopyridine (Clopidogrel, Prasugrel, Ticlopidin). Der klassische Wirkmechanismus dieser Substanzen beruht auf einer verminderten Aktivierung von Plättchen durch Blockade der stimulierenden Wirkung von ADP auf die Thrombozyten. Neuere Studien weisen auf eine Beteiligung des Plättchen P2Y₁₂-Rezeptors in der Entwicklung der Arteriosklerose [71] und einer systemischen Inflammation hin [70].

Erste Hinweise einer Bedeutung des P2Y₁₂-Rezeptors in humanen glatten Muskelzellen (hSMC) finden sich in den Arbeiten von Shanker et al. und Whilborg et al., die eine Zunahme der Expression dieses Rezeptors auf hSMC unter Nikotineinfluss [60] und eine P2Y₁₂-Rezeptor vermittelte Gefäßkontraktion beschreiben [66].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die unabhängig von Thrombozyten ablaufende Erhöhung der Expression des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ auf humanen glatten Muskelzellen durch Stimulation mit Thrombin untersucht. Zusätzlich wurde die dieser Stimulation zugrunde liegende Signalkaskade, sowie mögliche funktionelle Auswirkungen auf die Zelle untersucht. Thrombin entsteht am Ende der Gerinnungskaskade und ist in hohen Konzentrationen am Ort eines Blutgerinnsels oder einer atherosklerotischen Läsion vorhanden. Die Exposition von humanen glatten Muskelzellen mit Thrombin resultierte in einer gesteigerten Expression von P2Y₁₂-mRNA und P2Y₁₂-Gesamtprotein. Die Versuche zeigten eine Thrombin-vermittelte 1,8 fache Steigerung von P2Y₁₂-mRNA nach einer Stunde. Diese transkriptionelle Aktivierung konnte mit zwei verschiedenen Immunoblot-Antikörpern zwischen 6 und 24 Stunden auf Proteinebene wiedergefunden werden. Mittels FACS-Analysen konnte zusätzlich eine Stimulation der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Thrombin in vaskulären glatten Muskelzellen sowohl mitogene, als auch proinflammatorische Effekte induzieren kann. Diese Effekte werden über die G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 vermittelt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass an der Induktion von P2Y₁₂ in hSMC überwiegend der Thrombin Rezeptor PAR-1 beteiligt ist. Die genannten Befunde in humaner *Vena Saphena* konnten auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta bestätigt werden. Da es sich bei der Arteriosklerose vornehmlich um eine Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien handelt, war dies ein interessantes Ergebnis. Die Ergebnisse der Experimente mit venösen Zellen könnten auch für die häufig eingesetzten venösen Bypässe von besonderer Bedeutung sein. Eine weitere Bestätigung für die Existenz und die mögliche Rolle des P2Y₁₂-Rezeptors auf glatten Muskelzellen im atherosklerotischen Geschehen stellen die Immunfärbungen von atherosklerotischen Plaques dar. Hier konnte durch eine Doppelfärbung mit hSMC- bzw. thrombozyten- oder makrophagenspezifischen Markern eine eindeutige Lokalisation des P2Y₁₂-Rezeptors auf den glatten Muskelzellen gezeigt werden.

Mögliche ADP-induzierte SMC-Antworten

Nach dem Beweis der Existenz des P2Y₁₂-Rezeptors auf hSMC von Arterien und Venen und seiner vermehrten Expression unter Bedingungen erhöhter Thrombinkonzentrationen durch die thrombin-induzierte Aktivierung von PAR-1, galt es zu bestimmen auf welche Art der P2Y₁₂-Rezeptor seine Signale in hSMC vermittelt.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, auf welche Art der P2Y₁₂-Rezeptor seine Signale in humanen glatten Muskelzellen vermittelt und ob VASP, ähnlich wie in Thrombozyten, dabei eine Rolle spielt. Weiter war es von Interesse, ob Thienopyridine auch in glatten Muskelzellen in diese Signalübertragungswege eingreifen und einen regulatorischen Effekt auf die VASP-Phosphorylierung haben.

Plättchenadhäsion und -aktivierung sind die ersten Schritte bei der Entstehung von Thrombose und Gefäßverschluss. Prostazyklin und NO hemmen Plättchenadhäsion indem sie cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen aktivieren. Ein wichtiges Substrat dieser Proteinkinasen ist VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) [73]. VASP ist ein 46/50 kDa großes Protein, dass in vielen Zellen detektierbar ist, unter anderem in Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten, Leukozyten, vaskulären glatten Muskelzellen und Thrombozyten [74, 75]. Es gehört zu der ENA/VASP Proteinfamilie, einer Familie prolinreicher Proteine und besitzt drei Phosphorylierungsstellen: Serin 157, Serin 239, Threonin 278 [73, 74]. Diese werden durch cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der molekularen Masse des Proteins von 46 auf 50 kDa (P-VASP). Die VASP-Phosphorylierung korreliert eng mit der Plättcheninhibition [74, 75] und ist begleitet von der Inhibition des GPIIb/IIIa-Fibrinogenrezeptors und der Fibrinogenbindung. Somit ist VASP maßgeblich an der negativen Regulierung der Plättchenadhäsion an die Gefäßwand beteiligt, ist jedoch nicht ausreichend um Plättchenadhäsion zu unterdrücken, wenn ein Endothelschaden oder eine Endothel-Dysfunktion vorliegen [73]. Thienopyridine sind als Antiplättchensubstanzen weit verbreitet und haben sich in der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse bewährt. Es wird angenommen, dass endogenes Prostaglandin zu der Antiplättchenwirkung der P2Y₁₂-Inhibition beiträgt [76]. Prostaglandin E₁ moduliert durch Bindung an seinen Prostaglandinrezeptor intrazelluläre cAMP Level.

