

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Sektion Klinische Pharmakologie: Prof. Dr.med. Peter Presek

**Inhibition der PDGF-Rezeptortyrosinkinase in humanen Thrombozyten:
funktionelle Aspekte und PI-3-Kinase abhängige Aktivierung von ERK2**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Willi Groß

geboren am 18.12.1978 in Bajram-Ali, Turkmenistan

Gutachter/Gutachterin:

Prof. Presek

Prof. Buerke

Prof. Kirchmaier (Wiesbaden)

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 06.04.2010

Verteidigungsdatum: 18.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	10
3. Material und Methoden	11
3.1. PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren mit Strukturformel	11
3.2. Substanzen	12
3.3. Geräte und Materialien	13
3.4. Thrombozytenpräparation	13
3.5. Bestimmung der Zellzahl der isolierten Thrombozyten	14
3.6. Thrombozytenaggregation	14
3.7. Thrombozytenstimulation, Detektion und Quantifizierung der phosphorylierten Proteine	15
3.8. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	15
3.9. Westernblott und Detektion der phosphorylierten Proteine	16
3.10. Visualisierung und Quantifizierung der phosphorylierten Proteine	18
3.11. Bestimmung der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung und α -Granulasekretion mittels Durchflusszytometrie	18
3.12. Statistische Auswertung	19
4. Ergebnisse	20
4.1. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aggregation	20
4.2. Sekretion unter dem Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296	23
4.3. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung unter dem Einfluß des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296	24
4.4. Der Einfluss der PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Signalwege der Thrombozyten	26
4.4.1. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aktivität der Proteinkinase B (Akt)	26
4.4.2. Aktivität der MAP-Kinasen ERK2 und p38 unter dem Einfluß des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296	27
4.4.3. Einfluss des PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf p38-Aktivität	28

4.4.4. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die ERK2-Aktivität	28
4.4.5. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Phosphorylierung von Tyrosin 185 und Threonin 183 der ERK2	30
4.4.6. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die ERK2-Aktivität in Abhängigkeit vom verstärkten Gi-Signal.....	32
4.4.7. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition von MEK 1/2.....	33
4.4.8. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition von Src	34
4.4.9. Bedeutung der PI-3-Kinasen für die PDGF-abhängigen Signalwege	36
4.4.10. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität bei definiertem Gq- und ansteigendem Gi- Signal	42
4.4.11. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität bei definiertem Gi- und zunehmenden Gq- Signal	43
4.4.12. Einfluss der PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296, AG17 und AG1478 auf ERK2-Aktivität.....	44
4.4.13. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aggregation	45
4.4.14. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität der MAP-Kinasen ERK2 und p38.....	46
4.4.15. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität der Proteinkinase B.....	48
4.4.16. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die Aktivität der Proteinkinase B, p-38 und ERK2	49
5. Diskussion	52
5.1. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Aggregation	52
5.2. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung	53
5.3. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Sekretion.....	53
5.4. PDGF-Rezeptor abhängige Signalwege	55
5.4.1. Die Rolle der MAPKinasen ERK2 und p38, der Proteinkinase B (Akt) und von Src in PDGFR-abhängigen Signalwegen	55
5.4.2. Die Rolle des G _i - oder G _q -Signals für die PDGFR-abhängige ERK2-Aktivierung.....	57

5.4.3. Die Rolle der Phosphoinositol-3-Kinasen für die PDGFR-abhängige ERK2-Aktivierung.....	58
5.5. Problematik der verschiedenen PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren	60
5.5.1 Aggregation und Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Kinasen unter Vorinkubation mit AG17	60
5.5.2. Aggregation und Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Kinasen unter Vorinkubation mit AG1478	61
5.6. Zusammenfassung	63
5.7. Ausblick	64
5.8. Übersicht von PDGFR-abhängigen Signalwegen	65
6. Literaturverzeichnis (alphabetisch nach Erstautor)	66
7. Thesen der Dissertation	76
Tabellarischer Lebenslauf.....	VII
Selbständigkeitserklärung	IX
Erklärung über Promotionsversuche	IX
Danksagung	X

Abkürzungen

AC	Adenylylzyklase
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARC69931MX	P2Y12-Inhibitor
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinasefamilie, auch bekannt als PKB
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosine 5'-triphosphat
AG1296	Tyrphostin, spezifischer PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor
AG17	Tyrphostin, spezifischer PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor
AG1478	Tyrphostin, spezifischer EGF- und PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor
AS-252424	PI-3-Kinase p110 γ -Inhibitor
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD61	Cluster of differentiation für Integrin β_3
CD62	Cluster of differentiation für p-Selektin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemiluminescence system, Western-Blott-Detektionssystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor (Rezeptor des)
ERK1/2	Extracellulär regulierte Kinase, Mitglied der MAP-Kinasenfamilie
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoreszin Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht bei FACS (<i>forward light scatter</i>)
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor (<i>glycoprotein-coupled receptor</i>)
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethyan-Sulfonsäure
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MRS2179	P2Y1-Inhibitor
NC	Nitrozellulose
PAC-1	monoklonaler Antikörper gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF AA/AB/BB	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	PDGF-Rezeptor

PI-3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PKB	Proteinkinase B
PP2	Src-Inhibitor
PP3	Kontrollsubstanz zu PP2 ohne Src-Inhibition
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>runs per minute</i>)
P-p38	Phospho p-38, Enzym aus der MAPKinasen- Familie
PRP	plättchenreiches Plasma
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Dodecylsulfat Natrium-Salz
SH2/SH3	Proteinmodule, die Phosphotyrosin erkennen (<i>Src homology domains</i>)
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylendiamine
Thr/ml	Thrombozyten pro Milliliter
TGX-221	PI-3-Kinase p110 β Inhibitor
TP- α	Thromboxan-Prostaglandin Rezeptor- α
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U0126	MEK-Inhibitor
U0124	Kontrollsubstanz zu U0126 ohne MEK-Inhibition
U46619	synthetischer Thromboxan A ₂ -Analogon
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight/volume</i>)

Verwendete Maßeinheiten

A, mA	Ampere, Milliampere
°C	Grad Celsius
E	Volt/Meter
g, mg, μ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Gravitationskonstante ($m^3kg^{-1}s^{-2}$)
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, μ M, nM	Moll, Millimoll, Mikromoll, Nanomoll
min	Minuten
pH	potentia hydrogenii
s	Sekunden
V, mV	Volt, Millivolt

Referat und bibliographische Beschreibung

„Blut ist ein ganz besonderer Saft“ schrieb J.W.v.Goethe [*28.08.1749 †22.03.1832] in seinem monumentalen Werk „Faust“. Eine bedeutende Rolle kommt dabei einem wichtigen Teil des Blutes, den Thrombozyten, zu. Sie sind in die Pathomechanismen von führenden Zivilisationskrankheiten wie Apoplex und instabile Angina pectoris verwickelt. Thrombozyten produzieren einen Wachstumsfaktor, PDGF, der für viele Zellen einen entscheidenden proliferativen Reiz darstellt. Frühere Studien haben gezeigt, dass PDGF hemmend auf die Aggregation der Thrombozyten wirkt.

Die hier vorgestellten Studien sollten Verständnis für die PDGFR- vermittelte Hemmung der Aggregation sowie die dabei einbezogenen Signalkaskaden anhand von Experimenten mit einem spezifischen PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor, AG1296, erweitern. Hierzu wurden solche zentrale Enzyme des Thrombozyten wie ERK2, p38, Proteinkinase B (Akt) untersucht. Die Bedeutung modulierender Einflüsse anderer Enzyme wie Src, PI-3-Kinasen p110 β und γ sowie MEK wurde mithilfe der jeweils spezifischen Inhibitoren exploriert.

Vom besonderen Interesse war der Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Sekretion sowie die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Diese Zielsetzung konnte mittels Durchflusszytometrie umgesetzt werden. Um auf die Problematik des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 einzugehen wurden zwei weitere Inhibitoren eingesetzt und die Aktivierungsmuster der intrazellulären Kinasen wie ERK2, p38 und Akt miteinander verglichen.

Im Ergebnis zeigte sich eine Steigerung der Aggregation, der Sekretion und der Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unter Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1296. An den von uns untersuchten Enzymen konnte eine deutliche Zunahme der ERK2-Aktivität bei unveränderter Aktivität von p38 und Akt festgestellt werden. Die Zunahme der ERK2-Aktivität war dabei abhängig von MEK und PI-3-Kinase p110 β und unabhängig von Src und PI-3-Kinase p110 γ . Desweiteren war die Zunahme der ERK2-Aktivität vom Gi- und nicht von Gq- Signal anhängig.

Parallele Untersuchung der drei verschiedenen PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (AG17, AG1296 und AG1478) zeigte ein ähnliches Aktivierungsmuster der intrazellulären Kinasen wie ERK2, p38 und Akt für AG1296 und AG1478.

Da bei unseren Versuchen hohe Konzentrationen von AG17 erforderlich waren, um einen Effekt auf Thrombozyten nachzuweisen, müssen wir davon ausgehen, dass dieser Inhibitor in seiner Wirkung eher unspezifisch ist und die erzielten Ergebnisse nicht auf der Hemmung des PDGF-Rezeptors alleine beruhen.

Groß, Willi: Inhibition der PDGF-Rezeptortyrosinkinase in humanen Thrombozyten:

funktionelle Aspekte und PI-3-Kinase abhängige Aktivierung von ERK2

Halle, Univ., Med.Fak., Diss., 76 Seiten, April 2010

1. Einleitung

Thrombozyten, die als 2-5µm große, kernlose Abschnürungen der Megakaryozyten in die Blutbahn entlassen werden und selbst eine mittlere Lebensdauer von ca. 8 Tagen haben, sind überlebenswichtig für unseren Organismus. Die Abb.1 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Thrombozyten. Durch die Adhäsion von Thrombozyten an Strukturen der Gefäßwand mit Aggregation und Thrombenbildung (weißer Thrombus) spielen sie die entscheidende Rolle für die primäre Hämostase im arteriellen Stromgebiet. Unter pathologischen Bedingungen, die entweder die Thrombozytenzahl (Thrombozytose oder Thrombozytopenie) oder aber die Thrombozytenfunktion (Thrombasthenien) betreffen können, ist die Hämostase aus der Balance gebracht und es entsteht eine Fülle verschiedenster klinischer Krankheitsbilder. Oft wird die Bildung von Gefäßverschlüssen beobachtet, die durch Atherosklerose und Plaqueruptur ausgelöst wird, wobei die Thrombozyten zur Thrombusbildung entscheidend beitragen. Somit sind Thrombozyten der entscheidende Faktor bei Zivilisationskrankheiten wie Apoplex, instabile Angina pectoris und Myocardinfarkt (Goldschmidt et al. 2002). Thrombozyten sind aber auch an anderen Formkreisen von Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen und malignen Erkrankungen beteiligt. Zu den bekanntesten Autoimmunerkrankungen zählt der Morbus Werlhof, der mit Bildung von Autoantikörpern gegen Thrombozyten einhergeht. Im Rahmen der malignen Erkrankungen kommt es häufig zu einer essentiellen Thrombozytämie und daraus resultieren Thrombosen. Klinisch ist dies besonders wichtig, weil diese oft anderen tumorbedingten Symptomen vorausgehen und somit eine Erstmanifestation der Erkrankung darstellen können. Aus diesen Gründen kommt der Suche nach Medikamenten, die Thrombozytenfunktionen beeinflussen könnten eine besondere Bedeutung zu.

Die Aktivierung der Thrombozyten, induziert durch primäre Stimuli wie Thromboxan A₂, seinen Analogon U46619, ADP, Thrombin oder Collagen führen zur raschen Formänderung, *shape change*, der Thrombozyten. Die Abb. 2 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Thrombozyten im Stadium der Adhäsion. Die verschiedenen primären Stimuli entfalten ihre Effekte über unterschiedliche Rezeptoren und haben somit unterschiedliche Signalwege.

TXA₂ ist ein Metabolit der Arachidonsäure, der endogen in Thrombozyten durch das Enzym Cyclooxygenase synthetisiert wird (Samuelsson et al. 1978). TXA₂ bindet an den Thromboxan- oder Prostanoidrezeptor α (TPα), einem Mitglied der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). In Thrombozyten koppeln sowohl Gq-Proteine, als auch G_{i2/13}- Proteine an TPα. (Offermanns et al. 1994, Habib et al. 1999).

Adenosindiphosphat (ADP) ist der erste bekannte Thrombozytenagonist mit einem niedrigen Molekulargewicht. Interessanterweise bewirken niedrige ADP-Konzentrationen nur einen *shape*

change und eine reversible Aggregation. Hohe Konzentrationen von ADP als primärer Stimulus führen zu einer irreversiblen Aggregation der Thrombozyten, die mit der Aggregation unter Stimulation mit anderen Stimuli vergleichbar ist. Es nimmt dennoch eine Schlüsselstellung ein, da es aus dichten Granula sezerniert wird und die Aggregation, induziert durch andere Stimuli, um ein Vielfaches verstärken kann.

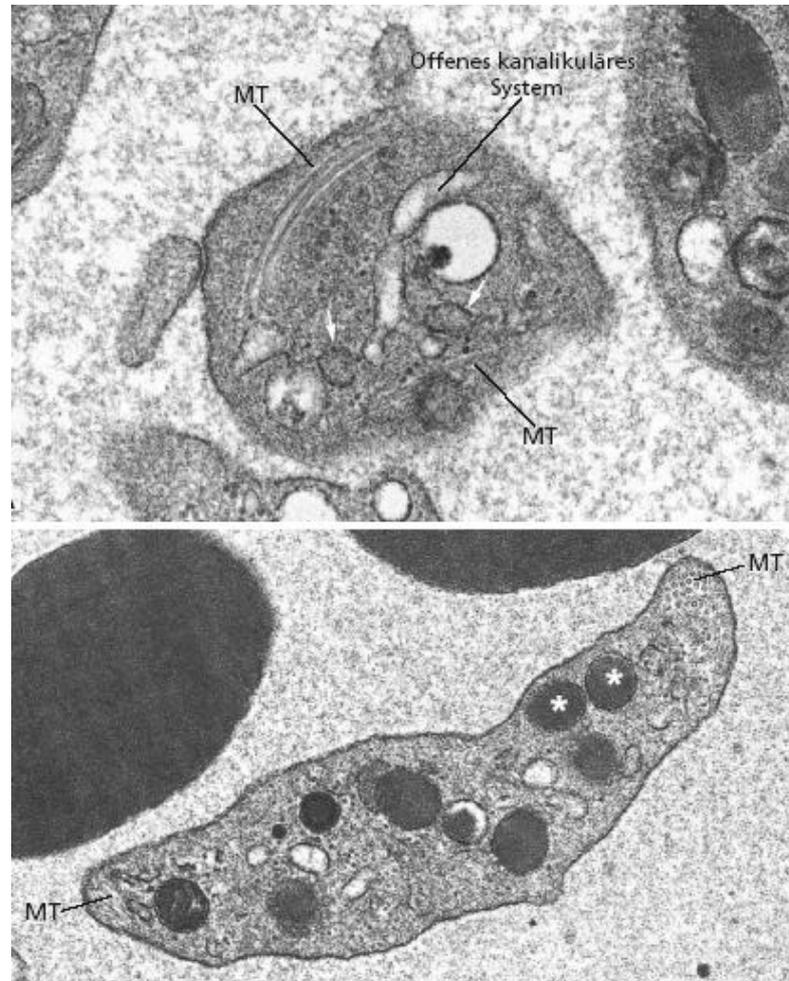


Abb.1 Thrombozyt in Längs- und Querschnitt im Lumen eines Blutgefäßes.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme modifiziert nach Pavelka et al. 2005

(Vergrößerung x 63500 und x 43500) MT=Mikrotubulus, *= α -Granula

Es sind zwei verschiedene metabotrope G-Protein gekoppelte ADP-Rezeptoren bekannt. Der P2Y1-Rezeptor ist G_q gekoppelt, wohingegen der später beschriebene P2Y12-Rezeptor, G₁₂ gekoppelt ist und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ spielt (Ohlmann et al.1995).

Die P2Y1-Rezeptoraktivierung führt zur Calciummobilisation und initiiert *shape change* und Aggregation. Die P2Y12-Rezeptoraktivierung führt einerseits zur Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), welche dann die Sekretion der dichten Granula

verstärkt und durch die α_i -Untereinheit die Adenylatcyclase hemmt, was entscheidend zur dauerhaften Aggregation und Thrombusbildung beiträgt. Die von P2Y₁₂-Rezeptor ausgehende Signalwege sind in die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors – Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ - involviert (Nieswandt et al. 2002).

Die pharmakologische Beeinflussung des P2Y₁₂-Rezeptors findet eine breite Anwendung in der Medizin. Etablierte Medikamente wie Ticlopidin und Clopidogrel inhibieren durch ihre aktiven Metabolite selektiv und irreversibel die P2Y₁₂-Rezeptoraktivierung durch ADP (Savi et al. 2005).

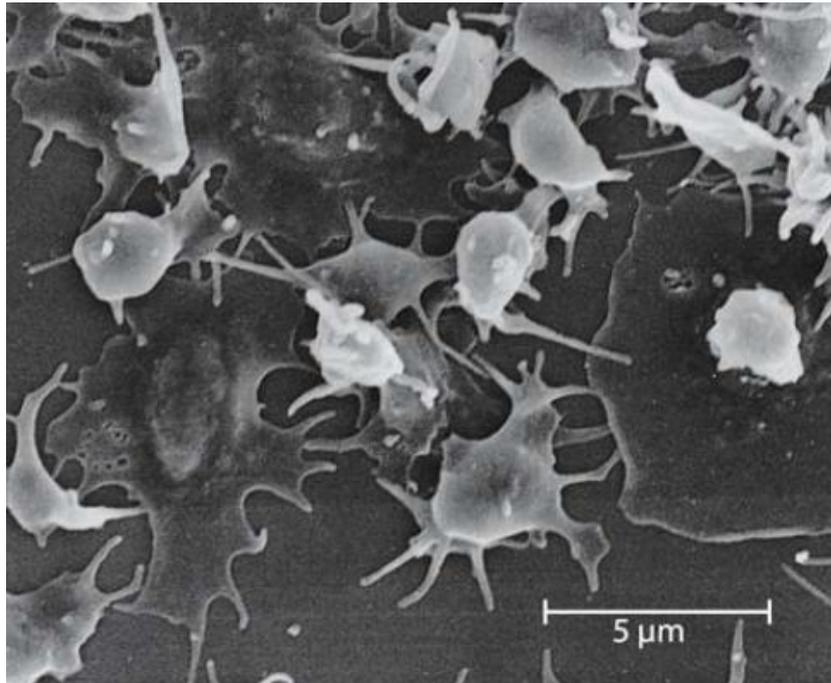


Abb.2 Aktivierte Thrombozyten im Stadium der Adhäsion. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme modifiziert nach Schmidt et al. 2007

Des Weiteren existieren spezifische P2Y₁₂ Rezeptorantagonisten wie z.B. ARC-69931MX, mit dem generischen Namen Cangrelor. Die Rezeptorinhibition hemmt dabei die Aggregation der Thrombozyten unabhängig davon, welcher Primärstimulus sie ausgelöst hatte und zeigt die fundamentale Bedeutung des P2Y₁₂-Rezeptors für die Signaltransduktion und Aggregation (Hechler et al. 2005).

Die primäre Aktivierung der Thrombozyten durch starke Stimuli wie Thrombin oder TXA₂ führt zur direkten Aktivierung des G_q-gekoppelten Rezeptors und ist unabhängig von der nachfolgenden P2Y₁₂-Rezeptoraktivierung (Nylander et al. 2003). Auch die Antwort auf Collagen, welche über Glycoprotein VI (GPVI) geschieht, führt zur intermediären TXA₂- und ADP- Sekretion, welche dann zur Aktivierung von P2Y₁₂-Rezeptors führt (Nieswandt et al. 2001).

Für die Aktivierung der Thrombozyten durch ADP sind beide Signalwege (G_q und G_i) wichtig. Auch bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin erfolgt das einzige G_i -Signal durch das freigesetzte ADP mit nachfolgender Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors (Fälker et al. 2004).

Bei der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Sekretion der gespeicherten Substanzen wie ATP, ADP, PDGF (*platelet derived growth factor*) und Substanzen, die erst bei der Aktivierung des Thrombozyten produziert werden, wie z.B. Thromboxan A₂ (TXA₂). Dies ist ein wesentliches Aktivierungsereignis der Thrombozyten. Die Funktion von ATP und ADP besteht in der Verstärkung und Aufrechterhaltung der Thrombozytenaggregation via Interaktion mit speziellen Rezeptoren und der nachfolgenden Aktivierung verschiedener Signalwege.