Durch Erhöhung der Aktivität der Adenylatzyklase wird vermehrt cAMP gebildet. Die erhöhten cAMP Level führen zu einer Aktivierung der Proteinkinasen A und G, was zu der Phosphorylierung von VASP und zur Hemmung der Thrombozyten führt. ADP hingegen bewirkt über die Bindung an P2Y₁₂-Rezeptoren eine Hemmung der Adenylatzyklase, die Abnahme des intrazellulären cAMP und eine Plättchenaktivierung. Antagonisten des G_i-Protein gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors heben die inhibitorische Wirkung von ADP auf die PGE₁ stimulierte VASP Phosphorylierung auf und hemmen die Plättchenaggregation [73, 77] (Abb.25).

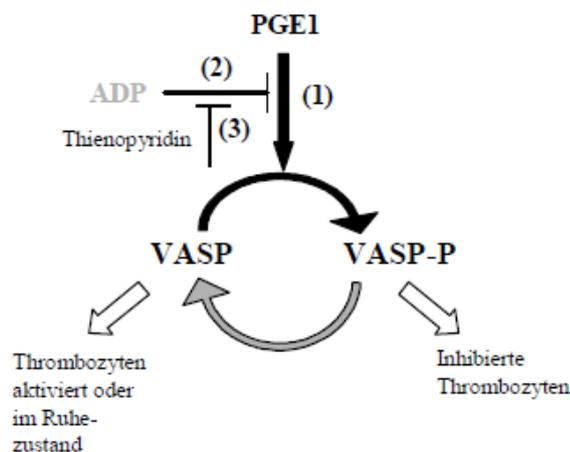


Abbildung 25 Regulation der VASP Phosphorylierung in Plättchen (PLT VASP/P2Y₁₂-Kit, Biocytex, Marseille, France, Version August 2005)

Prostaglandin E₁ führt über eine Erhöhung intrazellulärer cAMP Spiegel zur Phosphorylierung von VASP und somit zu Plättchenhemmung, während ADP über die Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor und sinkende cAMP Spiegel und somit die Thrombozytenaktivierung bewirkt. Durch die Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors mittels Thienopyridinen bleibt die PGE₁ induzierte VASP-Phosphorylierung trotz Zugabe von ADP erhalten.

Durch hohe inter-individuelle Schwankungen der Antiplättchenwirkung von Clopidogrel [43, 78, 79] wurden Tests entwickelt, die es ermöglichen sollten, so genannten „Non-Responder“ zu erkennen, um die Patienten frühzeitig von anderen Therapien profitieren lassen zu können und sie so vor wiederkehrenden ischämischen Ereignissen und Stent-Thrombosen zu schützen [78]. Einer dieser Tests ist die Messung von VASP mittels Durchflusszytometrie [80]. In solchen Tests korreliert phosphoryliertes VASP mit der Inhibition des P2Y₁₂-Rezeptors und unphosphoryliertes VASP mit seiner aktiven Form [68].

VASP-P lässt sich durch Permeabilisierung der Membran und Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern mittels kommerziell erhältlicher Assays in der Durchflusszytometrie messen (PLT VASP/P2Y₁₂-Kit, Biocytex, Marseille, France, Version August 2005) [80]. Um die physiologische Wirkung von PGE₁ in vivo zu imitieren wurden die Zellen mit dem stabilen Prostazyklinanalogon Iloprost (1nmol/L) stimuliert. Die Stimulation der Zellen mit dem Thienopyridin Prasugrel erfolgte durch seinen aktiven Metaboliten R-138727. Die Expression VASP und VASP-P in hSMC wurde zunächst mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zu diesem Zweck wurden hSMC wie in 2.5 beschrieben kultiviert und in 6-Well Platten ausgesät. Vor der Zellpräparation mittels PLT VASP/P2Y₁₂-Kit wurden die Zellen 30 min lang mit Prasugrel (100µM) stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 1ml Citrat gelöst (15 min bei RT), 35 sec bei 5000 rpm zentrifugiert und in 20µl 3%BSA/PBS resuspendiert. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers und mit den in dem Kit enthaltenen Reagenzien bearbeitet. Leider war diese Methode erfolglos. Daraufhin wurden die Phosphoproteine in Western Blots untersucht. Eine Hemmung der VASP-Phosphorylierung durch Prasugrel war nicht detektierbar. Die Stimulation der VASP-Phosphorylierung durch Iloprost war nicht signifikant. Dies führte zu der Annahme, dass der P2Y₁₂ auf hSMC möglicherweise nicht in ausreichendem Maße exprimiert sein könnte. In weiteren Versuchen wurden die Zellen also mit Thrombin vorstimuliert um durch die Hochregulation des Rezeptors ein Ergebnis erzielen zu können. Leider blieben auch diese Versuche ohne Ergebnis.

Der Effekt von ADP via P2Y₁₂-Rezeptoren spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der thrombin-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und der Bildung von Thromboxan A₂ in Plättchen [61, 91]. ERK1/2 (extrazellulär-signalregulierten Kinasen) gehören zu der Familie der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen). Dabei handelt es sich um eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen [81, 82], die eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von Signalen von der Zelloberfläche in den Zellkern spielen [83]. Sie sind zentrale Elemente von Signalkaskaden, die eine Reihe von zellulären Vorgängen wie Genexpression, Zelldifferenzierung, Migration, Proliferation und den programmierten Zelltod regulieren [82, 84-87]. Zu den 3 Hauptgruppen der MAP-Kinasen gehören die extrazellulär-signalregulierten Kinasen (ERK), die c-jun-Amino-Terminus-Kinase (JNKs) und die p38 MAP-Kinase [81, 82].

Anhand von Strukturähnlichkeiten lassen sich 6 Untergruppen unterscheiden: ERK1/2, ERK3, ERK5, ERK7, JNK1/2/3 und p38MAPK $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ [82, 85]. In der Gruppe der extrazellulär-signal-regulierten Kinasen (ERK) unterscheidet man anhand ihrer Größe zwei Isoformen, die p44 MAPK (ERK 1) und die p42 MAPK (ERK 2) [84]. Die Familie der MAP-Kinasen setzt sich aus drei aufeinanderfolgend wirksamen Kinasen zusammen: einer MAPK, einer MAPKK und einer MAPKKK (Abb.26). Die MAPKKK werden nach extrazellulärer Stimulation durch Interaktion mit einem kleinen GTP-bindenden Protein der Ras/Rho Familie phosphoryliert und aktiviert. MAPKKK-Aktivierung führt zu Phosphorylierung und Aktivierung einer MAPKK, welche daraufhin durch doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten eine MAPK stimuliert. Einmal aktiviert, phosphoryliert die MAPK Zielsubstrate an einem Serin- oder Threonin gefolgt von einem Prolin.

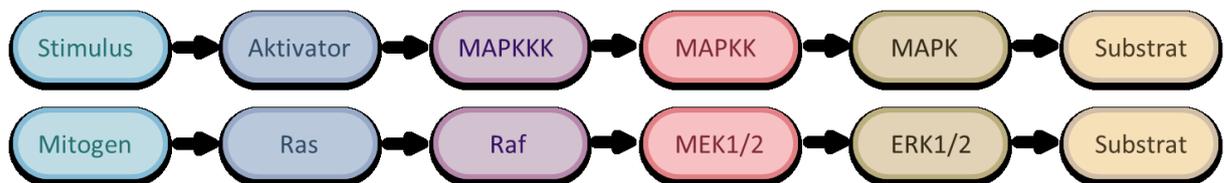


Abbildung 26 MAP-Kinase Signalübertragungsweg (modifiziert nach Johnson 2002)

Die Signalkaskaden der MAP-Kinasen beinhalten drei hintereinander geschaltete Kinasen [87]. Eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK, Raf) aktiviert durch Phosphorylierung von Serin und Threonin [88] eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK, MEK1/2). Diese aktiviert daraufhin durch Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes eine MAP-Kinase (MAPK, ERK1/2). Die aktivierte MAP-Kinase kann dann Serin- und Threoninreste bestimmter Substrate phosphorylieren [82] und durch Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangen [89]. Zu den Substraten der MAP-Kinasen gehören andere Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Proteine des Zytoskeletts [87]. Unter den Transkriptionsfaktoren befinden sich c-Jun, c-Myc und Elk1 [85].

Der ERK Signalweg wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Hierbei kann es sich um Mitogene wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Liganden von G-Protein gekoppelten Faktoren oder Plättchenagonisten wie Thrombin, Kollagen und TXA₂ handeln. Nach ihrer Aktivierung können ERK1/2 durch Phosphorylierung die Aktivität von zytoplasmatischen Molekülen und nukleären Proteinen regulieren und so Genexpression, Zellzyklus und Zellproliferation beeinflussen [82, 87]. Ob P2Y₁₂ auch in hSMC für die thrombin-induzierte ERK-Aktivierung relevant ist und welchen Effekt Prasugrel auf die ERK-Phosphorylierung hat, wurde mittels Western Blot untersucht. Da die Phosphorylierung von EKR einen mitogenen Stimulus darstellt, stellte sich die Frage, ob der P2Y₁₂-Rezeptor auf humanen glatten Muskelzellen einen Einfluss auf ihre Mitogenese aufweist.