Doch was genau ist PDGF und welche Funktion hat er für die Thrombozyten selbst?

In den späten 70er Jahren gelang die Isolierung des gereinigten PDGF. Über die nächsten 15 bis 20 Jahre zeigten die Studien, dass es zwei verschiedene Gene für PDGF - α und β - sowie 3 biologisch aktive Isoformen PDGF-AA, -BB und -AB existieren (Hammacher et al. 1988; Hart et al. 1990). In den letzten 8 Jahren wurden weitere Mitglieder der PDGF-Familie PDGF-CC und -DD nachgewiesen (Fredriksson et al. 2004). Biochemische Untersuchungen an verschiedenen Zellkulturen lieferten wichtige Erkenntnisse über Rezeptortyrosinkinasen und die Signalwege stromabwärts des Rezeptors.

PDGF, welcher aus α -Granula freigesetzt wird, ist ein 30 kDa schweres, durch Disulfidbrücken miteinander verbundenes dimeres Peptid, das aus A-, B-, C- und D- Ketten besteht und folglich als ein Homo- oder Heterodimer vorliegen kann.

Ähnlich den verschiedenen PDGF-Dimeren gibt es zwei verschiedene PDGF-Rezeptoren: PDGF- α und - β Rezeptor. Die beiden Rezeptoren haben eine ähnliche molekulare Größe von 170 kDa (PDGF-R α) und 180kDa (PDGF-R β). Extrazellulär besitzen beide Rezeptoren fünf Immunoglobulinähnliche Domänen und intrazellulär eine Tyrosinkinasedomäne (Claesson-Welsh et al. 1989; Matsui et al. 1989). Die PDGF-Rezeptoren zeigen ein unterschiedliches Bindungsverhalten bezüglich der PDGF-Dimere. So können an PDGF-Rezeptor- α beide PDGF- α und - β binden, wohingegen an PDGF-Rezeptor- β nur PDGF- β . Verschiedene Gewebe exprimieren bestimmte PDGF-Rezeptoren. Die humanen Thrombozyten exprimieren nur den PDGF-Rezeptor- α . Die Struktur der PDGF-Rezeptoren ist ähnlich der des *colony stimulating factor* CSF (Coussens et al. 1986) und der des *stem cell factor* SCF (Yarden et al. 1987). Die Bindung des PDGF an den Rezeptor führt zur Rezeptordimerisierung und Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität, die den dimerisierten Rezeptor phosphoryliert. Diese Autophosphorylierung dient als Andockungsstelle für Signalmoleküle, die SH₂-Domänen enthalten. Die Rezeptorphosphorylierung initiiert dann eine Reihe von Signalwegen, die schließlich zu biologischen Antworten führen.

In den Untersuchungen an Zellkulturen wurde demonstriert, dass PDGF unabhängig von dem PDGF-Rezeptor ähnliche zelluläre Antworten hat in Zellen, die entweder nur PDGFR- α oder - β exprimieren. Obwohl auch einige Unterschiede berichtet wurden, überwiegen bei weitem die ähnlichen oder sogar übereinstimmenden Effekte (Rosenkranz et al. 1999).

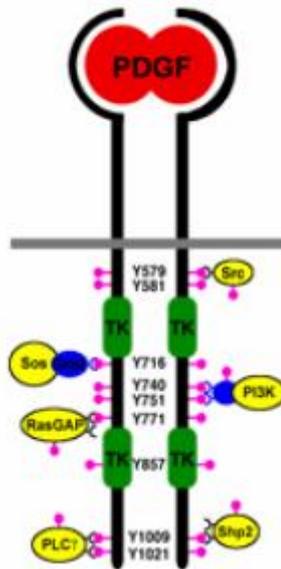


Abb.3 Schematische Darstellung des PDGF-Rezeptors nach Bindung des PDGF.

Die Abbildung wurde modifiziert nach Raleigh Labor, USA und zeigt schematisch eine Autophosphorylierung des Rezeptors durch eine intrinsische Tyrosinkinase sowie verschiedene Andockungsstellen für SH2-Domänen.

In neuester Zeit werden nun ähnliche Experimente anstelle von Zellkulturen an komplexen Organismen wie z.B. Mäusen durchgeführt. In den Studien an gentechnisch veränderten Mäusen wurde gezeigt, dass PDGF von fundamentaler Bedeutung für die embryonale Entwicklung ist. Dabei wurde den Mäusen entweder das Gen für PDGF oder für den Rezeptor ablatiert. Diese Experimente zeigten, dass die Inaktivierung der β -Kette des PDGF (Leveen et al. 1994) oder des β -Rezeptors (Soriano et al. 1995) zu Missbildungen der Blutgefäße und einem kompletten Fehlen der Mesangiumzellen in den Nieren führen.

Die genetisch veränderten *knock-out*-Tiere, denen die α -Kette des PDGF fehlt, entwickeln hingegen defekte Alveoli der Lunge mit einem emphysemähnlichen Bild. Eine Inaktivierung des α -Rezeptors führt zu schweren kranialen Missbildungen. All diese Tiere sind entweder schon bei der Geburt nicht lebensfähig, oder können nur wenige Tage bis Wochen überleben. (Soriano et al. 1997)

Für den Menschen ist PDGF ein potentes Mitogen und chemotaktischer Faktor für Zellen mesenchymalen Ursprungs. PDGF beeinflusst als Wachstumsfaktor die Proliferation der Fibroblasten und fördert somit den Gefäßverschluss.

Die Untersuchungen an humanen Thrombozyten mittels Vorinkubation mit PDGF haben gezeigt, dass PDGF einen hemmenden Einfluss auf die Aggregation hat (Vassbotn et al. 1994). Doch wie wird der hemmende PDGF-Einfluss auf die Aggregation auf der Ebene der Signalwege umgesetzt und welche andere funktionelle Effekte spielen dabei eine Rolle? Um an diese Fragen besser herangehen zu können fragen wir uns welche zentralen Moleküle der Signalwege sind in Thrombozyten bekannt und könnten sie nicht auch eine Rolle für die PDGF-abhängigen Signalwege spielen? Solche zentralen Enzyme sind die Phosphoinositol-3-Kinasen (PI-3Kinasen), die MAP-Kinasen, die Proteinkinase B (Akt) und die Src. Erstgegannt ist die Familie der PI-3-Kinasen, die durch Tyrosinkinase Rezeptoren aktiviert werden und zur Familie der Lipidkinasen zählen. Grundsätzlich kann man zusammenfassen, dass ihre Funktion in der Generierung von Phosphatidylinositolphosphaten ($PI(3,4,5)P_3$ und $PI(3,4,)P_2$) als „second messenger“ liegt, die dann die Rekrutierung von Signalmolekülen mit pleckstrinhomologen Domänen erleichtern (Schoenwaelder et al. 2007).

Es ist etabliert, dass Thrombozyten 4 Isoformen der PI-3-Kinasen in hohen Mengen exprimieren. Drei davon gehören der Klasse I (p110 α , p110 β und p110 γ) und eine der Klasse II (PI-3K-C2 α). Die Einteilung in verschiedene Klassen geschieht dabei abhängig von ihrer Struktur, Regulationsmodus und Substratspezifität.

Die Klasse I gehört zu den am besten untersuchten PI-3-Kinasen, wohl wegen ihrer Funktion an der Regulation so wichtiger Prozesse wie Proliferation, Glukosemetabolismus, Migration und Überleben der Zellen. Man unterscheidet regulatorische Untereinheiten wie p85 α , p85 β , p55 α , p55 β , p55 γ und p50 α , die durch Tyrosinkinase gekoppelte Rezeptoren reguliert werden (Wymann et al. 1998; Meier et al. 1999).

Die p110- γ enthält dabei die Untereinheiten p84 und p101, welche durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert werden, ganz besonders durch G $\beta\gamma$ i-Untereinheit (Vanhaesebroeck et al. 1999).

Es wurde gezeigt, dass es in Thrombozyten auch zur Expression von PI-3-Kinase p110 δ kommt, allerdings in viel geringem Ausmaß als z.B. in Leukozyten (Zhang et al. 2002).

Obwohl die Phosphoinositide eine Schlüsselrolle für die funktionelle Antworten vieler hämatopoetischer Zellen spielen, ist ihre Rolle in der Hämatostase und in der Thrombose noch nicht eindeutig geklärt (Jackson et al. 2004).

Zwei Typen der PI-3-Kinase-Isoformen (p110 β und p110 γ) sind durch noch unbekannte Mechanismen an der Regulation des Integrin α IIb β 3 beteiligt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die primär Integrin α IIb β 3 regulierende PI-3-Kinase, die G $_i$ -abhängige p110 β - Isoform ist (Schoenwaelder et al. 2007).

Ein anderes der potentiellen Substrate der PI-3-Kinase ist die Serin-Threonin Proteinkinase B. Es stehen gegenwärtig mehrere isoformspezifische PI-3-Kinaseinhibitoren wie TGX-221(p110 β -Inhibitor), AS252424 (p110 γ -Inhibitor) und unspezifische PI-3-Kinaseinhibitoren

wie z.B. Wortmannin, der alle Isoformen hemmt zur Verfügung. Mit Hilfe der spezifischen Inhibitoren ist es möglich, den einzelnen Signalwegen, die daran beteiligte Isoformen der PI-3-Kinase zuzuordnen.

Eine weitere wichtige Klasse der Kinasen ist die Familie der MAP-Kinasen. Humane Thrombozyten enthalten dabei mehrere Mitglieder der Familie der Mitogen aktivierten Kinasen (MAPK), wie z.B. p38 MAP-Kinase (Kramer et al. 1995), c-Jun Kinasen (JNK) (Bugaud et al. 1999), extracellular signal regulated Kinases (ERK1 und ERK2) (Papkoff et al. 1994) und die stromaufwärts von ERK1 und ERK2 liegenden MEK1 und MEK2 (McNicol et al. 2001). Die MAP-Kinasen gehören zu der Familie der Serin-Threonin Kinasen, die nicht nur zu den evolutionär konserviertesten Kinasen dieses Typs zählen, sondern auch für viele Funktionen der Säugertierzelle wie z.B. Zelldifferenzierung, Zellbewegung und Proliferation sowie Genexpression wichtig sind. Sie steuern eine Reihe von Molekülen im Zytosol, Zytoskelett, Mitochondrien und in der Zellmembran. Einige der am besten untersuchten Vertreter dieser MAP-Kinasen sind die ERK1 und ERK2, auch bekannt als p44-MAPK und P42-MAPK.

Die Aktivierung der MAP-Kinasen geschieht durch einen Signalweg, bei dem es nachfolgend zu einer Aktivierung eines kleinen GTP-bindenden Proteins, Ras und Raf-Isoformen b-Raf und c-Raf kommt. Die Zunahme der Raf-Aktivität führt über das MEK/ERK Modul zu ERK Aktivierung. Der gegenwärtigen Lehrmeinung nach werden die MAP-Kinasen nach der Thrombozytenaktivierung durch die MEK1/2 zuerst an dem Tyrosin 185 (Y185) und anschließend an Threonin 183 (T183) phosphoryliert. Das dual phosphorylierte Enzym ist aktiv (Pearson et al. 2001, Roux et al. 2004).

Nun kommen wir zu einer Kinase mit einer zentralen Rolle für viele Zellen, der Src-Kinase. Das menschliche Genom kodiert für neun Mitglieder der Src-Familie. Diese Proteine sind eng miteinander verwandt und werden wahrscheinlich durch ähnliche Mechanismen reguliert. Historisch gesehen war das Src-Protein die zuerst entdeckte Tyrosinkinase. Tyrosinkinasen spielen eine kritische Rolle in der Signalübertragung in Zellen des multizellulären Organismus. Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die Erkennung von Phosphotyrosin durch kleine Proteinmodule, genannt SH2-Domänen (*Src homology domains*), die zuerst in Proteinen der Src-Familie entdeckt wurden. Universell kommt es nach der Bindung von Liganden an den Rezeptor zur Aktivierung der Tyrosinkinasen, die die Thyrosinreste der Proteine phosphorylieren. Diese intrazelluläre Phosphotyrosinreste agieren ihrerseits als „*beacons*“, die die Bindung von SH2-enthaltenden Signalproteinen an den Rezeptor ermöglichen. Die Src-Kinase hat eine Struktur, die aus zwei peptidbindenden Domänen und einer katalytischen Kinase-Domäne besteht. Eine der peptidbindenden Domänen ist die SH2-Domäne und die andere ist die SH3-Domäne, die Polyprolin-Helices erkennt. Die intrazelluläre Src-

Kinase (c-Src) ist normalerweise autoinhibiert durch Interaktion zwischen SH2-Domäne und der katalytischen Kinase-Domäne und damit mit dem C-terminalen Phosphotyrosinrest Tyr-527 (Abb. 4).

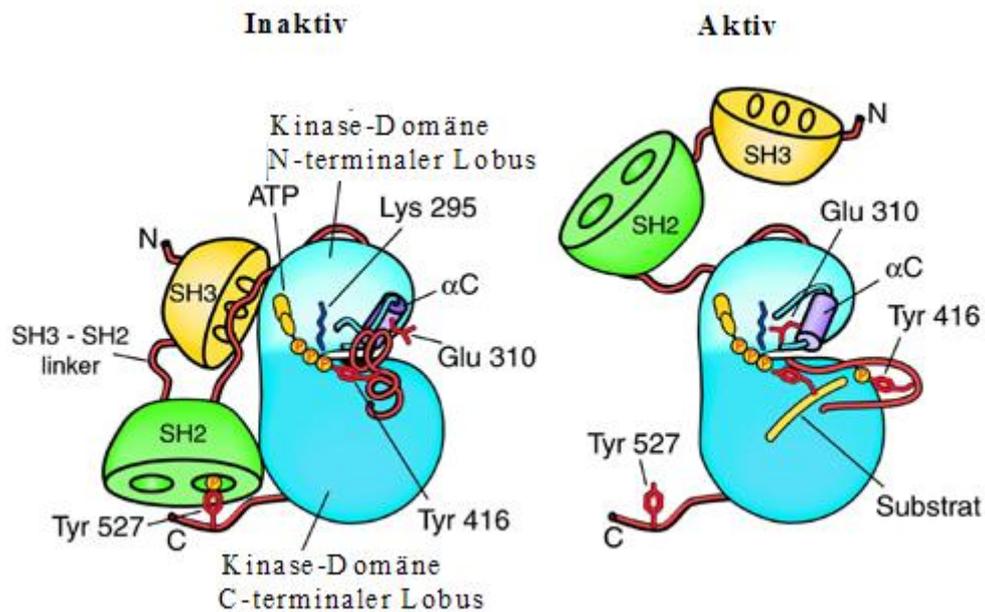


Abb. 4 Schematische Darstellung von Autoinhibition von Src;

modifiziert nach Young et al. 2001

Die onkogene Form der Src-Kinase (v-Src), die durch *Rous Sarcoma Virus* kodiert wird, ist konstitutiv aktiv. Im Gegensatz dazu ist die intrazelluläre Src-Kinase inaktiv bis sie adequat aktiviert wird. Doch weder SH2-, noch SH3-Domäne vermag die Kinase-Domäne direkt zu blocken. Nichtsdestotrotz, ist die katalytische Aktivität der Src-Kinasen deutlich reduziert, wenn SH2- und SH3-Domänen gebunden an das aktive Zentrum vorliegen.

Nachdem wir nun auf die wichtigen Enzyme, die in die PDGF-abhängigen Signalwege involviert sein könnten eingegangen sind, stellt sich die Frage, ob es noch weitere funktionelle Aspekte der PDGF-Rezeptoraktivierung und der Hemmung der Thrombozytenaggregation gibt und wie diese auf molekularer Ebene bewerkstelligt werden. Dazu müssen wir uns erinnern, dass bei der Aktivierung der Thrombozyten die Interaktion von Zelle zu Zelle und Zelle zu Matrix von entscheidender Bedeutung sind. Diese werden bei den Thrombozyten durch einen spezifischen Rezeptor der Intergrinfamilie, Glycoprotein IIb-IIIa, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bewerkstelligt. Integrine sind eine Familie von Adhäsionsmolekülen, die Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen medieren. Obwohl es acht verschiedene β -Untereinheiten der Integrine gibt, sind nur zwei β_3 -Integrine bekannt. Das Integrin β_3 kommt nur in Thrombozyten, Megakaryozyten und einigen Tumorzellen vor. Bei Thrombozyten ist das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ein Plasmamembranproteinkomplex, das in 80 000 bis 100 000 Kopien auf der Oberfläche vorliegt. Die zentrale Funktion von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist seine Fähigkeit aktiviert zu werden und dabei von einem

Zustand der niedrigen Affinität zu seinen extrazellulären Liganden in einen Zustand der hohen Affinität überzugehen. Diese Transformation erlaubt die Bindung des Fibrinogens oder des von Willebrand Faktors, die ihrerseits als Brückenmoleküle zu weiteren Thrombozyten zu dienen.

Schliesslich können wir die heute nun unverzichtbaren Werkzeuge der PDGF-Forschung – die PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren – nicht unerwähnt lassen. Da die Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren so wichtig für unseren Organismus sind, wurden Substanzen gefunden, die diese Rezeptoren zu hemmen vermochten. Im Laufe der Jahre wurden viele verschiedene PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt. Die Ergebnisse der Forschung der letzten Jahre zeigten, dass einer unter ihnen, AG1296, besonders spezifisch und potent war. Er gehört zu der Gruppe der Tyrophostine und gilt als der PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor schlechthin. AG1296 hemmt mit hoher Spezifität die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors. Auch frühere Generationen der Tyrophostine mit dem PDGFR-hemmenden Effekt sind kommerziell erhältlich. Andere Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, wie z.B. EGFR-Inhibitor AG1478, können ebenfalls den PDGFR hemmen. Dies erfolgt jedoch bei weit höheren Konzentrationen als für die Hemmung der Rezeptoren, für die sie als spezifische Inhibitoren gelten.

2. Zielsetzung

Bei bisher vorwiegend untersuchten direkten PDGF-Einflüssen durch Vorinkubation der Thrombozyten mit PDGF setzten wir einen PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor AG1296 ein und stellten folgende Ziele auf:

1. Nachweis des Einflusses des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aggregation sowie seine Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors.
2. Nachweis des Einflusses des AG1296 auf die Sekretion sowie seine Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors.
3. Einfluss des AG1296 auf die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.
4. Einfluss des AG1296 auf die Aktivität der MAP-Kinasen (ERK2 und p-38) und der Proteinkinase B (Akt).
5. Untersuchung der Bedeutung der PI-3-Kinasen p110 β/γ für die PDGF-abhängigen Signalwege.
6. Untersuchung der Bedeutung der Src-Kinase für die PDGF-abhängigen Signalwege.
7. Untersuchung der Aggregation und der PDGFR-abhängigen Signalwege anhand von zwei weiteren PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren AG17 und AG1478.