Zu diesem Zweck wurden humane glatte Muskelzellen in 12-Well Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer Subkonfluenz kultiviert. Es folgte die Kultivierung in serumfreien Medium für 48 Stunden und die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Stimulantien. Prasugrel wurde in Form seines aktiven Metaboliten R-138727 mit DMSO verdünnt und in einer in einer Konzentration von 10 μ M zu verschiedenen Zeitpunkten für eine bestimmte Stimulationszeit (4h, 30') eingesetzt. Bei kombinierter Stimulation von ADP und Prasugrel wurde zunächst mit Prasugrel vorstimuliert und dann für eine bestimmte Zeit (5',15',1h, 4h) ADP hinzugegeben. ADP wurde ebenfalls mit DMSO verdünnt und in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Die Zellen wurden mit MeSADP stimuliert, da dieser spezifisch an Plättchen P2Y₁ und P2Y₁₂ bindet [94, 95]. Es handelt sich um ein ADP-Analogon welches an Position 2 des Purinringes substituiert wurde, und ein etwa 10-fach stärkeres Agens für Plättchenaggregation ist als ADP [95]. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und solche, die allein mit DMSO behandelt wurden. Zur Gewinnung der Proteinlysate wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Wells einmalig mit PBS ausgewaschen und anschließend mit 60 μ l 4xLämmli+DTT versetzt. Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die Detektion der Proteinmenge erfolgte mittels Western Blot. Prasugrel hatte in diesen Versuchen keinen Effekt auf die ERK-Phosphorylierung. In weiteren Versuchen wurden die Zellen deshalb mit Thrombin vorstimuliert und der Versuch wiederholt. Die Dauer der Stimulation wurde modifiziert. Mit mäßigem Erfolg. Die ERK-Phosphorylierung schien ohne Vorstimulation mit Thrombin zu dem gemessenen Zeitpunkt stärker zu sein als mit Vorstimulation.

Des Weiteren bemühten wir uns eine mögliche funktionelle Konsequenz aus der thrombin-induzierten P2Y₁₂-Expression für mitogenetische und proinflammatorische Reaktionen in hSMC zu bestimmen. Vermehrte P2Y₁₂-Expression könnte als ein thrombin-getriggertes proinflammatorisches Signal in humanem atherosklerotischen Plauegewebe in Betracht gezogen werden, welches eventuell die Chemotaxis von glatten Muskelzellen zu Orten einer Läsion anregen könnte. Eine weitere Funktion der gesteigerten P2Y₁₂-Expression war die Stimulation der thrombin-induzierten Mitogenese. Die Präinkubation mit Thrombin führte zu einer signifikant gesteigerten Reaktion der humanen glatten Muskelzellen auf 2-MeSADP, was schließlich zu einer erhöhten Zellzahl führte. Diese promitogene Antwort wurde durch den P2Y₁₂-Antagonisten R-138727 oder einen anderen selektiven Inhibitor von P2Y-Rezeptoren, 2-Methylthio-AMP, blockiert. All diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die thrombin-induzierte Steigerung der P2Y₁₂-Expression proinflammatorische und mitogenetische Reaktionen in humanen glatten Muskelzellen verstärkt. Die Aktivierung des G_i gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors bewirkt über die Hemmung der Adenylatzyklase einen Abfall des cAMP-Spiegels in der Effektorzelle. Um nun zu untersuchen, ob die durch Thrombin gesteigerte Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auch auf die nachgeschalteten Signalwege einen relevanten Effekt ausübt, wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel nach Vorinkubation mit Thrombin und nachfolgender Stimulation des P2Y₁₂-Rezeptors untersucht. Durch Iloprost wurden die cAMP Spiegel angehoben um den Effekt von endogenem Prostazyklin zu imitieren, von dem man ausgeht, dass er zu der Antiplättchenwirkung der P2Y₁₂ Inhibition beiträgt. Der beobachtete signifikante Anstieg von cAMP unter diesen Bedingungen konnte durch den zusätzlichen Einsatz eines P2Y₁₂-Rezeptor-Inhibitors (R-138727) aufgehoben werden, was auf eine P2Y₁₂-vermittelte Reduktion der cAMP-Spiegel durch ein G_i-Protein hinweist. Eine funktionelle Auswirkung dieser Aktivierung ist eine vermehrte Mitogenese der glatten Muskelzellen. Der gezeigten Steigerung des Zellwachstums und der Zellzahl könnten *in vivo* verschiedene Bedeutungen zukommen. So kann ein bereits bestehender atherosklerotischer Plaue durch das Einwandern glatter Muskelzellen stabilisiert werden, so dass es zu einer festeren Plauestruktur mit weniger Tendenz zur Ruptur kommt. Auf der anderen Seite könnte eine hohe Mitogenese in der frühen Phase einer atherosklerotischen Läsion zu deren Konsolidierung und Exazerbation führen. Das vermehrte Vorhandensein des P2Y₁₂-Rezeptors auf humanen glatten

Muskelzellen könnte zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion an Orten einer lokal gesteigerten Thrombinkonzentration führen und die Exazerbation von Plaques fördern. Ob die gesteigerte P2Y₁₂-Expression in glatten Muskelzellen einer Läsion mit einer Plaque Ruptur assoziiert ist oder sogar akute Ereignisse fördert, zum Beispiel durch Beeinflussung der Expression von destabilisierenden Faktoren wie Metalloproteinasen, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Thrombin eine funktionell relevante Steigerung der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors in venösen und arteriellen glatten Muskelzellen bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung hauptsächlich über PAR-1 abläuft, der darauf über NF- κ B eine vermehrte Transkription des P2Y₁₂-Rezeptors auslöst. Unter diesen Bedingungen kommt es durch Stimulation des G_i-gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors zu einem Abfall des cAMP-Spiegels in der Zelle und in der Folge zu vermehrter Mitogenese und zur Ausschüttung des proinflammatorischen Interleukins IL-6. Diese Ergebnisse finden sich in klinischen Beobachtungen bestätigt, die zeigen, dass der Einsatz von P2Y₁₂-Antagonisten antiinflammatorische Wirkungen entfaltet. Die Betrachtung des Wirkmechanismus der P2Y₁₂-Antagonisten richtete sich bei deren Einsatz im kardiovaskulären Bereich bisher allein auf den Angriffspunkt an den Thrombozyten. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass der P2Y₁₂-Rezeptor auch eine funktionelle Bedeutung in glatten Muskelzellen hat, was zeigt, dass die klinische Wirkung dieser Substanzklasse zumindest zum Teil auch außerhalb von Thrombozyten begründet liegen könnte.

Thrombin aktiviert den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B in vaskulären glatten Muskelzellen und die P2Y₁₂-Promotorregion beinhaltet eine Bindungsstelle für NF- κ B.

Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe zu diesem Thema, die 2010 in ATVB veröffentlicht wurden, haben die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B, NF- κ B SN50, Merck, Calbiochem) für die thrombin-induzierte Transkription des P2Y₁₂-Rezeptors in humanen glatten Muskelzellen belegt. Sie zeigten, dass die durch Thrombin und PAR-1 vermittelte Erhöhung der P2Y₁₂-mRNA durch NF- κ B vermittelt wird. Der Nukleäre Faktor κ B ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor in praktisch allen Zelltypen und Geweben. Er bindet an bestimmte Abschnitte der DNA und kann die Transkription abhängiger Gene beeinflussen. Er spielt eine große Rolle bei der Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod. Die Aktivierung von NF- κ B ist auch bei der Entstehung von Entzündungen relevant. Wahrscheinlich wird die COX₂ durch NF- κ B verstärkt transkribiert. Eine Analyse der P2Y₁₂-Promotorregion identifizierte eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor und Entzündungsmediator NF- κ B. Die Stimulation der P2Y₁₂-mRNA Expression durch Thrombin oder das PAR-1 aktivierende Peptid AP-1 konnte durch einen NF- κ B -Inhibitor vollständig aufgehoben werden. Demzufolge benötigt die thrombin-induzierte transkriptionelle Regulierung von P2Y₁₂ die Aktivierung von NF- κ B. Inkubation mit Thrombin für 20 Minuten induzierte die spezifische Bindung des NF- κ B an die Promotorregion von P2Y₁₂, die das NF- κ B-Bindungsmotiv beinhaltet. Darüber hinaus unterdrückte ein spezifischer Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung die thrombin- und AP1-induzierte Hochregulation und die Expression des P2Y₁₂ Proteins an der Zelloberfläche. Neben der in dieser Arbeit gezeigten P2Y₁₂ vermittelten mitogenen Wirkung von Thrombin auf hSMC wurde in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe auch eine mögliche proinflammatorische Auswirkung dieser Aktivierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von P2Y₁₂ unter einer Präinkubation mit Thrombin zu einem Anstieg der mRNA des proinflammatorischen Interleukins IL-6 führte, was sich in gesteigerten IL-6 Spiegel im Medium widerspiegelte. Dieser Effekt konnte durch einen P2Y₁₂-Inhibitor vollständig aufgehoben werden.