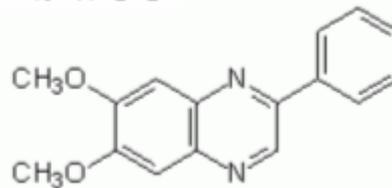
3. Material und Methoden

3.1. PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren mit Strukturformel

AG1296 (Calbiochem, Deutschland) 6,7-Dimethoxy-3-Phenylquinoxalin

Molekulargewicht (kDa) 266.3

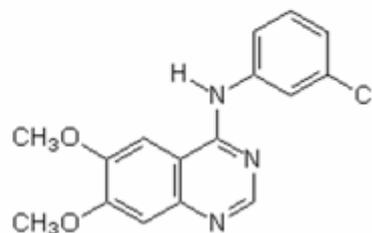
Chemische Formel $C_{16}H_{14}N_2O_2$



AG1478 (Calbiochem, Deutschland) 4-(3-Chlorophenylamino)-6,7-Dimethoxyquinazolin

Molekulargewicht (kDa) 315.8

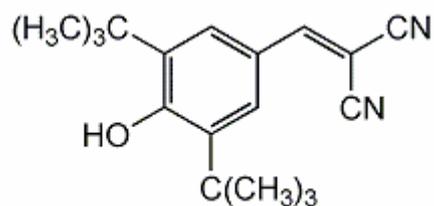
Chemische Formel $C_{16}H_{14}ClN_3O_2$



AG17 (Calbiochem, Deutschland) (3,5)-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene Malonitril

Molekulargewicht (kDa) 282.4

Chemische Formel $C_{18}H_{22}N_2O$



3.2. Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck
ARC69931MX (Cangrelor)	AstraZeneca
AS252424 (5-Furan- 2-ylmethylen-Thiazolidin-2,4-dion)	Cayman
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Sigma
CD61 (Antiintegrin $\beta 3$) Peridinin-Chlorophylprotein	BD Biosciences
CD62P (Phycoerythrin)	BD Biosciences
Coomasie-Brilliant Blau R250	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
ECL (enhanced chemiluminescence system)	Amersham Bioscience
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Epinephrin (Adrenalin)	Sigma
HEPES (N-2-hydroxiethylpiperazin-N'-2-ethyan-sulfonsäure)	Roth
Hirudin	Loxo
Isopropanol	Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma
MRS2179(N-Methyl-2'-deoxyadenosin-3'5'Bisphosphat)	Tocris
NaHCO ₃ (Natriumtrihydrogencarbonat)	Merck
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck
PAC-1 (Fluorescein-Isothiocyanat)	BD Biosciences
Ponceau S (3-hydroxy-4-2,7-naphtalen-disulfonsäure)	Sigma
PP2 (4-amino-5-7-butyl-Pyrazolopyrimidin)	Calbiochem
PP3 (4-amino-7-phenyl-Pyrazolopyrimidin)	Calbiochem
SDS (Dodecylsulfate Natrium-Salz)	Serva
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamine)	Sigma
TGX-221 (7-methyl-2-9-4H-pyridol-pyrimidin-4-on)	Cayman
Tri-Natrium-Dehydrat	Merck
Tris (Tris-(hydroximethyl)-aminomethan)	Roth
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma
U0124 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-Bisbutadien)	Cell Signalling
U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-Bisbutadien)	Cell Signalling
U46619 (9,11-dideoxy-11 α , 9 α -epoxymethanoprostaglandine(F2 α))	Sigma
Wortmannin	Sigma

3.3. Geräte und Materialien

Gerät	Bezugsquelle
Aggregometer (Platelet aggregation profiler)	Bio/Data Corp.
Blotkammer (Mini-Trans-Blot- Elektrophoresekammer)	Biorad
Densitometer GS800 und Quantity one® Software	Biorad
Ependorff-Thermomixer	Ependorff
Glasküvetten, silikonisiert	Mölab. Langenfeld
FACScalibur	Becton Dickinson

3.4. Thrombozytenpräparation

Nach Erhalt der freiwilligen Einwilligung gemäß der Ethikkommissionsbestimmungen der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg, wurde den gesunden Blutspendern 60-80ml venöses Blutes aus einer oberflächlichen Armvene (V.cubitalis), unter Einhaltung medizinischer Desinfektion und der Verwendung von 21 Gauge Butterfly (Becton Dickinson, Helsingborg, Sweden) und 20ml steriler Einwegspritzen (Braun, Melsungen, Deutschland) abgenommen. Die Blutspender mussten bestätigen, dass sie in den 14 Tagen vor der Spende keine Medikamente eingenommen hatten.

Die Thrombozytenpräparation wurde durchgeführt nach der im Folgendem beschriebenen Methode (Fälker et al. 2004). Das Blut wurde im Verhältnis 6:1 zu ACDA-Lösung (*Acid-Citrate-Dextrose formula A*: 38mM Citratsäure, 88mM Natriumcitrat, 124mM Glukose) in 13 ml Zentrifugenröhrchen überführt (95x16.8mm im Durchmesser, Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland) und bei 120 g 15 Minuten lang zentrifugiert.

Dem so gewonnenem Plättchenreichenplasma (PRP) wurden 111µl ACD-A pro ml PRP hinzugefügt und anschließend bei 450g 10 min zentrifugiert. Das so gewonnenen Sediment wurde in modifiziertem Tyrodewaschpuffer (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Hepes, 0,36mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml Glukose, pH 6.4) unter Zusatz von 1 U/ml Apyrase und 1U/ml Hirudin resuspendiert. Anschließend wurden die resuspendierten Thrombozyten für 15 in in 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden sie zentrifugiert und die Waschung 2 mal wiederholt, wobei der Waschpuffer kein Hirudin mehr enthielt.

Schließlich wurden die Thrombozyten mit Suspensionspuffer (pH 7,4; 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ und 0,02U/ml Apyrase) resuspendiert. Nach der Bestimmung der Thrombozytenzahl in Neubauer-zählkammer wurden die Thrombozytenkonzentrationen für die jeweiligen Versuche standardisiert eingestellt (siehe Bestimmung der Zellzahl). Alle Schritte dieser Thrombozytenpräparation wurden bei Raumtemperatur vorgenommen. Für die Zentrifugation verwendeten wir eine Hermle Z364 Zentrifuge (Hermle, Wehingen, Deutschland). Hirudin wurde im ersten Waschschrift dazugegeben um Spuren von Thrombin abzufangen. Die

Nucleotidase Apyrase, vorhanden in allen Waschpuffern und im Suspensionspuffer, degradiert ADP und ATP. Die auf 5×10^8 Thr/ml eingestellte Thrombozytensuspension ruhte schließlich 30 min lang bei 37°C im Wasserbad um die Erholung des P2Y1 Rezeptors zu ermöglichen (Baurand et al. 2000, Cazenave et al. 2004). Alle experimentell angewendeten Substanzen wurden in Suspensionspuffer gelöst. Für die im Wasser nicht löslichen Substanzen, wurden die Kontrolllösungen untersucht.

3.5. Bestimmung der Zellzahl der isolierten Thrombozyten

Nach dem letzten Schritt der Präparation werden die Thrombozyten in ein gemeinsames Röhrchen überführt. Aus diesem Röhrchen werden 10µl Thrombozytensuspension entnommen und 1:100 mit Suspensionspuffer verdünnt. Davon werden wiederum 10µl in eine Neubauerzählkammer pipetiert und anschließend unter dem Mikroskop 3 Gruppenquadranten ausgezählt. Der Mittelwert dient zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter der Thrombozytensuspension (Mittelwert x 100 x 250000 x (Verdünnungsfaktor)).

3.6. Thrombozytenaggregation

Die isolierten Thrombozyten wurden im Suspensionspuffer auf die Thrombozytenzahl von 3×10^8 Thr/ml eingestellt. Für die Versuche wurde das Aggregometer (PAP4 Bio/Data Corp., Hatboro, PA, USA), silikonisierte Glasküvetten und Magnetrührer benutzt. Die Methode basiert auf der Extinktionsmessung des durch die Glasküvette durchgehenden Lichtstrahls. Zur Messung werden 198µl Thrombozytensuspension, 11µl gelöster Vorinkubationssubstanz und 11µl Agonist in das silikonisierte Glasröhrchen dazugegeben. Unter ständigem Rühren (900rpm) im Aggregometer erfolgte die Messung nach der Methode von Born (1962). Die Messung beginnt mit der Zugabe des Agonisten und endet wenn keine Veränderung im Aggregationsverlauf mehr zu erkennen ist.

Bei der Stimulation der Thrombozyten mit einem Agonist wie Thrombin oder TXA₂ durchlaufen sie eine Formänderung „*shape change*“, wobei sie von der ursprünglich sphärischen oder diskoiden Form durch Ausbildung von Filopodien (Abb. 2) ihr Volumen vergrößern und die Lichttransmission vorübergehend abnimmt. In der nachfolgenden Aggregation bilden sie immer größer werdende Aggregate, was wiederum zu einer Zunahme der Lichttransmission führt. Dabei stellt die Aggregation den Prozentsatz der Lichttransmission verglichen mit Suspensionspuffer (=100%).

Vorinkubationen wurden in silikonisierten Glasröhrchen, bei 37°C im Ependorff-Thermomixer und 700 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

Thrombozytenaggregationsprofile, induziert durch Thrombin, Collagen oder U46619, wurden im Anschluß an jede Thrombozytenpräparation als interne Kontrollen zur Sicherung der Qualität jeder einzelnen Präparation durchgeführt.

3.7. Thrombozytenstimulation, Detektion und Quantifizierung der phosphorylierten

Proteine

Für Versuche, die die Proteinphosphorylierung bestimmen sollten, wurden Thrombozyten mit Suspensionspuffer auf eine Konzentration von 5×10^8 Thr/ml eingestellt.

Vorinkubationen, Kontrollen und Stimulation wurden in 200µl Thrombozytensuspension (Totalvolumen, welches sich aus 180µl Thrombozytensuspension, 10µl Vorinkubation und 10µl Stimulation zusammensetzt) bei 37 °C in 2ml „round bottom“ Eppendorffer im Eppendorff-Thermomixer und 700 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit 50µl SDS Puffer (10% SDS, 1,43M β-Merkaptoethanol, 20% Glycerin, 26% Harnstoff, 125mM Tris-HCl, pH=6,8) gestoppt und die Proben bei 95 °C 10 Minuten lang erhitzt. Von diesen Proben wurden dann 25µl für die Westernblottanalysen benutzt.

3.8. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS Gelelektrophorese wurde entsprechend der Beschreibung von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteinseparation erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe von SDS Gelelektrophorese und des Bio Rad Minigelsystems (Biorad, München, Deutschland).

Die Zusammensetzung der Trenngele war: 33,3%(v/v) Acrylamid, 50% Tris-HCl 0,75M, 15,45% bidest H₂O, 0,7% APS und 0,05%TEMED; und die der Vorgele: 16,7%(v/v) Acrylamid, 12,5% Tris-HCl, 0,5%SDS, 0,1% TEMED, 69,7% zweifach destilliertes H₂O, 0,5% APS. Die genauen Mengenangaben für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele sind in der Tab.2 zusammengefasst.

Der Laufpuffer bestand aus 25mM Tris, 200mM Glycin und 1%SDS, pH8,3.

Um die apparenten Molekularmassen der Proteine zu bestimmen wurden folgende Markerproteine eingestzt: Myosin(205 kDa), β-Galaktosidase (116kDa), Phosphorylase (97kDa), BSA (66kDa), Katalase (60kDa), Ovalbumin (45kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (36kDa), Carboanhydrase (29kDa). Alle Markerproteine wurden von Sigma erworben.

Vor dem Auftragen wurden alle Proben für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Trennung im elektrischen Feld wird gestoppt, sobald der Farbstoff (Coomasie Brilliant Blau) aus dem Gel herausgelaufen ist. Im Anschluss werden die Proteine im Gel mit Coomasie-Färbelösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% Essigsäure (v/v), 0,05% Coomasie-R250(w/v)) gefärbt und das Gel

wieder mit 10% Essigsäure entfärbt. Ungefärbte Gele wurden zur weiteren Analyse im Westernblott verwendet.

Tab. 2 Übersicht über die Zusammensetzung der Gele für SDS-Gelelektrophorese
(Mengenangaben für jeweils 2 Gele)

Substanz	Trenngel		Sammelgel
	9%	10%	
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,375ml	3,750ml	835µl
Tris-HCl 0,75M, pH 8,8	5,625ml	5,625ml	---
Tris-HCl 0,625M, pH6,8	---	---	625µl
20%(w/v) SDS	56,5µl	56,5µl	25µl
TEMED	5,65µl	5,65µl	5µl
Aqua bidest	2,125ml	1,75ml	3,5ml
APS	79µl	79µl	25µl

3.9. Westernblott und Detektion der phosphorylierten Proteine

Nach der SDS Polyakrylgelelektrophorese mittels BioRad Mini Blots (BioRad, München, Deutschland) wurden die Proteine bei 4°C, einer Laufzeit von 2,5h und einem elektrischem Feld von 2,5mA/mm² Nitrocellulosemembran (NC) auf die NC überführt. Die Anordnung der einzelnen Lagen beim Blotten ist dabei folgende:

Anode Schwamm
 4 Lagen Filterpapier
 SDS-Gel
 Nitrozellulosemembran
 4 Lagen Filterpapier

Kathode Schwamm

Der Transferpuffer besteht aus 192mM Glycin, 27mM Tris, 20% Methanol, 0,015%SDS, pH8,3-8,4. Um den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose sicherzustellen wurden die Gele 10 min lang mit Coomassie Brilliant Blau (25%2-Propanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie-R250) gefärbt. Dadurch konnten die residualen Proteine im Gel nachgewiesen werden.

Anschließend wurden die Gele in 10% Essigsäure entfärbt. Proteine auf der Nitrozellulose wurden reversibel mit Ponceau-S-rot angefärbt und die Lage der Markerproteine mit einem weichen Bleistift auf der Nitrozellulose eingezeichnet. Die Nitrozellulose wurden anschließend mit TBS-T (10mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) entfärbt. TBS-T wurde für

alle weiteren Waschvorgänge und Verdünnungen einschließlich der der Antikörper benutzt. Alle weiteren Schritte wurden unter leichtem Schütteln ausgeführt.

Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu minimieren, wurde die Nitrozellulose bei Raumtemperatur 2h lang entsprechend dem jeweiligen Protokoll entweder mit 5% Magermilchpulver oder 5% bovinem Serumalbumin geblockt. Die NC wurde mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken vorinkubiert. Nach dreimaligem Waschen (3 mal 10 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die NC dann für 2h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper vorinkubiert. Abhängig vom ersten Antikörper wurden verschiedene Blocklösungen und verschiedene zweite Antikörper bzw. deren Verdünnungen eingesetzt. Die spezifischen Angaben zu jeweiligen Antikörpern sind in der Tab. 3 zusammengefasst.

Nach dem Auswaschen des nicht gebundenen zweiten Antikörpers (3 mal 10 min bei Raumtemperatur) wurde die Nitrocellulose mit ECL "enhanced chemiluminiscence" gemäß Herstellerprotokoll vorbehandelt. Das dahinter stehende Prinzip besteht darin, dass Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die Wasserstoffperoxidase, die an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, gebildet wird. Es resultiert daraus eine Chemiluminiszenz (Lichtemission), die dann mittels eines Röntgenfilmes über der Nitrozellulose detektiert wird. Die Belichtungszeit variiert dabei zwischen 2 und 60 s.

Tab. 3 Spezifische Antikörper, jeweilige Verdünnung und Blocken

Erster Antikörper	Geblockt in	Verdünnung 1. Antikörper (AK)	Verdünnung 2. Antikörper
Phospho-p42/44 MAPK(E10)	5% Magermilchpulver	1:500 in 5% Magermilchpulver	Anti-Maus IgG 1:1000
p-ERK(E4)	5% BSA/5% Magermilchpulver	1µg/ml in 5% BSA	Anti-Maus IgG 1:1000
ERK2(D2)	5% Magermilchpulver	0,4µg/ml in 5% BSA	Anti-Maus IgG 1:1000
Phospho-Akt (Ser473)(587F11)	5% Magermilchpulver	1:1000 in 5% Magermilchpulver	Anti-Maus IgG 1:1000
p-p38	5% Magermilchpulver	1:1000 in 5% Magermilchpulver	Anti-Maus IgG 1:1000
Anti-pY ¹⁸⁵ MAPK	5% BSA	1:1000 in 1% BSA	Anti-Rabbit IgG 1:1000
Anti-pT ¹⁸³ MAPK	5% BSA	1:500 in 1% BSA	Anti-Rabbit IgG 1:1000

3.10. Visualisierung und Quantifizierung der phosphorylierten Proteine

Die mit dem Westernblottverfahren erhaltenen Signale auf den Röntgenfilmen wurden durch GS800 Densitometer (BioRad, München, Deutschland) eingescannt. Die Intensität der Phosphorylierung wurde mittels „Quantity One“-Software, Version 4.2.1. (BioRad, München, Deutschland) bestimmt. Die Graphiken wurden anschließend mit dem Adobe Photoshop 5.0 Programm bearbeitet (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA)

3.11. Bestimmung der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Aktivierung und α -Granulasekretion mittels Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf simultaner Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Teilchen, die hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet sind und einzeln untersucht werden. Voraussetzung für die Analyse ist eine Zellsuspension und spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, die mit einem Argonlaser bei 450nm Wellenlänge angeregt werden. Das Emissionslicht der Fluoreszenzfarbstoffe kann dann gemessen werden. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die umgebene Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich die Aggregate auftrennen und die Zellen aneinander gereiht den Analysepunkt erreichen. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Der Analysepunkt ist der Ort, an dem der Laser die Zellen erfasst. Argonlaser emittiert blaues Licht, welches die durchfließenden Partikel trifft und damit die entsprechenden Fluorochrome anregt. Diese wiederum emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das durch ein System aus optischen Linsen, Filtern und Spiegeln aufgetrennt wird. Damit können 5 verschiedene Parameter detektiert werden: Vorwärtsstreulicht (FSC), als Maß für die Größe der Partikel; Seitwärtsstreulicht (SSC), als Maß für die Granularität und bis zu 3 weitere Fluoreszenzbereiche Tab. 4.

Tab. 4 Wellenlängen der Fluorochrome FITC, PE, TC

Fluorochrom	Max. Exzitation	Max. Emission	Farbe
Fluorescein (FITC)	488nm	520nm	Grün
Phycoerythrin (PE)	488nm	575nm	Rot-Orange
Tricolor (TC)	488nm	667nm	Dunkelrot

Für die Messungen mittels Durchflusszytometrie wurde die Thrombozytensuspension auf 2×10^8 Thr/ml eingestellt. Die Vorinkubation und Stimulation wurden in 2 ml Eppendorf-Röhrchen bei 37°C und einem Gesamtvolumen von 200µl durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch den Transfer von 5µl Thrombozytensuspension in 12x75mm Röhrchen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) beendet. Diese enthielten 20µl PrCPkonjugierten CD61 Antikörper (3µg/ml Lösung), 20 µl PE konjugierten CD62P Antikörper (1,5µg/ml Lösung) und 20µl FITC-konjugierten PAC-1 Antikörper (25µg/ml) (Gesamtvolumen 65µl). Um den Kontrollwert zu erhalten wurde eine Probe mit 20µl PE konjugierten Anti-Maus IgG (25µg/ml Lösung), 20µl PrCPkonjugierten CD61 Antikörper (3µg/ml Lösung), 20µl FITC-konjugierten PAC-1 Antikörper (25µg/ml) und 10µl RGDS (10mg/ml Lösung) (Gesamtvolumen 75µl) behandelt.

Die Proben wurden 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nach der Zugabe von 1ml PBS/0,1% Natriumazid wurden die Proben bei 4°C gelagert, bis sie innerhalb der nächsten 5 bis 15 Minuten analysiert wurden.

Dreifarbenanalyse der Thrombozytenaktivierung in der Durchflußzytometrie wurde mit Hilfe von FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit einem Laser von 488nm und spezifischer Bandbreitenfilter von 530nm (FITC), 585nm (PE) und >650nm (PerCP) durchgeführt.

Die Dreifarbenanalyse hat dabei den Vorteil, dass eine fluoreszierende Farbe dazu benutzt wird, die gewonnenen Daten nur auf die von Thrombozyten stammende einzuschränken. Dabei ist der CD61 (Integrin β3)-Antikörper spezifisch für Thrombozyten und unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad oder Aktivierungszustand. Er dient also dazu, die zu untersuchende Thrombozyten von anderen Zellarten, Zellfragmenten und den Thrombozyten stammenden Mikropartikel (PDM = *platelet derived microparticles*) abzugrenzen. Die zwei andere Farben, PE und FITC, die mit CD62 und PAC-1 Antikörpern konjugiert wurden, dienen dazu, die von der Thrombozytenaktivierung abhängige Bindung der Antikörper zu bestimmen.

Vor jeder Probemessung wurde die Thrombozytenpopulation durch Bestimmung der Größe und Verteilung sowohl im Vorwärtsstreulicht als auch im Seitwärtsstreulicht definiert und dann durch „Gating“ mittels CD61 positiver Ereignisse bestätigt. Dieses gelang durch eine präzise Einstellung des >650 nm Filters.

3.12. Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism Version 5 für Windows (San Diego, CA, USA) ausgewertet. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert ± Standardabweichung (SD). Statistische Analysen zur Ermittlung des p-Wertes wurden mittels gepaarten t-Testes durchgeführt, da die Daten voneinander unabhängige Variablen darstellen.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aggregation

Vorinkubation mit 10 μM AG1296, einem Tyrphostin, das als spezifischer PDGF-RK-Inhibitor anerkannt ist, führt zu Aggregationssteigerung bei niedrigen Primärstimuli wie 0,3 μM bis 1 μM U46619. U46619 (9,1-Dideoxy-9 α ,11 α -methanepoxy-Prostaglandin F_{2 α}) induziert als ein Tromboxananalogon „*shape change*“ mit einer IC₅₀= 4,8 nM und eine Thrombozytenaggregation mit einer IC₅₀= 82 nM in humanen Thrombozyten (Tymkewycz et. al., 1991).

Die Abb.5 zeigt die Aggregation unter Vorinkubation mit 10 μM AG1296 und Stimulation mit 0,3 μM oder 1 μM U46619. Bei der Stimulation mit 0,3 μM U46619 führt eine gleichzeitige Vorinkubation mit 10 μM AG1296 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer Aggregationssteigerung, die der Aggregation unter Stimulation mit 1 μM U46619 entspricht. Selbst unter Stimulation mit 1 μM U46619 ist eine Zunahme der Aggregation zu verzeichnen, obwohl sie deutlich geringer ist, als bei der Stimulation mit 0,3 μM U46619. Die Aggregationssteigerung ist also umso deutlicher, je niedriger der Primärstimulus ist.

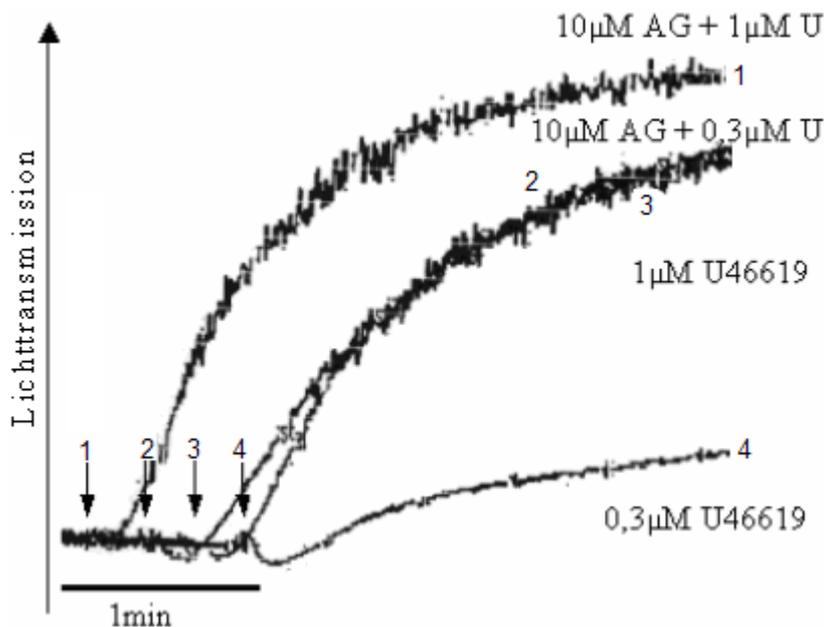


Abb.5 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aggregation

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 μM AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 0,3 oder 1 μM U46619 stimuliert. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aggregation und ist repräsentativ für 3 Experimente. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der jeweiligen Simulation und die Ziffern 1-4 kennzeichnen jeweils den Beginn und den Verlauf der jeweiligen Aggregationskurven.

Eine Stimulation der Thrombozyten mit $0,3\mu\text{M}$ U46619 führt zu einer reversiblen Formänderung der Thrombozyten „*shape change*“ mit einer Abnahme der Lichtextinktion ohne wesentliche nachfolgende Aggregation und Wiederherstellung des ursprünglichen Niveaus der Lichtextinktion. Die Vorinkubation der Thrombozyten mit 1, 3 oder $10\mu\text{M}$ AG1296 für 10 min führt zur konzentrationsabhängigen Aggregationssteigerung bei einem schwachen Primärstimulus wie $0,3\mu\text{M}$ U46619, Abb.6. Die dabei erfolgte Aggregation ist irreversibel und um so stärker, je höher die Konzentration der AG1296-Vorinkubation ist. Die höchste Aggregation wird unter Vorinkubation der Thrombozyten mit $10\mu\text{M}$ AG1296 erreicht. Deshalb werden alle anschließenden Experimente mit einer AG1296 Konzentration von $10\mu\text{M}$ durchgeführt.

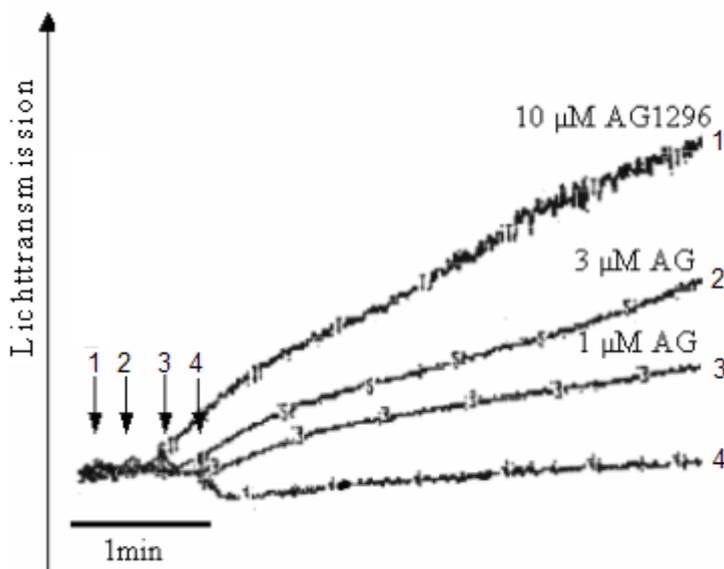


Abb.6 Aggregation unter ansteigender Konzentration des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 bei niedriger Konzentration des Primärstimulus

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 1, 3 oder $10\mu\text{M}$ AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit $0,3\mu\text{M}$ U46619 stimuliert. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aggregation und ist repräsentativ für 2 Experimente. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der jeweiligen Stimulation und die Ziffern 1-4 kennzeichnen jeweils den Beginn und das Ende der jeweiligen Aggregationskurven.

Die Abb. 7 zeigt die Aggregationszunahme unter Vorinkubation mit ansteigenden Konzentrationen des PDGF-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296. Die Vorinkubation der

Thrombozyten mit 1, 3, 10 und 30 μM AG1296 für 10 min führt zur Aggregationssteigerung bei Stimulation mit 1 μM U46619. Die Aggregationssteigerung ist weniger ausgeprägt als bei Stimulation mit 0,3 μM U46619. 120 Sekunden nach der Stimulation lässt sich eine Aggregation von 39,2% \pm 14,61% in den Kontrollen und eine Aggregation von 61,2% \pm 8,61% in den Proben, die mit 10 μM AG1296 vorinkubiert wurden feststellen. Bei einer Vorinkubation mit 3 μM AG1296 ergab die Aggregationsmessung nach 120 Sekunden eine Aggregation von 46,67% \pm 18,37%.

Da der aggregationssteigernde Effekt des AG1296 auch bei einer Stimulation mit 1 μM U46619 nachgewiesen werden kann und dieser Stimulus eine deutlich bessere Stabilität hinsichtlich der Reproduzierbarkeit gegenüber 0,3 μM U46619 zeigt, werden alle weiteren Experimente mit 1 μM U46619 durchgeführt.

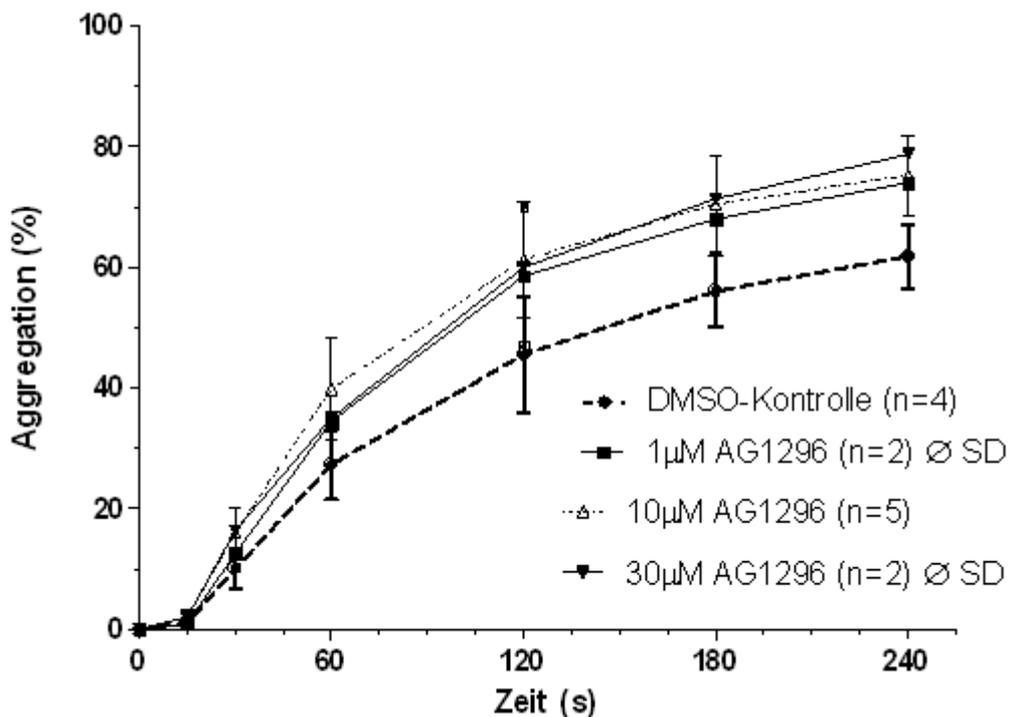


Abb.7 Aggregation unter ansteigender Konzentration des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 bei einer hohen Konzentration des Primärstimulus

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 1, 3, 10 und 30 μM AG1296 oder 0,15% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μM U46619 stimuliert. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aggregation mit 4 Experimenten für DMSO-Kontrolle, 5 Experimenten für 10 μM AG1296 sowie jeweils mit 2 Experimenten für 1 μM und 30 μM AG1296. Mittelwerte \pm SD sind für DMSO-Kontrolle und 10 μM AG1296 dargestellt. Der Kurvenverlauf für 1 μM und 30 μM AG1296 wird nur aus Mittelwerten zusammengesetzt.

4.2. Sekretion unter dem Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296

P-Selektin, ein integrales Membranprotein, welches auch als CD62 bekannt ist, befindet sich in der Membran der α -Granula der ruhenden Thrombozyten. Es wird bei aktivierten Thrombozyten auf der Plasmamembran vorgefunden und gilt als Marker für die Sekretion. Um die Ergebnisse der P-Selektin Messungen besser zu standardisieren wurde der höchste Wert des P-Selectins der DMSO-Kontrolle als 100% definiert. Ausgehend von diesem Wert erfolgte die Angabe aller anderen Werte als %-Wert. Der zeitliche Verlauf der Sekretion ist in Abb. 8 dargestellt. Da die Kurven die Ergebnisse von 3 Experimenten zusammenfassen und der als 100% definierte, höchste Wert der DMSO-Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde, erreicht die Kurve der DMSO-Kontrollen zu keinem Zeitpunkt einen Wert von 100%. Alle Werte für die mit AG1296 vorinkubierte Thrombozyten liegen oberhalb der Kontrollkurve mit Vorinkubation von DMSO. Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich nach 45, 60, 120 und 150s.

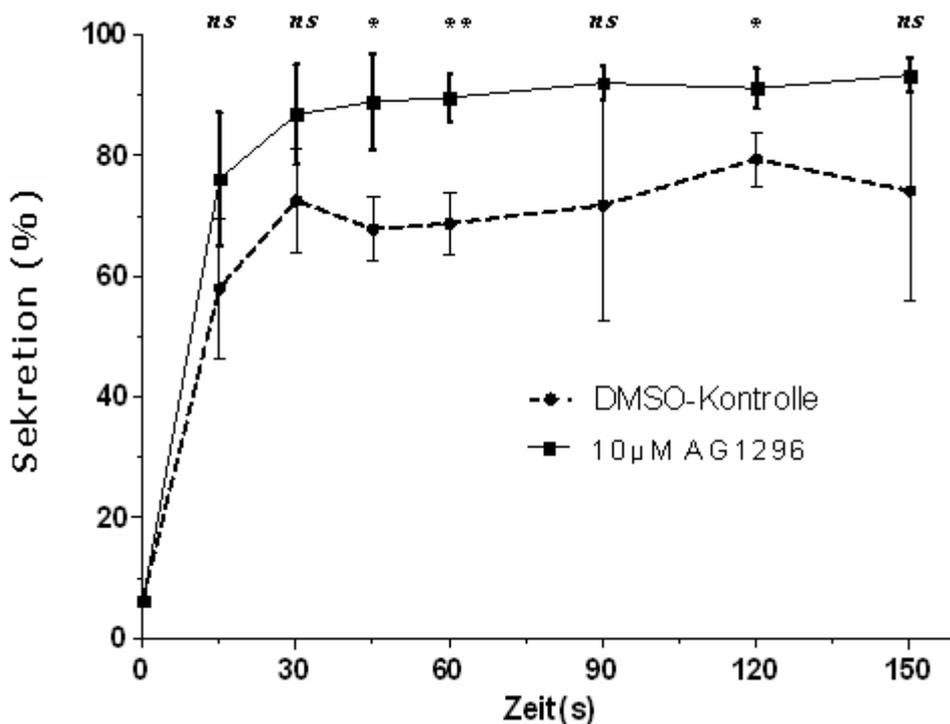


Abb.8 Sekretion unter dem Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296

Gewaschene Thrombozyten (1×10^6 Thr/ml) wurden für 10 min mit $10 \mu\text{M}$ AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ U46619 stimuliert. Die CD62-Analyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.11. mittels Durchflusszytometrie. Der höchste Wert der DMSO-Kontrolle wurde als 100% der Ereignisse definiert. Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der CD62-Expression der mit AG1296 vorbehandelten Thrombozyten gegenüber der DMSO-Kontrolle dar und zeigt die Mittelwerte \pm SD von 3 Experimenten. Die Bestimmung des p-Wertes (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,005$; ns = nicht signifikant) erfolgte im ungepaarten t-Test.

Bei einem Präaktivierungswert von $6,2\% \pm 0,3\%$ ergaben die DMSO-Kontrollen nach 15 Sekunden einen Wert von $57,8\% \pm 9,8\%$, wohingegen die AG1296 vorbehandelten Thrombozyten einen Wert von $76,1\% \pm 9,0\%$ lieferten. Selbst nach 120 Sekunden konnte die DMSO Kontrolle nicht den Wert von AG1296 vorbehandelten Thrombozyten erreichen, so dass immer ein Unterschied von 10-20 % bestehen blieb. Die Zunahme des P-Selektins war 15 und 30 Sekunden nach Stimulation nicht signifikant gegenüber der Kontrolle mit DMSO.

4.3. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung unter dem Einfluß des PDGFR-Tyrosinkinase-

inhibitors AG1296

Die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt zu einer Zunahme der Aggregation der Thrombozyten. Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass auch die durch PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibition beobachtete Zunahme der Aggregation darauf basiert. Die Untersuchung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Hierbei wurde der monoklonale Antikörper, PAC-1, eingesetzt. Er bindet spezifisch an das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und ist ein geeigneter quantitativer Marker (Schitz et al. 1998).

Die Abb. 9 stellt den zeitlichen Verlauf der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung von Thrombozyten vorinkubiert mit AG1296 gegenüber Kontrollen dar.

Vergleichsweise mit der Messung des P-Selectins wurde auch hier zur Standardisierung der Werte der höchste Wert der DMSO-Kontrolle als 100% definiert. Im Vergleich zu DMSO-Kontrollen zeigt die Vorinkubation AG1296 eine Zunahme der PAC-1-Bindung bereits nach 15 sek von $80,2\% \pm 11,5\%$ auf $143\% \pm 14,7\%$. Diese Werte schwanken nur geringfügig im zeitlichen Verlauf und zeigen deshalb einen annähernd parallelen Kurvenverlauf von DMSO-Kontrolle vs. AG1296-behandelten Thrombozyten.

Nach 150 Sekunden ergab die PAC-1- bindung für die DMSO-Kontrolle einen Wert von $61,5\% \pm 24,4\%$, wohingegen für AG1296 behandelte Thrombozyten einen Wert von $137\% \pm 11,5\%$.

Die Unterschiede sind statistisch signifikant mit $p=0,003$. Da der höchste Wert der Kontrolle im jeweiligen Versuch als 100% definiert und zu unterschiedlichen Zeiten erreicht wurde, ergab es sich für den Mittelwert in der Kontrollreihe kein 100%-Wert.

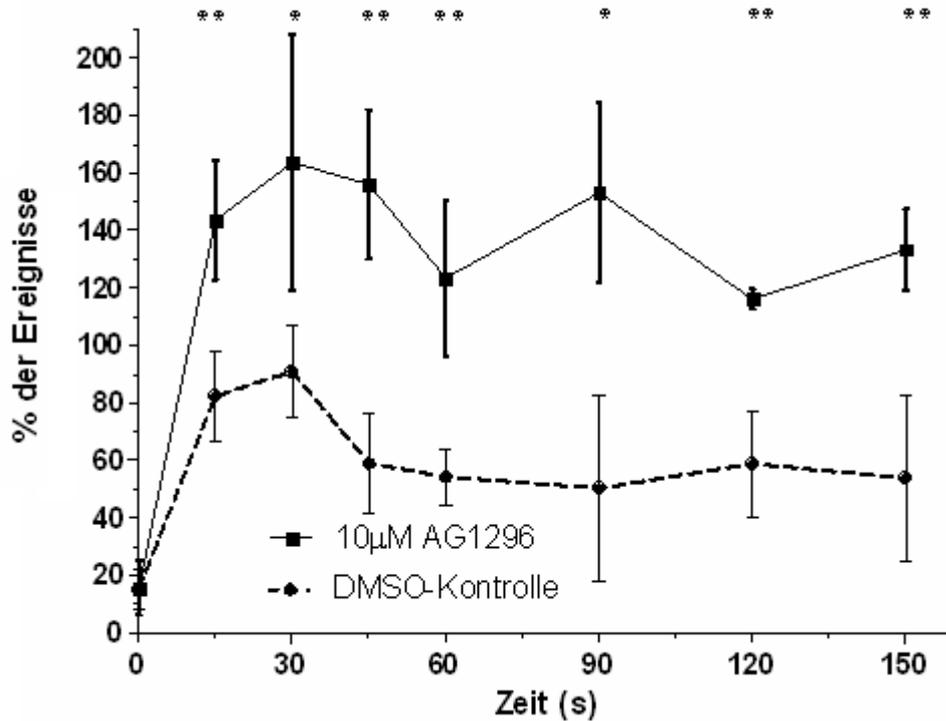


Abb. 9 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung unter dem Einfluß des PDGFR-Tyrosinkinase-inhibitors AG1296

Gewaschene Thrombozyten (2×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10µM AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1µM U46619 stimuliert. Die PAC-1 Analyse erfolgte entsprechend der Ausführungen im Kapitel Methoden 4.11. mittels Durchflusszytometrie. Der höchste Wert der DMSO-Kontrolle wurde als 100% der Ereignisse definiert. Die Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ der mit AG1296 vorbehandelten Thrombozyten gegenüber der DMSO-Kontrolle dar und zeigt die Mittelwerte \pm SD von 3 Experimenten. Die Bestimmung des p-Wertes (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,005$) erfolgte im ungepaarten t-Test.

4.4. Der Einfluss der PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Signalwege der Thrombozyten

4.4.1. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aktivität der Proteinkinase B (Akt)

Die Abb. 10 zeigt die Aktivität der Proteinkinase B (Akt) in Abhängigkeit von der Konzentration des AG1296. Eine Vorinkubation mit AG1296 lieferte keine Steigerung der Akt-Phosphorylierung bei AG1296 Konzentrationen von 0,3 bis 30 μM AG1296 und eine Hemmung der Enzymphosphorylierung bei 100 μM AG1296. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert.