5 Schlussfolgerungen

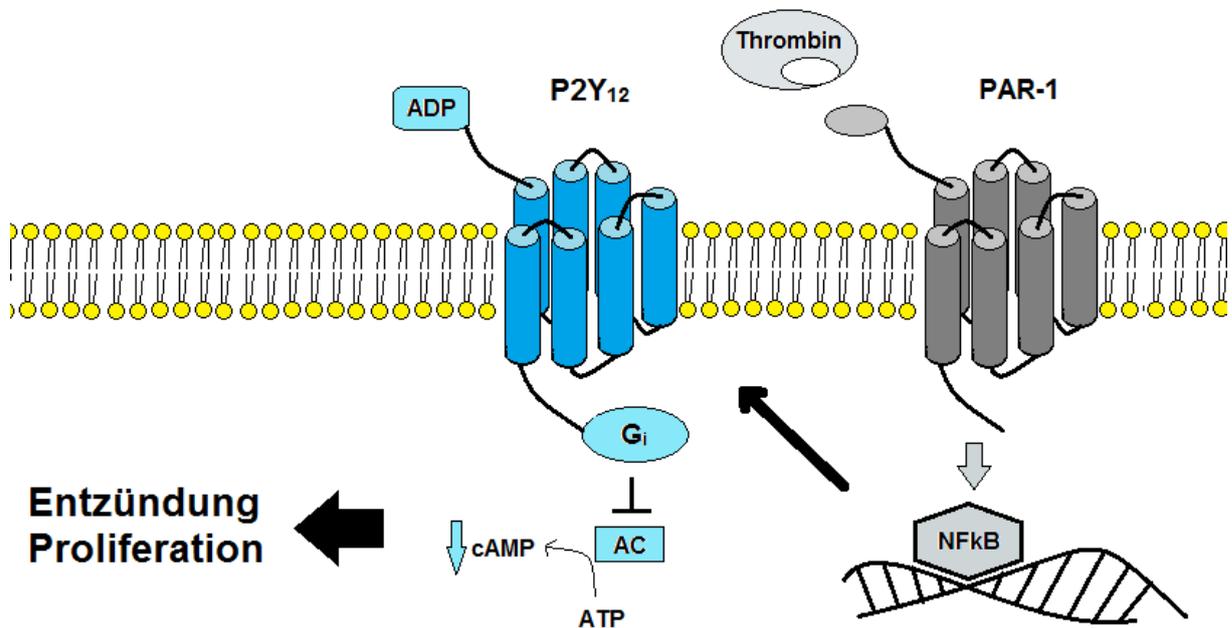


Abbildung 27 Schema der PAR-1 regulierten P2Y₁₂-Expression und ihrer funktionellen Bedeutung in humanen glatten Muskelzellen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Thrombin die Expression von funktionell aktiven P2Y₁₂-Rezeptoren in humanen glatten Muskelzellen verstärkt. Das ist bedingt durch eine verstärkte, hauptsächlich durch PAR-1 vermittelte, P2Y₁₂-Transkription durch NF-*κ*B Aktivierung und resultiert in erhöhter proinflammatorischer und mitogener Antwort. Diese Forschungsergebnisse spiegeln die klinische Beobachtung wider, dass P2Y₁₂-Antagonisten antiinflammatorische Aktivität besitzen, welche bisher nur der Hemmung der Plättchen zugeschrieben wurde. Unsere Daten zeigen, dass die neu beschriebenen Wirkungen der P2Y₁₂-Antagonisten für Patienten, besonders bei einer gesteigerten Thrombinbildung, wie z.B. beim akuten Koronarsyndrom relevant sein könnten und zu ihrem allgemeinen klinischen Benefit beitragen könnten.

Literaturverzeichnis

1. WHO, *World Health Report 1998: life in the 21st century: a vision for all.*, 1998.
2. RKI, *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2009«*, R.K. Institut, Editor 2010, Robert Koch Institut.
3. Siller-Matula, J., et al., *Thienopyridines in cardiovascular disease: focus on clopidogrel resistance*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(3): p. 385-93.
4. Aktas, B., *Biochemische Charakterisierung des ADP-Rezeptors P2Y12 und pharmakologische Therapiekontrolle von Thrombozytenfunktionshemmern*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie 2003*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg.
5. *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)*. CAPRIE Steering Committee. *Lancet*, 1996. **348**(9038): p. 1329-39.
6. Wihlborg, A.K., et al., *ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(10): p. 1810-5.
7. Falk, E., *Pathogenesis of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(8 Suppl): p. C7-12.
8. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
9. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
10. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
11. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(5): p. 310-8.
12. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(4): p. 242-50.
13. Simons, D.B., et al., *Noninvasive definition of anatomic coronary artery disease by ultrafast computed tomographic scanning: a quantitative pathologic comparison study*. *J Am Coll Cardiol*, 1992. **20**(5): p. 1118-26.
14. WHO, *World Health Statistics 2012*, 2012.
15. Viles-Gonzalez, J.F., V. Fuster, and J.J. Badimon, *Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences*. *Eur Heart J*, 2004. **25**(14): p. 1197-207.
16. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies*. *Circulation*, 2001. **104**(23): p. 2855-64.
17. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
18. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
19. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. *Science*, 1973. **180**(4093): p. 1332-9.
20. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. *Clin Chem*, 2008. **54**(1): p. 24-38.
21. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
22. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
23. Joshi, F.R., et al., *Non-invasive imaging of atherosclerosis*. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2012. **13**(3): p. 205-18.
24. McNicol, A. and S.J. Israels, *Platelets and anti-platelet therapy*. *J Pharmacol Sci*, 2003. **93**(4): p. 381-96.
25. Arbab-Zadeh, A., et al., *Acute coronary events*. *Circulation*, 2012. **125**(9): p. 1147-56.

26. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der and W.M.F. (AWMF), *Nationale Versorgungs-Leitlinie Chronische KHK – Langfassung Version 1.13*, 2006.
27. Herold, G., *Innere Medizin* 2011.
28. Yusuf, S., et al., *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 494-502.
29. Mehta, S.R. and S. Yusuf, *The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease*. Eur Heart J, 2000. **21**(24): p. 2033-41.
30. Wiviott, S.D., et al., *Evaluation of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: design and rationale for the TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38)*. Am Heart J, 2006. **152**(4): p. 627-35.
31. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 277-300.
32. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
33. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 887-96.
34. Libby, P. and D.I. Simon, *Inflammation and thrombosis: the clot thickens*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1718-20.
35. Huo, Y. and K.F. Ley, *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(1): p. 18-22.
36. McNicol, A. and S.J. Israels, *Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis*. Thromb Res, 1999. **95**(1): p. 1-18.
37. Leon, C., et al., *Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1941-7.
38. Leon, C., et al., *Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation*. Blood, 2004. **103**(2): p. 594-600.
39. Dahlback, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
40. Gachet, C., *The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs*. Pharmacol Ther, 2005. **108**(2): p. 180-92.
41. Foster, C.J., et al., *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1591-8.
42. Kunapuli, S.P., et al., *Platelet purinergic receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(2): p. 175-80.
43. Schror, K. and K. Huber, *[Prasugrel, a new thienopyridine]*. Hamostaseologie, 2007. **27**(5): p. 351-5.
44. Zhong, X., et al., *N-linked glycosylation of platelet P2Y12 ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression*. FEBS Lett, 2004. **562**(1-3): p. 111-7.
45. Gachet, C., *ADP receptors of platelets and their inhibition*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 222-32.
46. Kunapuli, S.P., *Multiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(10): p. 391-4.
47. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *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): p. 8070-4.
48. Coughlin, S.R., *How the protease thrombin talks to cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11023-7.
49. Brass, L.F., *Thrombin and platelet activation*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 18S-25S.

50. Nakashima, S., et al., *Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases by thrombin in human platelets: possible involvement in late arachidonic acid release*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **198**(2): p. 497-503.
51. Norris, L.A., *Blood coagulation*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. **17**(3): p. 369-83.
52. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
53. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(3): p. 413-92.
54. Bodor, E.T., et al., *Purification and functional reconstitution of the human P2Y₁₂ receptor*. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**(5): p. 1210-6.
55. Cattaneo, M., *The platelet P2Y₁(2) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects*. *Blood*, 2011. **117**(7): p. 2102-12.
56. Hoppel, G., et al., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. *Nature*, 2001. **409**(6817): p. 202-7.
57. Nasu-Tada, K., S. Koizumi, and K. Inoue, *Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA*. *Glia*, 2005. **52**(2): p. 98-107.
58. Reigada, D., et al., *Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **289**(3): p. C617-24.
59. Ennion, S.J., A.D. Powell, and E.P. Seward, *Identification of the P2Y₁₂ receptor in nucleotide inhibition of exocytosis from bovine chromaffin cells*. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(3): p. 601-11.
60. Shanker, G., et al., *Nicotine upregulates the expression of P2Y₁₂ on vascular cells and megakaryoblasts*. *J Thromb Thrombolysis*, 2006. **22**(3): p. 213-20.
61. Falker, K., D. Lange, and P. Presek, *ADP secretion and subsequent P2Y₁₂ receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(1): p. 114-23.
62. Fagura, M.S., et al., *P2Y₁-receptors in human platelets which are pharmacologically distinct from P2Y(ADP)-receptors*. *Br J Pharmacol*, 1998. **124**(1): p. 157-64.
63. Hechler, B., et al., *Mpl ligand increases P2Y₁ receptor gene expression in megakaryocytes with no concomitant change in platelet response to ADP*. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(5): p. 1112-20.
64. Jin, J., J.L. Daniel, and S.P. Kunapuli, *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): p. 2030-4.
65. Daniel, J.L., et al., *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(4): p. 2024-9.
66. Takasaki, J., et al., *Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y₁ receptor*. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(3): p. 432-9.
67. Zhang, F.L., et al., *ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 8608-15.
68. Mueller, T., et al., *Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods*. *Thromb Res*, 2007. **121**(2): p. 249-58.
69. Ding, Z., et al., *Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 3908-14.
70. Steinhubl, S.R., et al., *Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease*. *Vasc Med*, 2007. **12**(2): p. 113-22.
71. Evans, D.J., et al., *Platelet P2Y₁₂ receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis*. *Circulation*, 2009. **119**(1): p. 116-22.

72. Raines, E.W. and R. Ross, *Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis*. Br Heart J, 1993. **69**(1 Suppl): p. S30-7.
73. Massberg, S., et al., *Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice*. Blood, 2004. **103**(1): p. 136-42.
74. Butt, E., et al., *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): p. 14509-17.
75. Reinhard, M., et al., *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): p. 2063-70.
76. Cattaneo, M. and A. Lecchi, *Inhibition of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 577-82.
77. Gurbel, P.A., et al., *Assessment of clopidogrel responsiveness: measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients*. Thromb Res, 2007. **121**(1): p. 107-15.
78. Gurbel, P.A., K.P. Bliden, and U.S. Tantry, *Effect of clopidogrel with and without eptifibatid on tumor necrosis factor-alpha and C-reactive protein release after elective stenting: results from the CLEAR PLATELETS 1b study*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2186-91.
79. Gurbel, P.A., et al., *Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity*. Circulation, 2003. **107**(23): p. 2908-13.
80. Gurbel, P.A., et al., *Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(10): p. 1827-32.
81. Bugaud, F., et al., *Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3800-5.
82. Geest, C.R. and P.J. Coffey, *MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(2): p. 237-50.
83. Oliveira, C.S., et al., *The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system*. Int J Dev Neurosci, 2008. **26**(3-4): p. 355-62.
84. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
85. Severin, S., C. Ghevaert, and A. Mazharian, *The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(1): p. 17-26.
86. Roger, S., et al., *Costimulation of the Gi-coupled ADP receptor and the Gq-coupled TXA2 receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation*. FEBS Lett, 2004. **556**(1-3): p. 227-35.
87. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
88. McNicol, A. and E.C. Jackson, *Inhibition of the MEK/ERK pathway has no effect on agonist-induced aggregation of human platelets*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(8): p. 1243-50.
89. Davis, R.J., *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14553-6.
90. Strniskova, M., M. Barancik, and T. Ravingerova, *Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes*. Gen Physiol Biophys, 2002. **21**(3): p. 231-55.
91. Shankar, H., et al., *P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 638-47.
92. Braun, M., et al., *Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2568-75.

93. Rosenkranz, A.C., K. Schror, and B.H. Rauch, *Direct inhibitors of thrombin and factor Xa attenuate clot-induced mitogenesis and inflammatory gene expression in human vascular smooth muscle cells*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(3): p. 561-2.
94. Baurand, A., et al., *Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist*. *Eur J Pharmacol*, 2001. **412**(3): p. 213-21.
95. Hechler, B., et al., *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): p. 858-66.

6 Danksagung

Diese Arbeit widme ich meinen lieben Eltern Peter und Ilona Drießen und meiner Schwester Esther Drießen, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Promotion unterstützt und begleitet haben und mich auf meinem Weg immer gestärkt, motiviert und an mich geglaubt haben. Danke für die Liebe und den Rückhalt und nicht zuletzt eure finanzielle Unterstützung, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Bernhard Rauch für die Möglichkeit meine Promotion im Institut für Pharmakologie und Klinischer Pharmakologie der Universitätsklinik Düsseldorf durchführen zu können. Ich bedanke mich für die herzliche Aufnahme in das Institut, für die fürsorgliche Betreuung meiner Arbeit inklusive meiner Einarbeitung, der geduldigen Anleitung und Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie und Klinischer Pharmakologie der Universitätsklinik Düsseldorf und für die herzliche Aufnahme in das Institut. Vielen Dank für die freundliche fachliche Unterstützung.

Frau Dr. Anke C. Rosenkranz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft

Frau Kerstin Freidel, Frau Petra Kuge und Frau Bärbel Reupert danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft in praktischen Fragen und ihr aufmunterndes, motivierendes Wort bei methodischen Schwierigkeiten.

Frau Beate Weyrauther danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur und das Bereitstellen der Zellen. Vielen Dank für die liebevolle Einarbeitung in die Arbeit in der Zellkultur.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag danke ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft in organisatorischen Dingen und der Organisation des Institutslebens.

Herrn Dr. Sören Twarock danke ich für die Unterstützung in allen Bereichen, ganz besonders im Kampf mit Word, Endnote und Graph Pad etc., und für das Korrekturlesen meiner Dissertation. Vielen Dank für die unzähligen Antworten auf meine noch viel zahlreicheren Fragen. Vielen Dank für jedes aufmunternde und motivierende Wort, die tolle Unterstützung während der gesamten Zeit und die schöne gemeinsame Zeit im Institut.

Ich danke allen Freunden und Kollegen, Swen Ermler, Andreas Böhm, Daniela Bein, Tina Schooss und Sebastian Wilgeroth für die freundliche Arbeitsatmosphäre, das tolle Arbeitsklima, die kollegiale Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit im Institut.

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Hilden, den 11.08.2013

Julia Helene Drießen