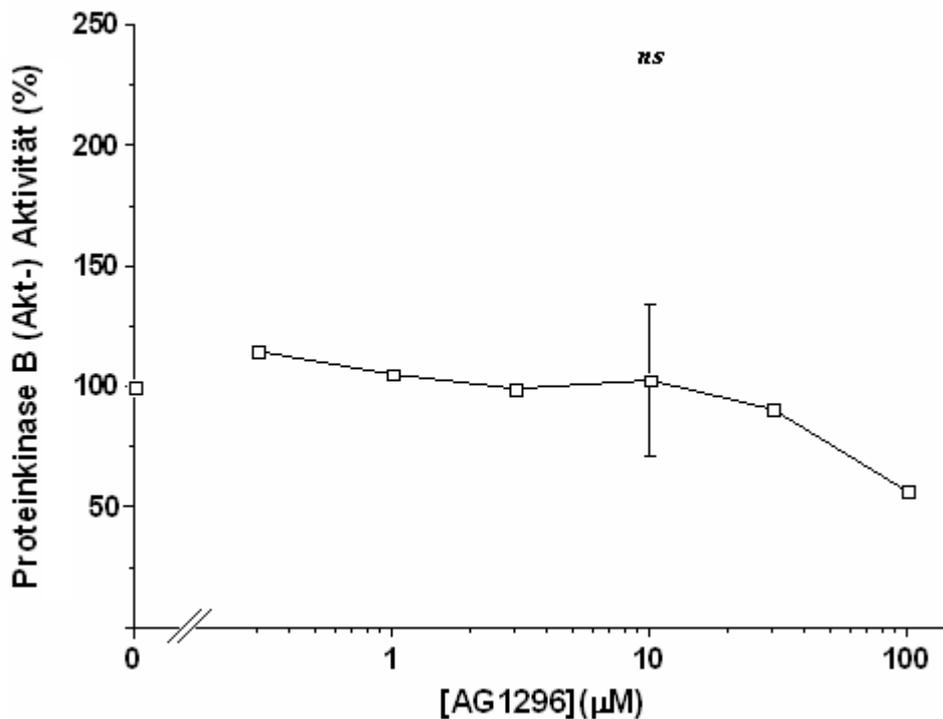


Abb. 10 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Aktivität der Proteinkinase B (Akt)

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM AG1296 vorinkubiert und anschließend mit 1 μM U46619 für 6 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Testes (ns = nicht signifikant). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten mit Ausnahme von 10 μM AG1296 (n=3; Mittelwert \pm SD).

4.4.2. Aktivität der MAP-Kinasen ERK2 und p38 unter dem Einfluß des

PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296

Um die Signalwege des PDGF-Rezeptors zu untersuchen wurden die Thrombozyten aus den jeweiligen Experimenten mittels Westernblott analysiert. Da es im Rahmen einer Dissertationsarbeit unmöglich ist alle bekannten intrazellulären Enzyme zu untersuchen, beschränkten wir uns zunächst auf die MAP-Kinasen ERK2 und p38, die für die Thrombozyten von zentraler Bedeutung sind. Die Abb. 11 zeigt den Einfluss auf die p38-, ERK2-Aktivierung durch Vorinkubation mit 10µM AG1296 bei Stimulation mit 1 µM U46619. Die Vorinkubation mit 10µM AG1296 führt bei der anschließenden Aktivierung der Thrombozyten zur Zunahme der Phosphorylierung der von ERK2, und hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung von p38.

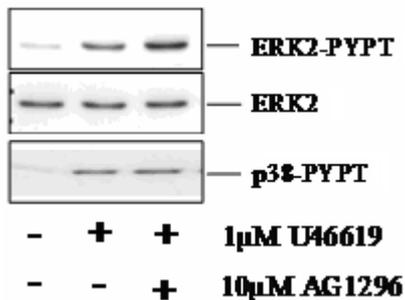


Abb.11 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf Aktivität der MAP-Kinasen ERK2 und p38

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10µM AG1296 vorinkubiert und anschließend mit 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente.

4.4.3. Einfluss des PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf p38-Aktivität

Ein wichtiges Mitglied der MAPKinasen-Familie ist p38. Die Abb. 12 zeigt die p38-Aktivität bei einer Vorinkubation mit ansteigenden Konzentrationen des AG1296. Die p38-Aktivität kann durch die Vorinkubation mit AG1296 nicht gesteigert werden. Dieser Effekt ist unabhängig von der AG1296-Konzentration. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert.

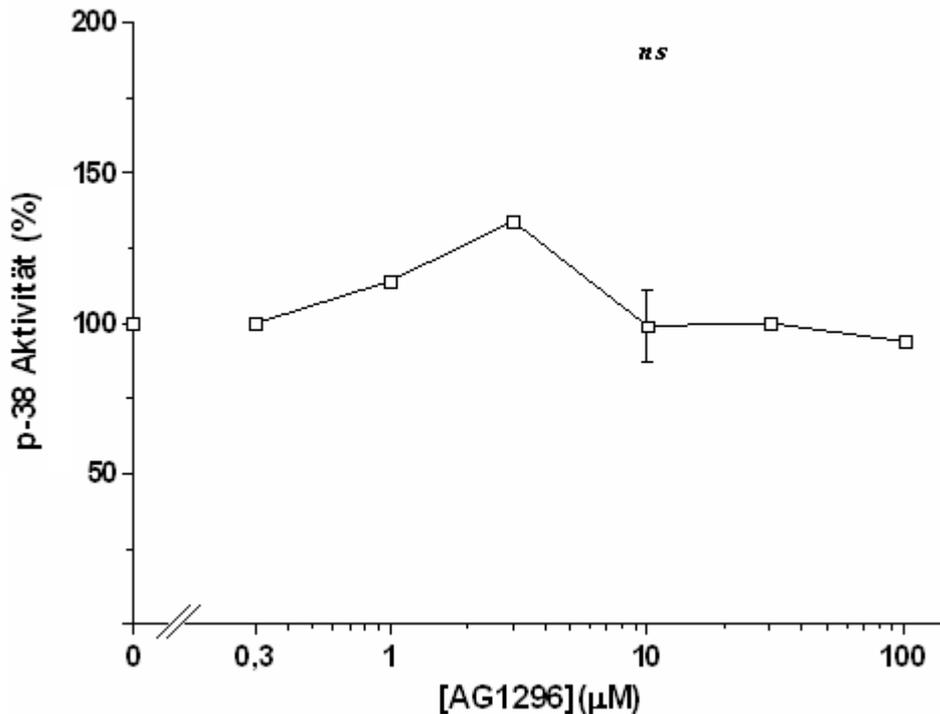


Abb. 12 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf p38-Aktivität

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,3, 1, 3, 10, 30 und $100 \mu\text{M}$ AG1296 vorinkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ U46619 für 90s bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Testes (ns = nicht signifikant). Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten mit Ausnahme von $10 \mu\text{M}$ AG1296 ($n=3$; Mittelwert \pm SD).

4.4.4. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die ERK2-Aktivität

Unter den drei von uns untersuchten Enzymen (Akt, p38 und ERK2) zeigte ERK2 als einziges Enzym eine Zunahme der Aktivierung. Da der Aggregationssteigernde Effekt der PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibition von der Konzentration des AG1296 abhängig war, untersuchten

wir, ob auch die ERK2-Aktivierung eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit aufwies. Die Abb.13 zeigt die ERK2-Aktivierung in Abhängigkeit von der AG1296-Konzentration. Die Vorinkubation mit AG1296 führt zur höheren ERK2-Aktivität. Die Zunahme der Phosphorylierung wird statistisch signifikant ab einer AG1296-Konzentration von 10 μ M und hat ihr Maximum bei 30 μ M AG1296. Bei 100 μ M AG1296 wurde eine Zunahme der Phosphorylierung gegenüber der DMSO-Kontrolle, jedoch eine Reduktion der Phosphorylierung gegenüber der Vorinkubation mit 30 μ M AG1296 beobachtet. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert.

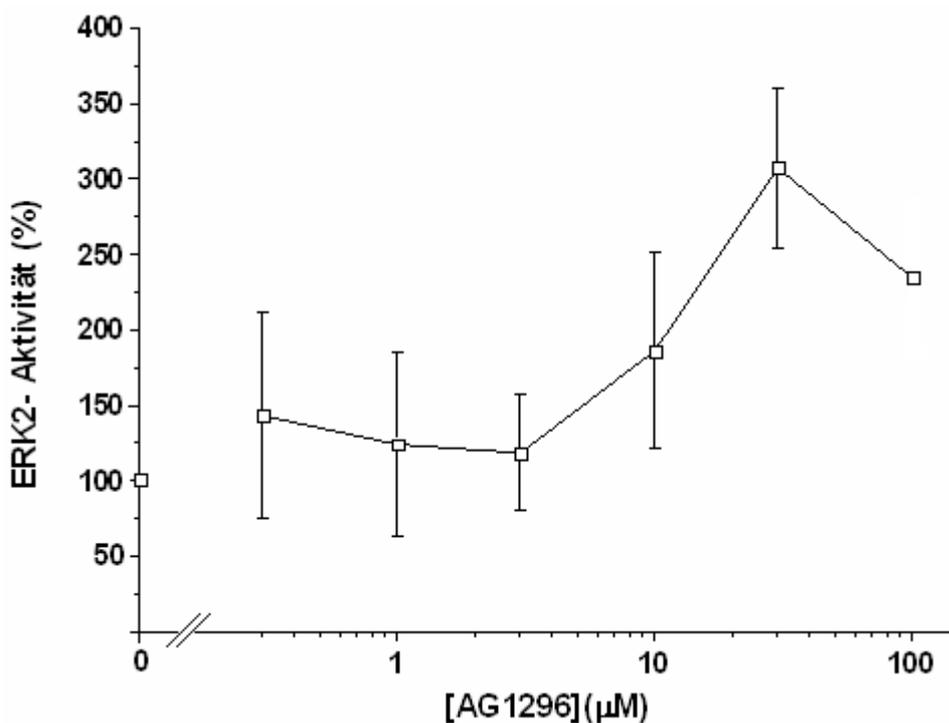


Abb. 13 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die ERK2-Aktivität

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 und 100 μ M AG1296, vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD mit n=4 für 0,3 μ M AG1296, n=5 für 1, 3 und 30 μ M AG1296, n=10 für 10 μ M AG1296 und n=2 für 100 μ M.

4.4.5. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Phosphorylierung von Tyrosin 185 und Threonin 183 der ERK2

Die enzymatische Aktivierung von ERK2 geschieht durch eine nacheinander abfolgende Phosphorylierung des Tyrosins 185 (Y185) und des Threonins 183 (T183). Die Phosphorylierung des Y185 (pY185) ist der erste Schritt und eine unbedingte Voraussetzung für die Phosphorylierung des T183 (pT183). Das dualphosphorylierte Enzym (pYpT) ist aktiv. Da der höchste Wert der ERK2-Aktivität bei einer einer Konzentration von 30µM AG1296 erreicht wurde (Abb.15), wurde die Phosphorylierung des Y185 bei dieser AG1296-Konzentration bestimmt. Die Vorinkubation mit 30µM AG1296 führt zu einem Anstieg von 22,6 % ±13,1% des pY185. Statistisch ergibt sich dabei keine signifikante Zunahme des pY185 (p=0,366). Die Abb.14 zeigt ein Beispiel eines Westernblotfilmes mit Kontrolle der Proteinmengen. Die Abb.15 zeigt die Mittelwerte und SD des p-Y185 von 3 Experimenten.

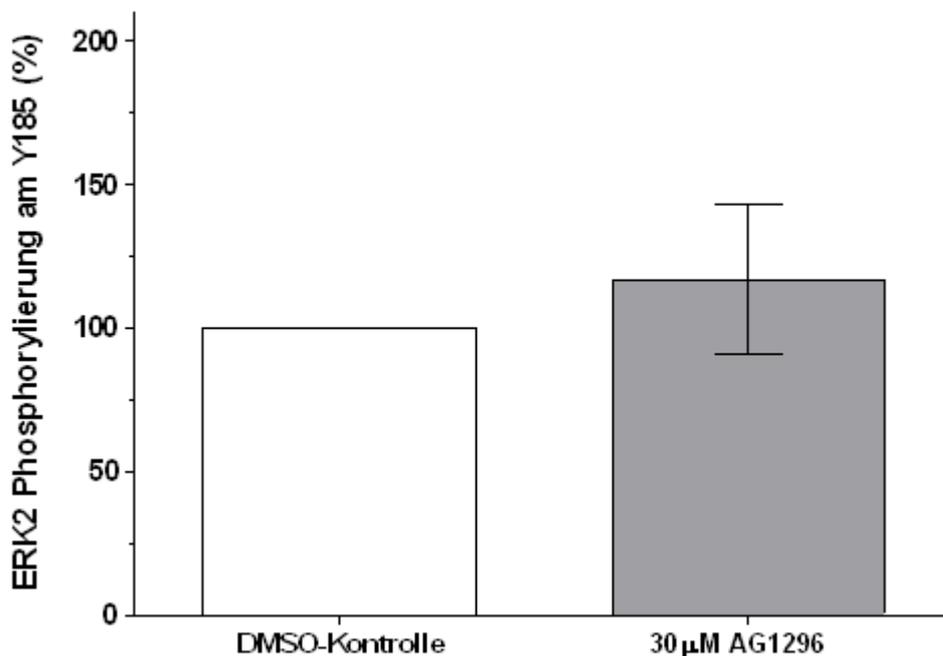


Abb. 15 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Phosphorylierung von Tyrosin 185 der ERK2

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 30µM AG1296 oder 0,15% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SD von 3 Experimenten.

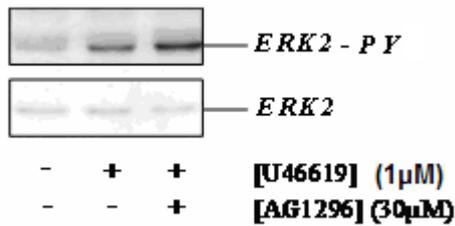


Abb. 14 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die Phosphorylierung von Tyrosin 185 der ERK2

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 30µM AG1296 oder 0,15% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente.

Die Phosphorylierung des Threonin 183 (T183) gilt als Beweis für die dualphosphorylierte ERK2. Diese Phosphorylierung ist nur möglich, wenn die Phosphorylierung des Y185 bereits erfolgt ist. Die Abb.16 zeigt die Zunahme des pT183 unter Vorinkubation mit 30µM AG1296.

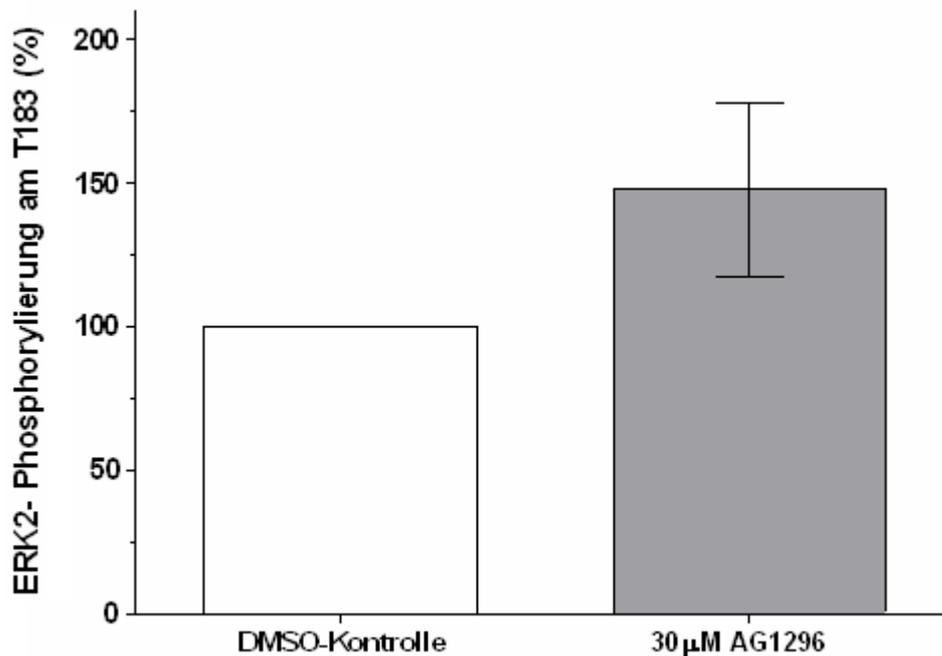


Abb. 16 Einfluß des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf pT183 der ERK2

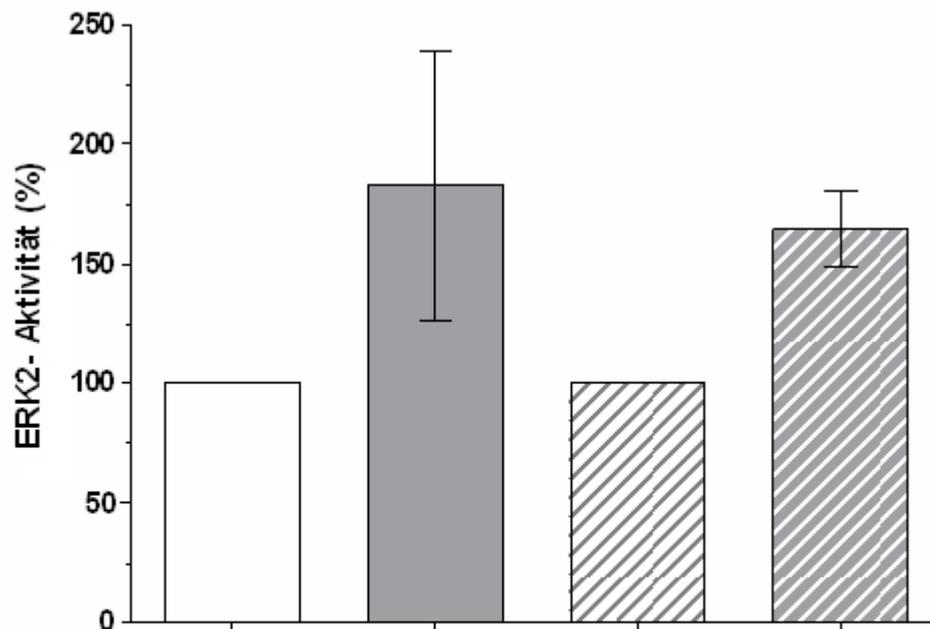
Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 30µM AG1296 oder 0,15% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene

optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von 3 Experimenten.

4.4.6. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf die ERK2-

Aktivität in Abhängigkeit vom verstärkten Gi-Signal

Um den AG1296-Effekt besser zu standardisieren wurde sein Einfluss bei primärer Stimulation von Gq mit 1 μ M U46619 vs. simultaner Gq- und Gi- Stimulation mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 untersucht. Die Abb. 17 zeigt die ERK2- Aktivität unter Vorinkubation mit AG1296 vs. Kontrolle in An- und Abwesenheit von Epinephrin. Bei einem zusätzlichen, definierten G_i-Signal beobachtet man, ähnlich einer Stimulation mit nur 1 μ M U46619, eine Zunahme der ERK2-Aktivität, allerdings schwanken die einzelnen Werte deutlich weniger. Dies führt zu Erhöhung der Signifikanz sowie Verringerung der Standardabweichungen. Deshalb wurden alle nachfolgenden Versuche mit AG1296 unter gleichzeitiger Gq- und Gi-Stimulation durchgeführt. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der mit 1 μ M U46619 oder mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619stimulierten Thrombozyten wurde jeweils als 100% definiert.



DMSO	+	-	+	-
10 μ M AG1296	-	+	-	+
1 μ M U46619	+	+	+	+
1 μ M Epinephrin	-	-	+	+

Abb. 17 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2- Aktivität in Abhängigkeit vom verstärkten Gi-Signal

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit $10 \mu\text{M}$ AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ U46619 oder mit $1 \mu\text{M}$ Epinephrin und $1 \mu\text{M}$ U46619 für jeweils 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der jeweils stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD mit $n=10$ für Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ U46619 und $n=3$ für Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Epinephrin und $1 \mu\text{M}$ U46619.

4.4.7. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter

Inhibition von MEK 1/2

U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] Butadien, ist ein hochspezifischer MEK-Inhibitor. Die Abb. 18 zeigt die Abhängigkeit der ERK2-Aktivität von der U0126-Konzentration bei simultaner Vorinkubation mit $10 \mu\text{M}$ AG1296. Als Kontrolle dient die Kurve der Thrombozyten vorinkubiert mit U0126 und 0,05%-DMSO. Ab einer U0126 Konzentration von $1 \mu\text{M}$ wird die ERK2-Aktivität auf 5-10% gehemmt. Auch durch Vorinkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ U0126 wird sie gehemmt, allerdings nur auf 40%. Diese Hemmung der ERK2-Aktivität kann durch die gleichzeitige Vorinkubation mit $10 \mu\text{M}$ AG1296 bei allen Konzentrationen von U0126 nicht aufgehoben werden.

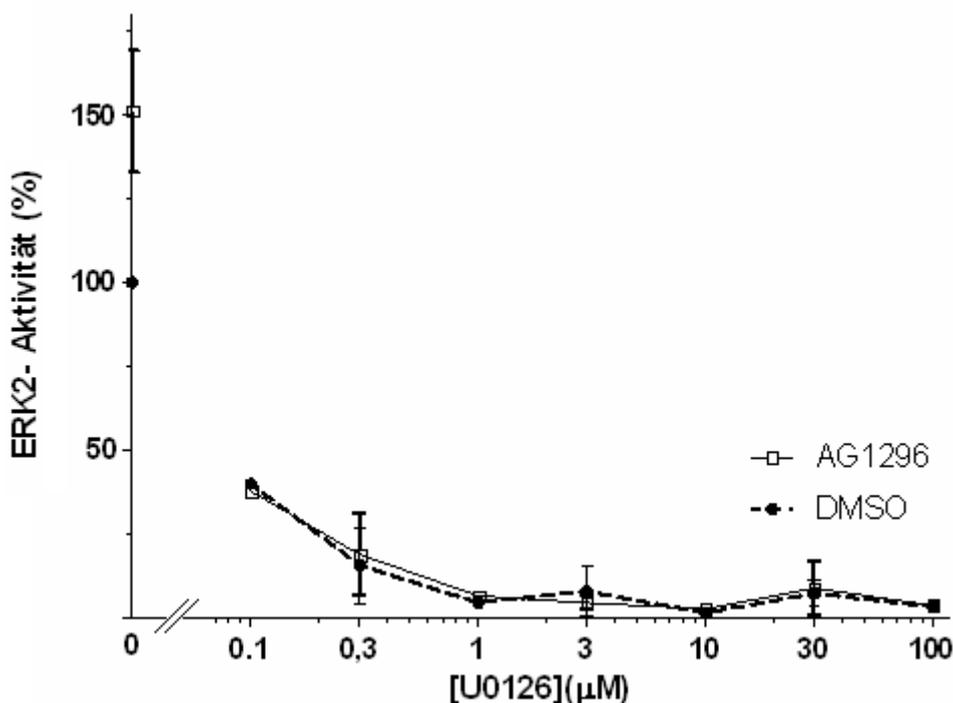


Abb. 18 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2- Aktivität unter Inhibition von MEK1/2

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M U0126 und 10 μ M AG1296 vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 3 Experimenten für 0,3, 3 und 30 μ M U0126 und von 2 Experimenten für 0,1, 1, 10 und 100 μ M U0126.

4.4.8. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

unter Inhibition von Src

PP2, 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin, ist ein potenter und spezifischer Inhibitor der Src. Er inhibiert die Src mit einer $IC_{50} = 4$ M (Hanke et al. 1996). Die Vorinkubation der Thrombozyten mit 10 oder 30 μ M PP2 führt zur verminderten ERK2-Aktivität. Die Abb. 19 zeigt die duale ERK2-Phosphorylierung unter Vorinkubation mit Src-Inhibitor PP2 und PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1296. Die Hemmung der ERK2-Aktivität ist abhängig von der PP2-Konzentration und lässt sich durch die gleichzeitige Vorinkubation mit 10 μ M AG1296 wieder aufheben.

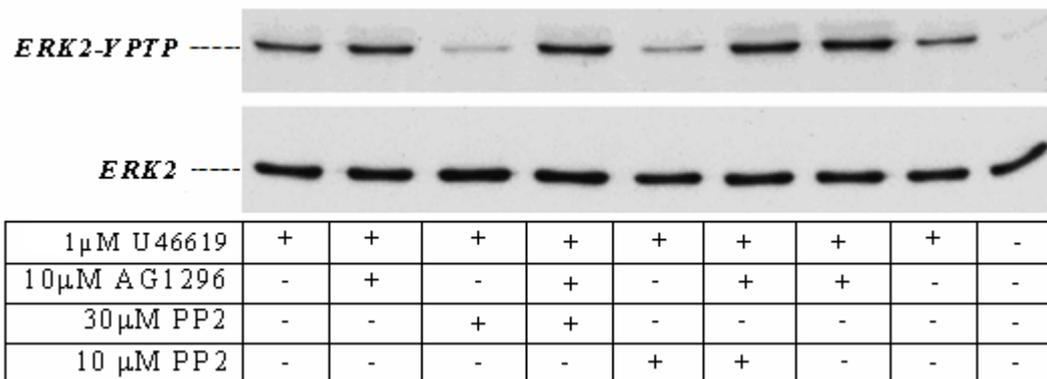
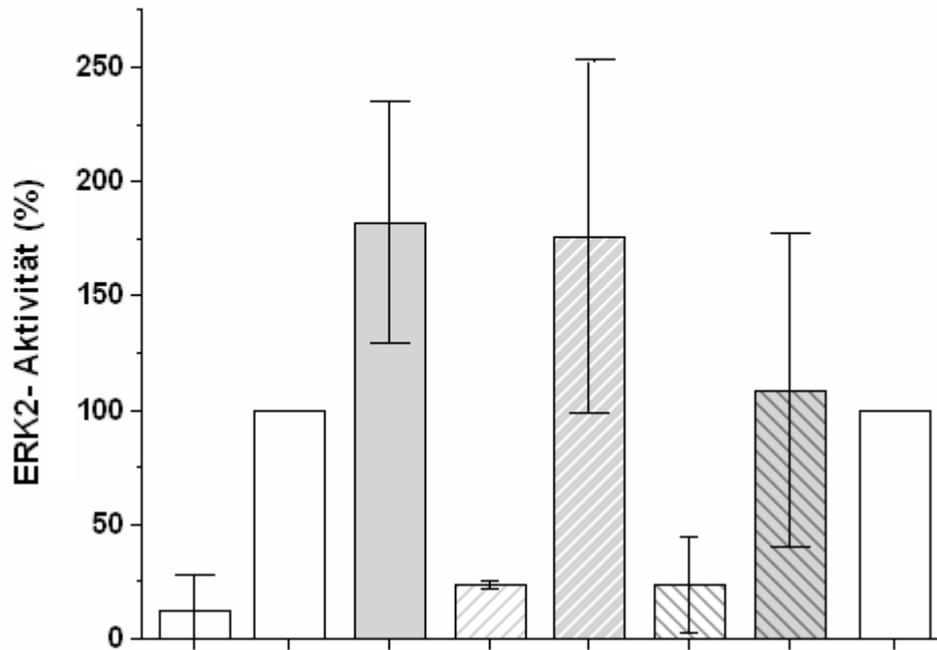


Abb. 19 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

unter Inhibition von Src

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 und 30 μ M PP2 und 10 μ M AG1296 vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente.

Die Abb.20 zeigt die ERK2-Aktivität unter Vorinkubation mit dem Src-Inhibitor PP2 und dem PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1296. Der hemmende Effekt der Vorinkubation der Thrombozyten mit 10 oder 30µM PP2 wird durch die gleichzeitige Vorinkubation mit 10µM AG1296 wieder aufgehoben. Eine dem PP2 ähnliche Substanz ohne inhibitorischen Einfluss auf die Src ist PP3, 4-Amino-7-phenylpyrazolo[3,4-d]Pyrimidin. Sie dient als Negativkontrolle zu PP2. Unter Vorinkubation der Thrombozyten mit PP3 wird die gleiche ERK2-Aktivität entsprechend der von DMSO-Kontrollen beobachtet.



DMSO	+	+	-	-	-	-	-	-
30µM PP3	-	+						
10µM AG1296	-	-	+	-	+	-	+	-
10µM PP2	-	-	-	+	+	-	-	-
30µM PP2	-	-	-	-	-	+	+	-
1µM U46619	-	+						

Abb. 20 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition von Src

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 und 30µM U0126 und 10µM AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1µM Epinephrin und 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-

Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte \pm SD von 3 Experimenten.

4.4.9. Bedeutung der PI-3-Kinasen für die PDGF-abhängigen Signalwege

Wortmannin ist ein nicht selektiver PI-3-Kinaseinhibitor, der alle Isoformen der PI-3-Kinasen hemmt. In zwei Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation mit 300nM Wortmannin die Aggregation von 80% auf 23% hemmt und die Aggregation durch Vorinkubation mit 10 μ M AG1296 auf 35% wieder angehoben werden kann. Auf der Ebene der PDGF-abhängigen Signalwege wurde ERK2-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen PI-3-Kinaseinhibitoren als nächstes untersucht. Die Vorinkubation der Thrombozyten mit Wortmannin führt zur verminderten Phosphorylierung der ERK2. Dieser Effekt kann durch eine simultane Vorinkubation mit AG1296 nicht wieder aufgehoben werden. Die Abb. 21 zeigt die ERK2-Aktivität unter Vorinkubation mit PI-3-Kinaseinhibitor Wortmannin und PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1296.

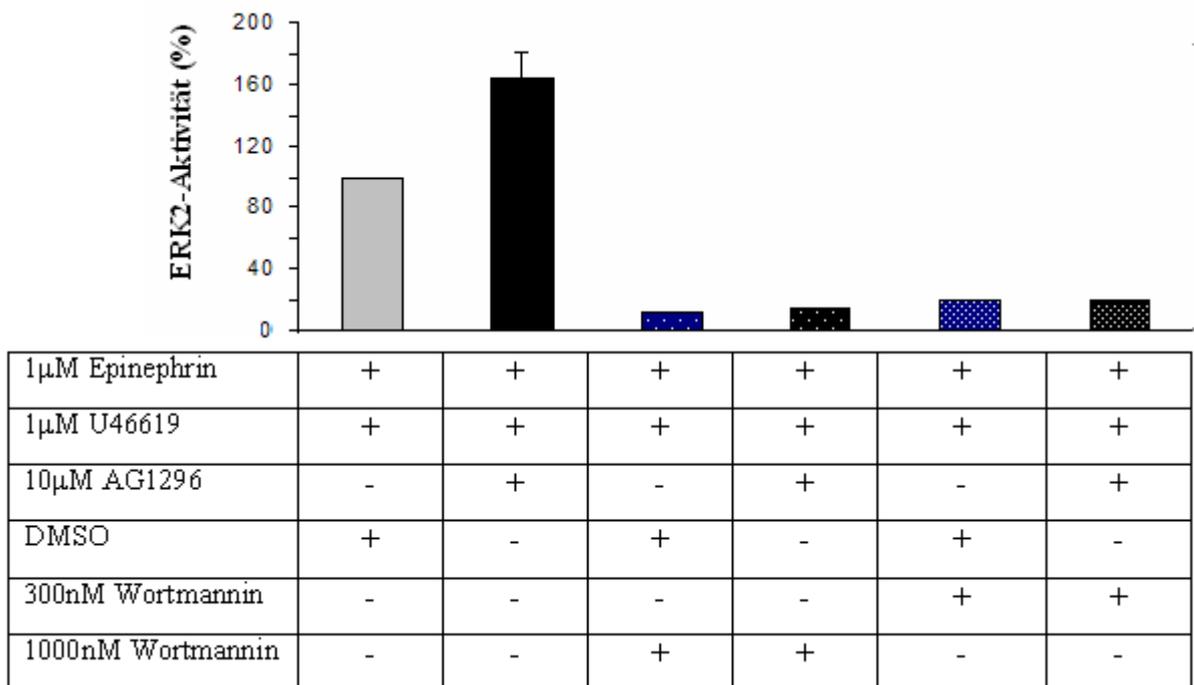


Abb. 21 ERK2-Aktivität in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Wortmannin und AG1296

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 300 und 1000nM Wortmannin und 10 μ M AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus 2

Experimenten mit Ausnahme der zweiten Säule (Epinephrin, U46619 und AG1296) n=10 mit Mittelwert \pm SD.

Da die Aggregation durch Inhibition der PI-3-Kinasen gehemmt wird und dieser Effekt durch die Vorinkubation mit 10 μ M AG1296 partiell antagonistisch ist, werden nun die 2 häufigsten Isoformen der PI-3-Kinasen der Thrombozyten, PI-3-Kinase p110 β und p110 γ , untersucht. Dazu setzen wir TGX-221, einen potenten, selektiven, zellpermeablen Inhibitor der PI-3-Kinase-p110 β ein. Er besitzt eine 1000-fache Selektivität gegenüber PI-3-Kinase-p110 α und großer Anzahl anderer Proteinkinasen. Der TGX-221 inhibiert PI-(3,4)-P Produktion in Thrombozyten mit einer IC₅₀=50 nM (Jackson et al. 2005). Die Vorinkubation der Thrombozyten mit 1000nM TGX-221 für zehn Minuten vor der Stimulation führt zu einer globalen Abnahme der Aggregation. Nach 240 Sekunden kommt es zu einer Aggregationshemmung um 47%. Diese Hemmung lässt sich durch eine simultane Vorinkubation mit 10 μ M AG1296 um 15,5% wieder steigern. Insgesamt beobachtet man eine Zunahme der Aggregation bei gleichzeitiger Vorinkubation mit AG1296. Diese Zunahme nimmt mit der Zeit kontinuierlich zu und ist am größten nach 240 s. Die Abb.22 gibt den Aggregationsverlauf unter Vorinkubation mit 1000nM TGX-221 und 10 μ M AG1296 wieder. In 2 Vorversuchen wurde der Aggregationsverlauf bei Vorinkubation mit 300nM TGX-221 und 10 μ M AG1296 bestimmt. Ähnlich wie die Vorinkubation mit 1000nM TGX-221, führt die Vorinkubation mit 100nM TGX-221 zu einer Aggregationshemmung von 52 % auf 16%. Diese Hemmung der Aggregation lässt sich allerdings durch gleichzeitige Vorinkubation mit 10 μ M AG1296 auf 43% wieder anheben.

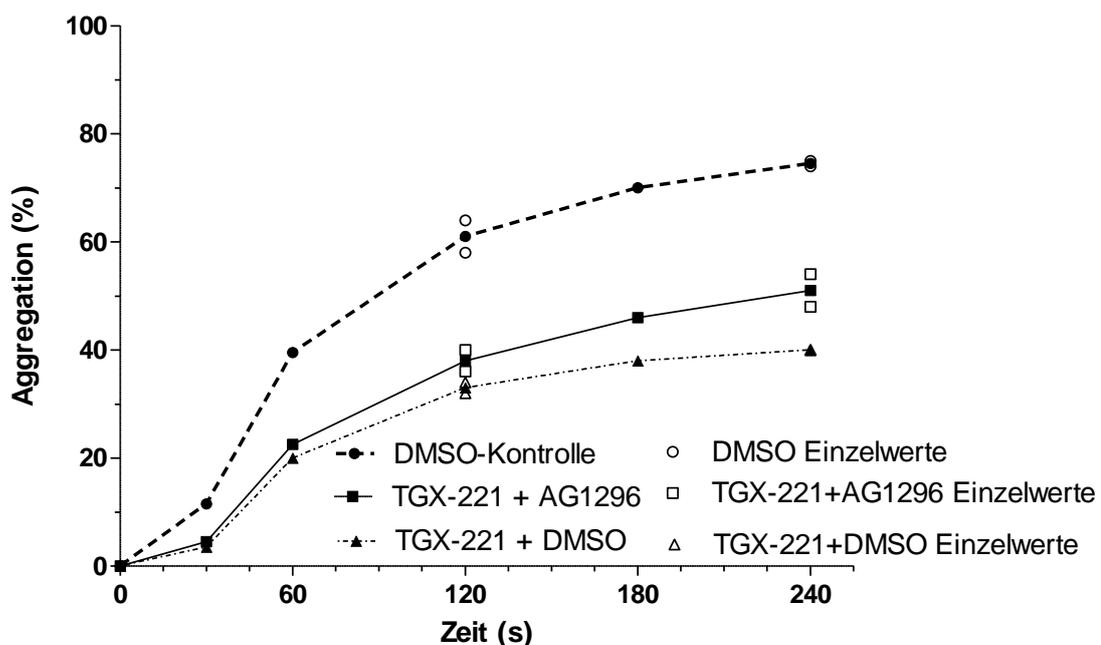


Abb. 22 Aggregation unter selektiver PI-3-Kinase p110 β -Inhibition und der antagonistische Effekt des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit DMSO, 1000nM TGX-221 oder 1000nM TGX-221 und 10 μ M AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aggregation. Alle Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus 2 Experimenten. Für die Zeitpunkte 120s und 240s nach der Stimulation sind die Einzelwerte der jeweiligen Kurven als nicht gefüllte Symbole dargestellt.

AS-252424 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der PI-3-Kinase p110 γ . Er hemmt die PI-3-Kinasen γ , α , β und δ bei einer jeweiligen IC_{50} von 30, 940, 20000 und 20000 nM (Pomel et al. 2006). Die Abb. 23 zeigt, dass die Vorinkubation der Thrombozyten mit 1000nM AS-252424 im Gegensatz zu PI-3-Kinase-p110 β -Inhibition durch TGX-221, keinen Einfluss auf Aggregation hat. Obwohl alle Punkte der AS252424-Kurve über den DMSO-Kontrollen liegen, sind die jeweiligen Unterschiede sehr gering.

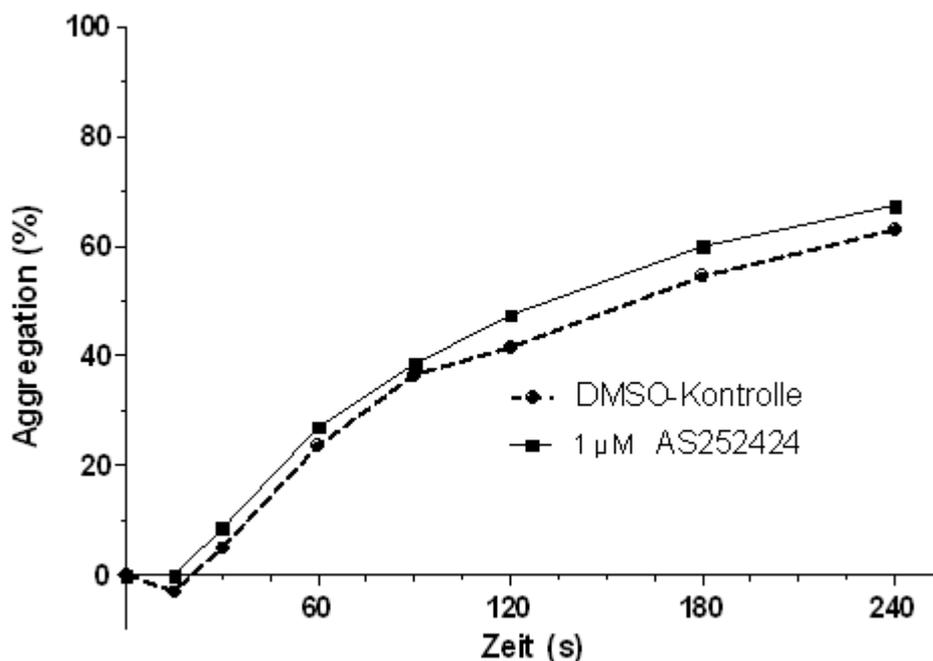


Abb.23 Aggregation unter selektiven PI-3-Kinase p110 γ -Inhibition

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 1 μ M AS-252424 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 stimuliert. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aggregation. Alle Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus 2 Experimenten.

Bei der Stimulation der Thrombozyten kommt es zu einer Zunahme der ERK2-Aktivität. Diese kann durch Vorinkubation mit AG1296 gesteigert, und durch eine unspezifische Hemmung der PI-3-Kinase durch Wortmannin reduziert werden. Die Abb. 24 zeigt die ERK2-Aktivität nach Vorinkubation mit 1000nM TGX-221 oder 1000nM AS252424 ± 10µM AG1296. Nach der Vorinkubation mit 1000nM TGX-221, einem potenten und selektiven PI-3-Kinase p110β-Inhibitor mit einer IC₅₀=50nM, wird eine deutliche Abnahme der ERK2-Aktivität beobachtet (Jackson et al.2005). Eine geringe, nicht signifikante Reduktion der ERK2-Aktivität wird unter der Vorinkubation mit AS252424, einem PI-3-Kinase p110γ-Inhibitor festgestellt. In beiden Fällen kann die ERK2-Aktivität durch gleichzeitige Vorinkubation mit 10µM AG1296 gesteigert werden.

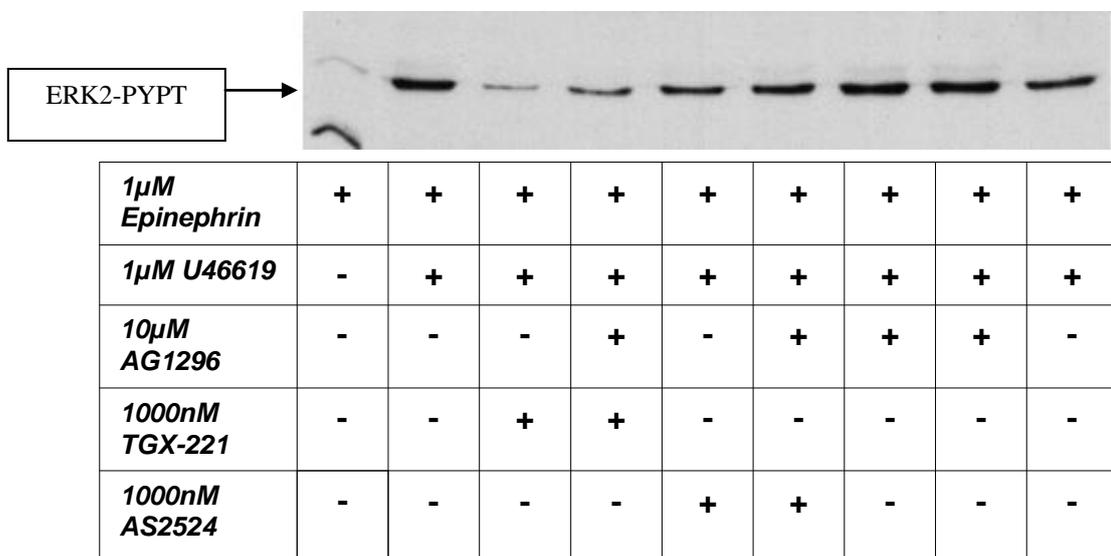


Abb. 24 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition der PI-3-Kinase p110 β/γ

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 1000nM TGX-221, 1000nM AS-252424 und 10µM AG1296 vorinkubiert und anschließend mit 1µM Epinephrin und 1µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente.

Die Abb.25 zeigt die ERK2-Aktivität nach einer Vorinkubation mit 30, 100 oder 1000nM AS252424. Der spezifische PI-3-Kinase p110 γ -Inhibitor AS252424 hat bei einer Konzentration von 30nM keinen Einfluss auf die ERK2-Aktivität. Er hemmt aber die durch AG1296 erzielte Phosphorylierungszunahme auf 110%. Bei den Konzentrationen von 100 und 1000nM AS252424 wird die ERK2-Phosphorylierung geringfügig gehemmt. AG1296 kann diesen Effekt wieder aufheben und bringt die ERK2-Aktivierung auf 112%. Die dabei erreichte Phosphorylierung entspricht der von 30 μ M AS252424 und 10 μ M AG1296. Interessanterweise wird ein „ceiling effect“ durch AS252424-Vorinkubation hervorgerufen, so dass die Phosphorylierungszunahme durch AG1296-Vorinkubation die 115% nicht überschreiten kann.

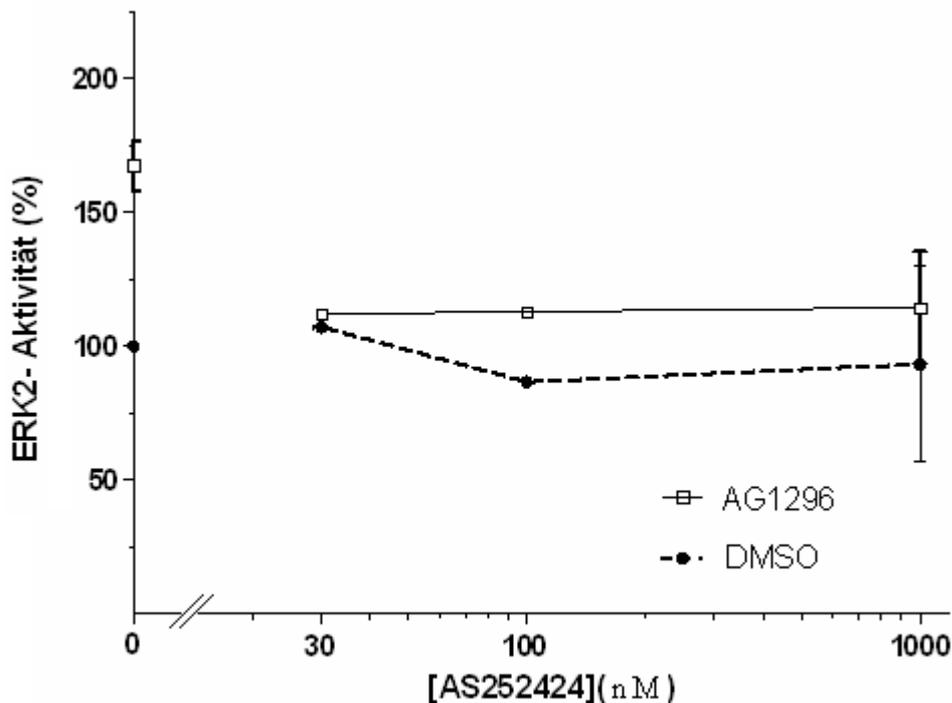


Abb. 25 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition der PI-3-Kinase p110 γ

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 30, 100 und 1000 nM AS252424 und 10 μ M AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung zeigt die ERK2-Aktivität und stellt die Mittelwerte aus 2 Experimenten für 30nM und 100 nM AS252424 und Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten für 1000 nM AS252424 dar.

Die Abb.26 zeigt die ERK2-Aktivität unter einer Vorinkubation mit 30, 100 und 1000nM TGX-221 \pm 10 μ M AG1296. Unter Hemmung der PI-3-Kinase-p110 γ mit 30, 100 und 1000nM TGX-221 stellten wir eine Abnahme der ERK2-Aktivität auf entsprechend 42, 40 und 18 % fest. Auch die durch AG1296 erzielte Zunahme der ERK2-Aktivität nimmt bei gleichzeitiger Vorinkubation mit steigender Konzentration des TGX-221 stetig ab und ist bei 1000nM TGX-221 vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle.

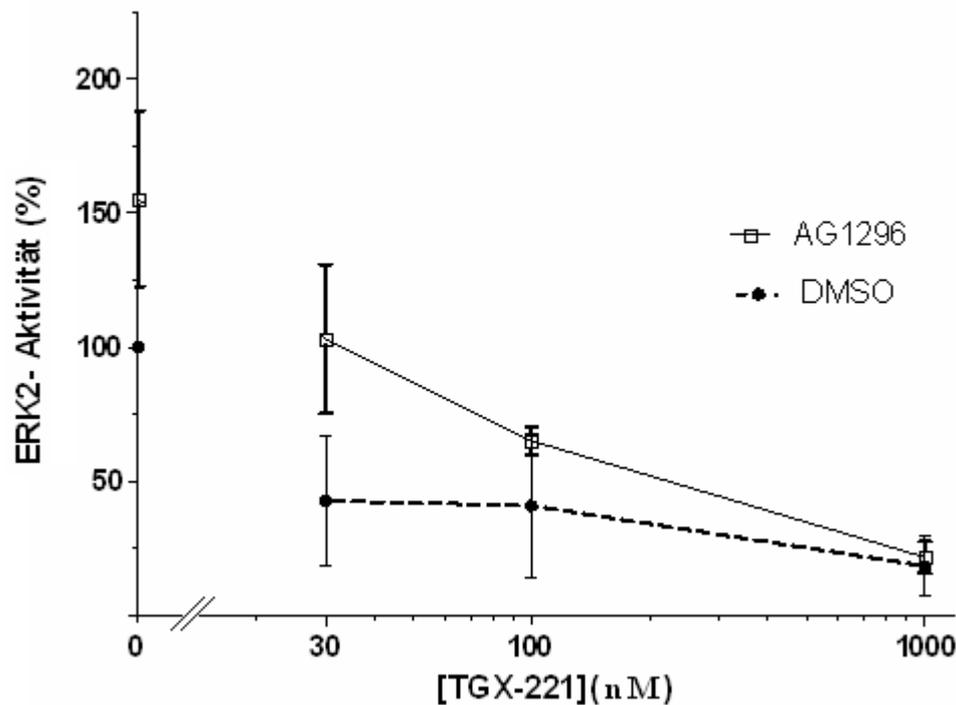


Abb. 26 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität unter Inhibition der PI-3-Kinase p110 β

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 30, 100 und 1000nM TGX-221 und 10 μ M AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung zeigt die ERK2-Aktivität und stellt die Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten dar.

4.4.10. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

bei definiertem G_q- und ansteigendem G_i- Signal

Um ein definiertes G_i- Signal zu gewährleisten wurden die Thrombozyten simultan zur AG1296-Vorinkubation mit 10 μM ARC-669931, auch bekannt als Cangrelor (P2Y₁₂-Rezeptorinhibitor), und 100 μM MRS2179, einem spezifischen P2Y₁-Rezeptorinhibitor (Baurand et al. 2001) vorinkubiert. Danach wurden sie mit 1 μM U46619 und einer ansteigenden Konzentration von Epinephrin 1, 10 und 50 μM Epinephrin stimuliert. Die Abb.27 zeigt die ERK2-Aktivität in Abhängigkeit von G_i-Signal mit oder ohne Vorinkubation mit 10 μM AG1296. Unter diesen Bedingungen wird die Zunahme der ERK2-Aktivität, die durch AG1296 erzielt wurde, mit steigendem G_i-Signal kontinuierlich kleiner, bis schließlich bei 50 μM Epinephrin keine Zunahme mehr feststellbar ist.

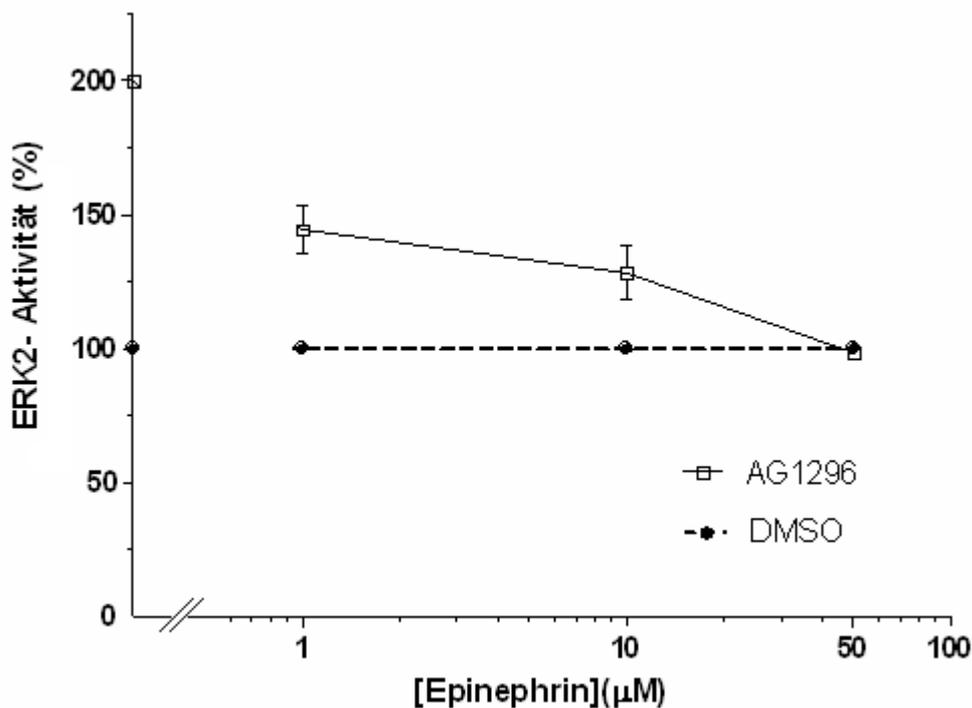


Abb. 27 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

bei definiertem G_q- und ansteigendem G_i- Signal

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 μM ARC-669931, 100 μM MRS2179 und 10 μM AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1, 10 und 50 μM Epinephrin und 1 μM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μl SDS gestoppt. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten mit 1 und 10 μM Epinephrin, sowie Mittelwerte aus 2 Experimenten mit 50 μM Epinephrin.

4.4.11. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

bei definiertem Gi- und zunehmenden Gq- Signal

Um ein definiertes G_i-Signal zu gewährleisten wurden die Thrombozyten simultan zur AG1296-Vorinkubation mit 10 μM ARC-669931, einem selektiven P2Y₁₂-Rezeptorinhibitor, und 100 μM MRS2179, einem P2Y₁-Rezeptorinhibitor, vorinkubiert. Danach wurden sie mit 1 μM Epinephrin und einer ansteigenden Konzentration von 1, 10 und 30 μM U46619 stimuliert. Unter diesen Bedingungen wird die Zunahme der ERK2-Aktivität, die durch AG1296 erzielt wurde, mit steigendem G_q-Signal immer kleiner, bleibt aber dennoch detektierbar bei einer Stimulation mit 30 μM U46619 Abb. 28.

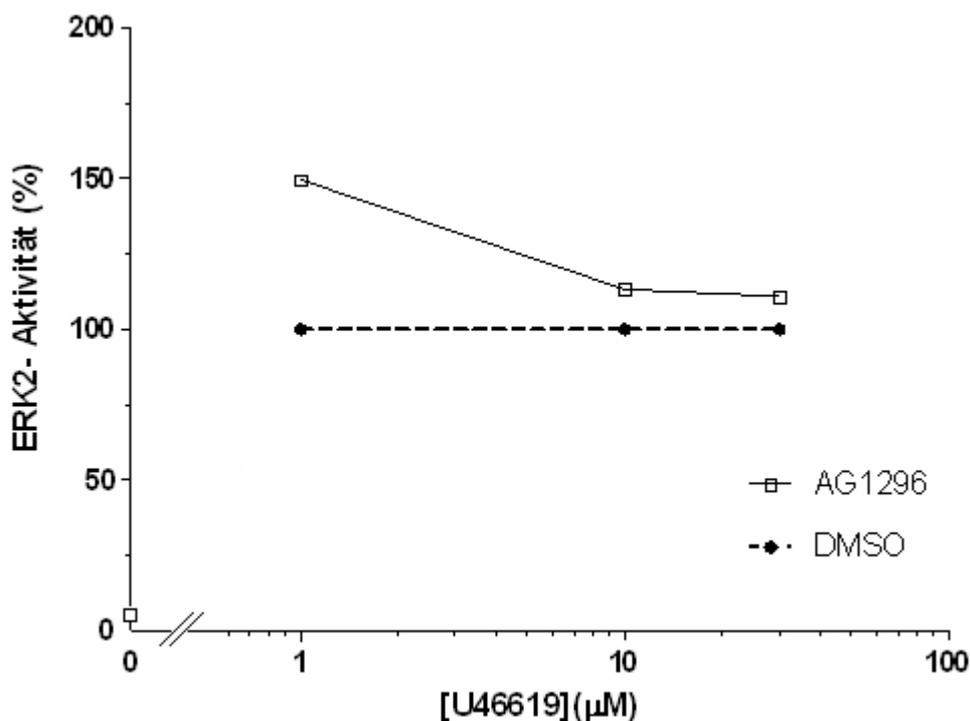


Abb. 28 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1296 auf ERK2-Aktivität

bei definiertem Gi- und zunehmendem Gq-Signal

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 μM ARC-669931, 100 μM MRS2179 und 10 μM AG1296 oder 0,05% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μM Epinephrin und 1, 10 und 30 μM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte \pm SD von 2 Experimenten.

4.4.12. Einfluss der PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296, AG17 und AG1478 auf

ERK2-Aktivität

Während die Tyrphostine AG1296 und AG17 spezifische PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren sind, ist Tyrphostin AG1478 ein selektiver EGF-Rezeptorkinaseinhibitor ($IC_{50} = 3nM$), der auch Tyrosinkinaseinhibition des PDGF-Rezeptors bewirkt, allerdings bei höheren Konzentrationen als EGF-RKI ($IC_{50} > 100\mu M$) (Levitski et al. 1995). Unter diesen drei Inhibitoren nimmt AG1296 eine Schlüsselstellung ein, da er mit $IC_{50} = 1\mu M$ der mit Abstand potentere und selektivere PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor ist. Desweiteren hat er keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung des VEGFR KDR (Kovalenko et al. 1994; Sturz et al. 2001). Auch AG17 gilt als selektiver PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor mit einer $IC_{50} = 500nM$, der als antiproliferativer Agens die oxidative Phosphorylierung entkoppelt (Palumbo et al. 1994; Burger et al. 1995). Die Abb. 29 zeigt den Einfluss von verschiedenen PDGF-Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296, AG17 und AG1478 auf die ERK2-Aktivität. Unter Vorinkubation mit $10\mu M$ oder $30\mu M$ AG17 nimmt die ERK2-Aktivität ab. Bei einer Vorinkubation mit $10\mu M$ oder $30\mu M$ AG1478 oder $10\mu M$ AG1296 nimmt die ERK2-Aktivität zu.

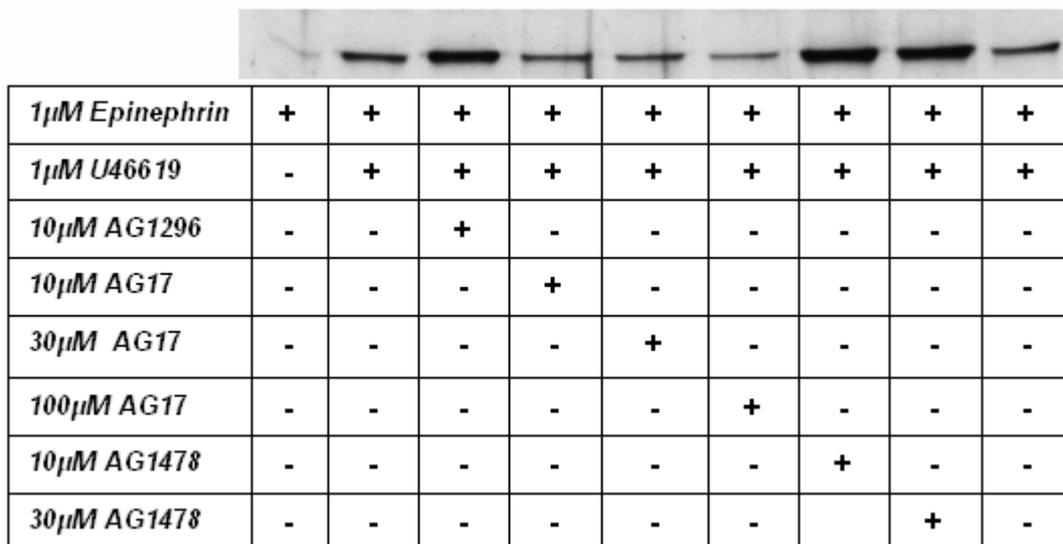


Abb. 29 Einfluss der PDGF-Rezeptorkinaseinhibitoren AG1296, AG17 und AG1478 auf ERK2-Aktivität

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit $10\mu M$ AG1296, 10, 30 und $100\mu M$ AG17 oder 10 und $30\mu M$ AG1478 vorinkubiert und anschließend mit $1\mu M$ Epinephrin und $1\mu M$ U46619 für 2 min bei $37^\circ C$ stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $50\mu l$ SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente.

4.4.13. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aggregation

Die Abb.30 zeigt die Aggregation unter einer Vorinkubation mit 10 und 30µM AG17. Die Vorinkubation mit dem PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG17 führt zu einer Zunahme der Aggregation bei Stimulation mit 1µM Epinephrin und 1µM U46619. Dabei wird bei einer Vorinkubation mit 30µM AG17 sowohl eine größere Steigung der Aggregationskurve, als auch eine deutlich höhere maximale Aggregation erreicht. Der Auswertung des zeitlichen Verlaufs der DMSO-Kontrolle und der Vorinkubation mit 30µM AG17 mittels eines ungepaarten t-Testes zeigt signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) ab 60s nach Stimulation.

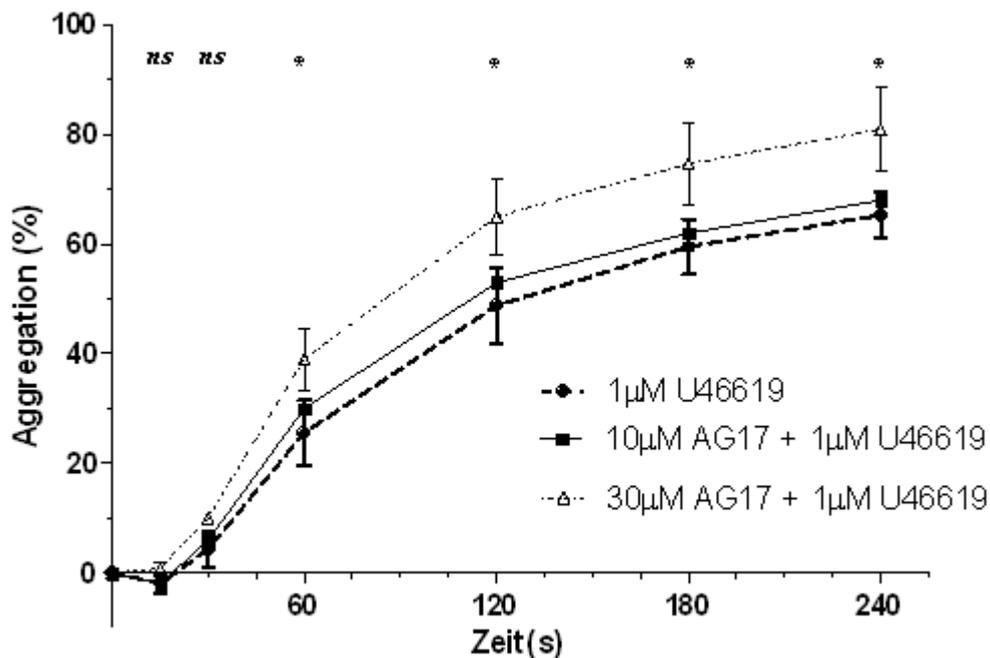


Abb. 30 Einfluss des PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aggregation

Gewaschene Thrombozyten (3×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10µM und 30µM AG17 vorinkubiert und anschließend mit 1µM Epinephrin und 1µM U46619 stimuliert. Die Aggregationsmessung erfolgte gemäß Ausführungen im Kapitel Methoden 4.6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Testes (*= $p \leq 0,05$; ns = nicht signifikant). Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte und SD von 3 Experimenten.

4.4.14. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität der

MAP-Kinasen ERK2 und p38

Die Abb.31 zeigt die ERK2-Aktivität unter Vorinkubation mit ansteigenden Konzentrationen des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17. Im Unterschied zu Vorinkubation mit AG1296 führt eine Vorinkubation mit AG17 nicht zu einer Zunahme der ERK2-Aktivität. Im Gegenteil, man beobachtet eine Abnahme der ERK2-Aktivität bei allen Konzentrationen des AG17. Bei niedrigeren Konzentrationen des AG17 ist die Hemmung geringer ausgeprägt. Allerdings ist eine Zunahme der ERK2-Aktivität ist auch hier nicht zu beobachten.

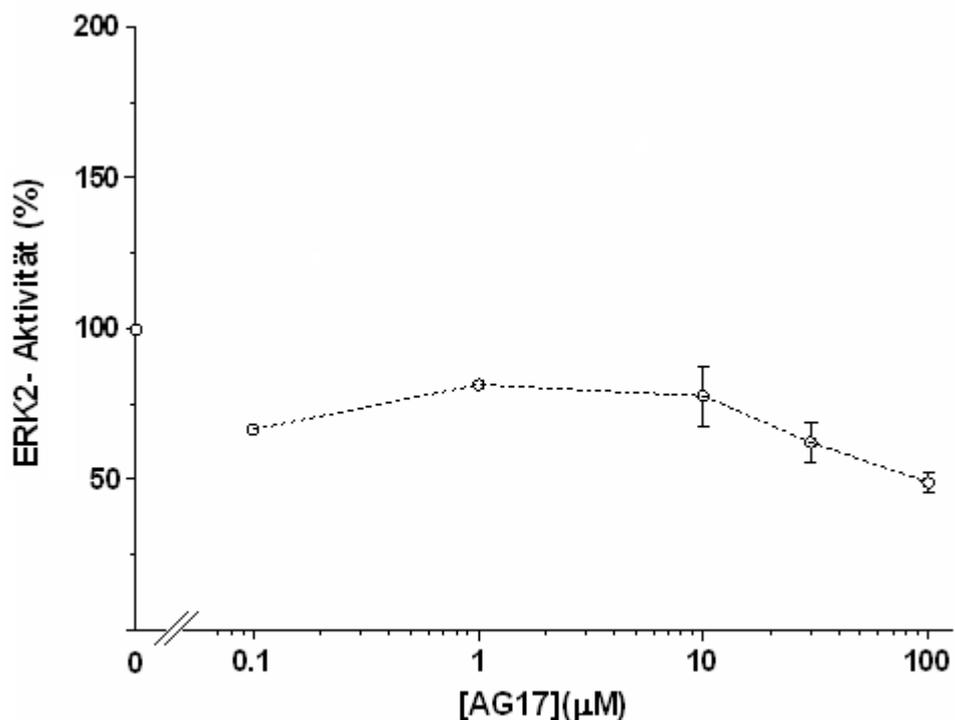


Abb. 31 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf ERK2-Aktivität

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,1, 1, 10, 30 und 100 µM AG17 vorinkubiert und anschließend mit 1 µM Epinephrin und 1 µM U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 µl SDS gestoppt. Die Westernblot-analyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte und SD von 2 Experimenten für 0,1 und 1 µM AG17, sowie 3 Experimenten für 10, 30 und 100 µM AG17.

Die Abb. 32 zeigt die p38-Aktivität unter Vorinkubation mit 10 μ M oder 30 μ M AG17. Die Vorinkubation der Thrombozyten mit AG17 führt dabei zur höheren Aktivität des p38. Dies ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,267$) wegen der großen Streuung der Ergebnisse.

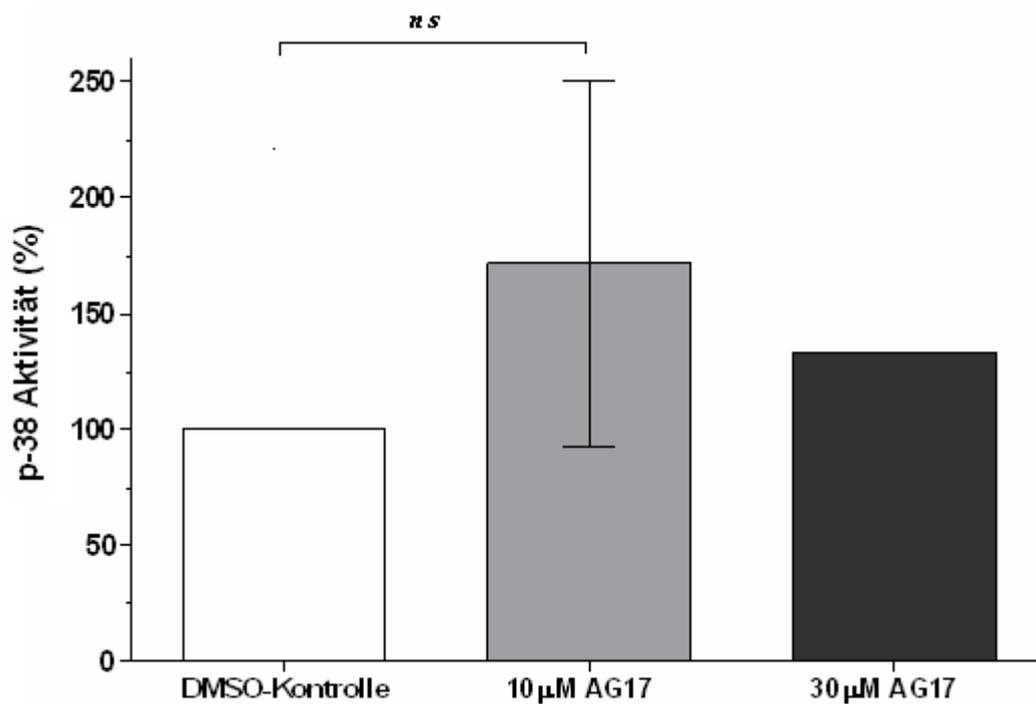


Abb. 32 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität von p38

Gewaschene humane Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 und 30 μ M AG17 oder 0,3% DMSO, vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 90s bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Testes (ns = nicht signifikant). Die Abbildung zeigt den Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten für 10 μ M AG17 und den Mittelwert aus 2 Experimenten für 30 μ M AG17.

4.4.15. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität der Proteinkinase B

Die Abb.33 zeigt die Aktivität der Proteinkinase B nach einer Vorinkubation der Thrombozyten mit 10 oder 30µM AG17. Darunter kommt es zur Zunahme der Proteinkinase B (Akt-) Aktivität. Diese Zunahme ist bei beiden Konzentrationen von AG17 vergleichbar und hat einen Mittelwert von 308% gegenüber der DMSO-Kontrolle, die als 100% definiert wurde.

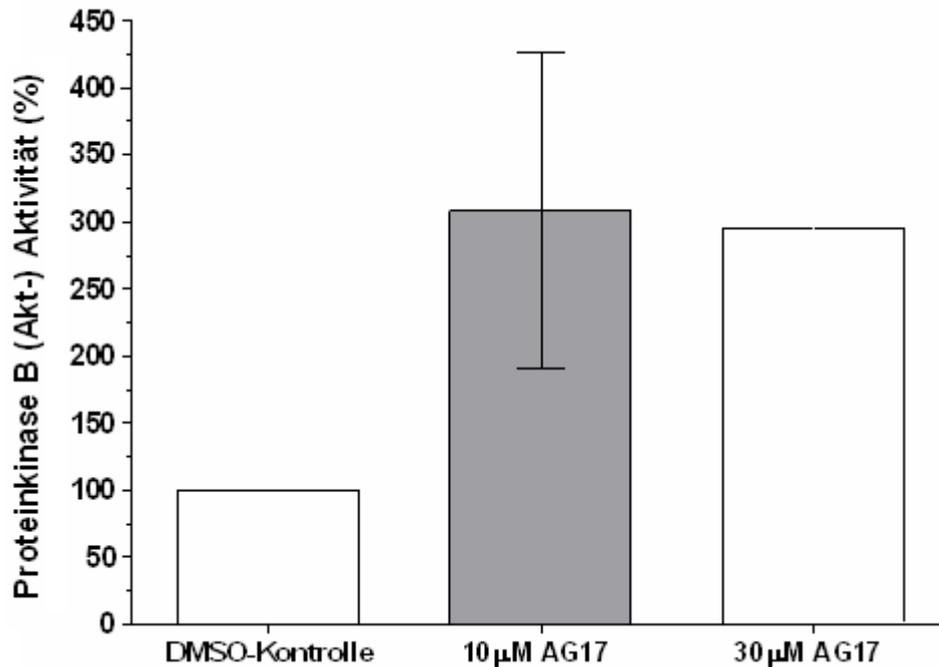


Abb. 33 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG17 auf die Aktivität der Proteinkinase B

Gewaschene humane Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 und 30µM AG17 oder 0,3% DMSO, vorinkubiert und anschließend mit 1µM Epinephrin und 1µM U46619 für 6 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50µl SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte und SD von 3 Experimenten für 10µM AG17 und 2 Experimenten für 30µM AG17.

4.4.16. Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die Aktivität der Proteinkinase B, p38 und ERK2

Um PDGF-Rezeptor abhängige Signalwege zu erforschen untersuchten wir die Aktivität von Proteinkinase B(Akt), ERK2, und p-38 unter Vorinkubation mit AG1478, der als spezifischer EGF-Inhibitor gilt, aber auch den PDGF-Rezeptor zu hemmen vermag. Humane Thrombozyten besitzen keinen EGF-Rezeptor, so dass die Wirkung über die Inhibition des PDGF-Rezeptors zu erklären sind. AG1478 hemmt die PDGFR-Phosphorylierung mit $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (Levitski et al. 1995). Die Abb. 34 zeigt bei einer Vorinkubation mit $30 \mu\text{M}$ AG1478 die Hemmung der Akt-Aktivität auf $56\% \pm 17,3\%$, statistisch signifikant mit $p=0,013$.

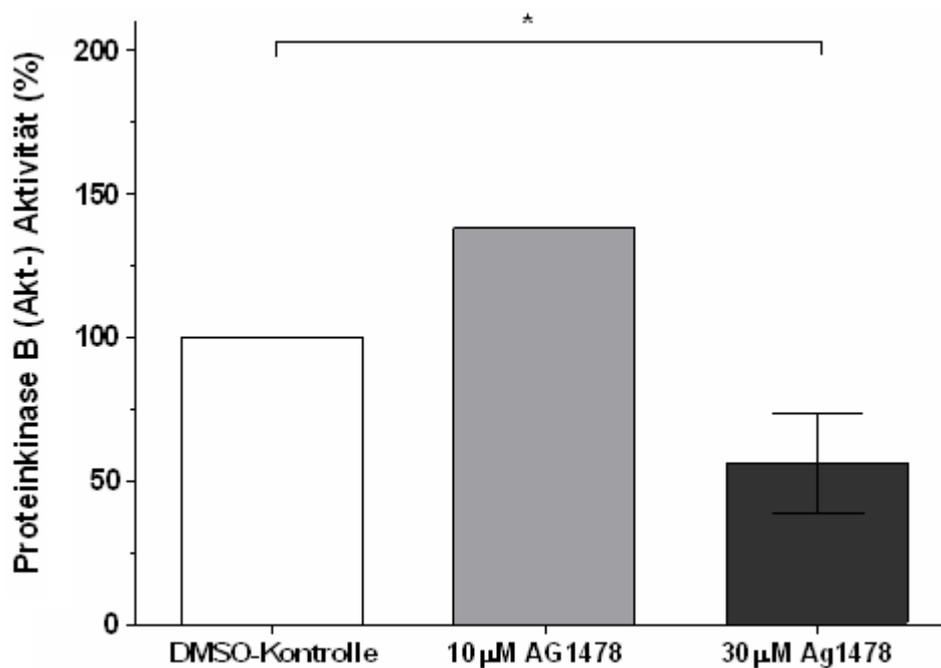


Abb.34 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die Aktivität der Proteinkinase B

Gewaschene humane Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10 und $30 \mu\text{M}$ AG1478 oder 0,3% DMSO, vorinkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ Epinephrin und $1 \mu\text{M}$ U46619 für 6 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Testes ($*= p \leq 0,05$). Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte und SD von 2 Experimenten für $10 \mu\text{M}$ AG1478 und 3 Experimenten für $30 \mu\text{M}$ AG1478.

Die Abb. 35 zeigt die ERK2-Aktivität unter Vorinkubation mit ansteigenden Konzentrationen von AG1478. Bei einer AG1478 Konzentration von 0,3 μ M entspricht die ERK2-Aktivität der DMSO-Kontrolle. Allerdings beobachtet man eine deutliche Zunahme der ERK2-Aktivität schon ab einer AG1478-Konzentration von 3 μ M. Sie kann durch eine weitere Konzentrationszunahme des AG1478 gesteigert werden. Die ERK2-Aktivität erreicht ihren höchsten gemessenen Wert bei einer AG1478-Konzentration von 30 μ M.

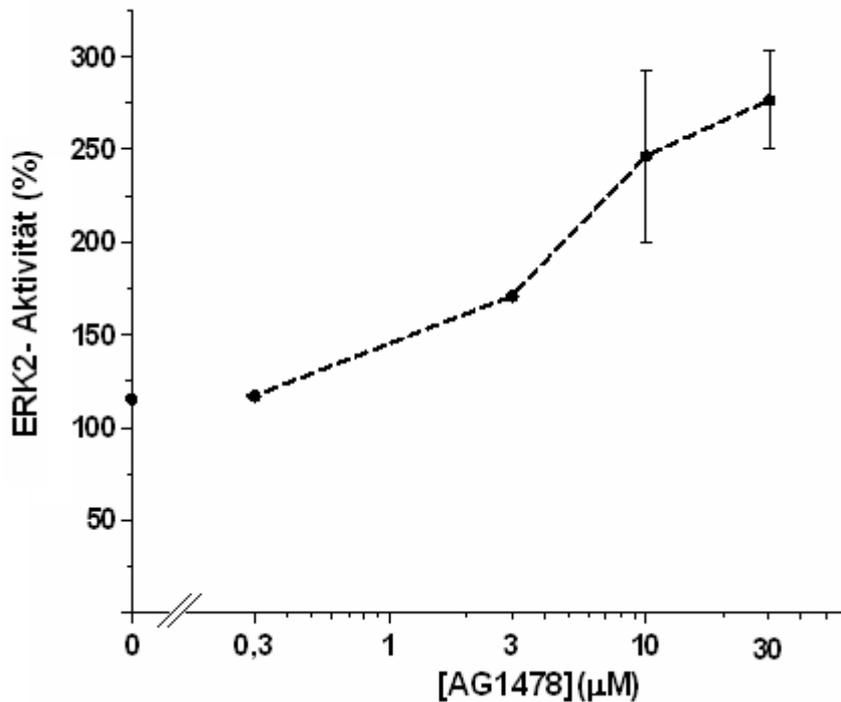


Abb. 35 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die ERK2-Aktivität

Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 0,3, 3, 10 und 30 μ M AG1478 oder 0,3% DMSO vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 2 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblottanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Bei logarithmischer Auftragung der x-Achse ist sie unterbrochen. Die Abbildung repräsentiert Mittelwerte aus 2 Experimenten für 0,3 und 3 μ M AG1478, sowie Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten für 10 und 30 μ M AG1478.

Bei der beobachteten Zunahme der ERK2-Aktivität unter Vorinkubation mit AG1478 stellte sich die Frage, ob diese Zunahme auf eine vermehrte Phosphorylierung des Enzyms und die Aktivierung einer Kinase oder auf die Hemmung einer Phosphatase zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, untersuchten wir die ERK2 mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das phosphorylierte Threonin 183. Die Phosphorylierung des Threonin 183 (T183) gilt als Beweis für das dualphosphorylierte ERK2. Diese Phosphorylierung ist nur möglich wenn die Phosphorylierung des Y185 bereits erfolgt ist.

Die Abb. 36 zeigt die Ergebnisse der Aktivität von p-38 unter Vorinkubation der Thrombozyten mit 30 μ M AG1478. Dabei ist kein Einfluss auf die Phosphorylierung von p-38 bei Vorinkubation mit 30 μ M AG1478 festzustellen.

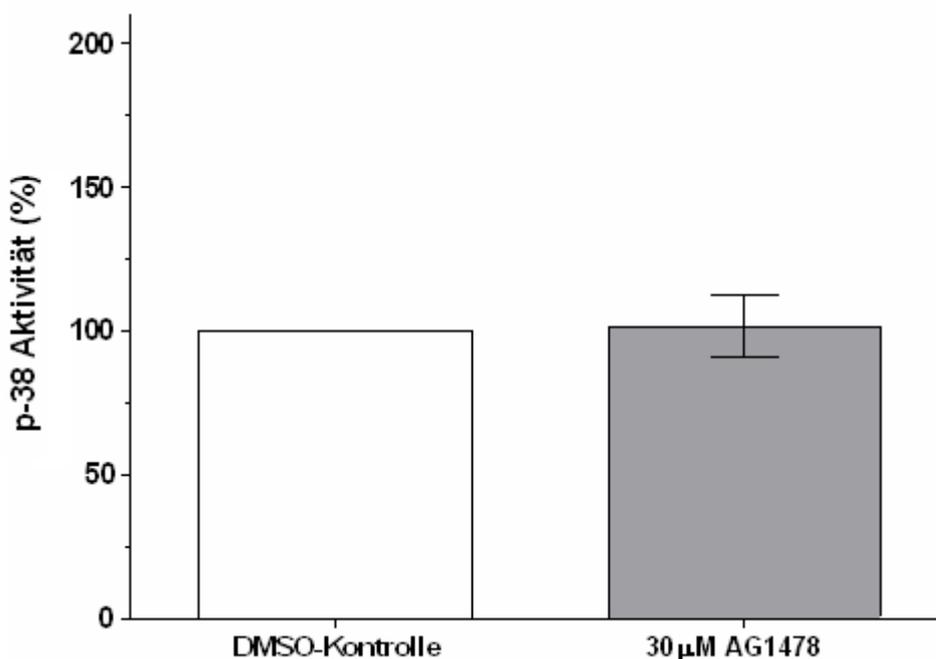


Abb. 36 Einfluss des PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die Aktivität von p-38
Gewaschene Thrombozyten (5×10^8 Thr/ml) wurden für 10 min mit 10, 30 μ M AG1478 oder 0,3% DMSO, vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Epinephrin und 1 μ M U46619 für 90s bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 μ l SDS gestoppt. Die Westernblotanalyse erfolgte entsprechend den Ausführungen im Kapitel Methoden 4.8. Die im Densitometer gemessene optische Dichte der stimulierten DMSO-Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD aus 3 Experimenten.

5. Diskussion

5.1. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Aggregation

PDGF ist ein potentes Mitogen für mesenchymale, epitheliale und kapilläre Zellen. Die bekannten Isoformen von PDGF, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC und PDGF-DD interagieren mit unterschiedlicher Affinität mit den PDGF α - und PDGF β -Rezeptoren. Zwei neu identifizierte Gene der PDGF-Familie, genannt PDGF-C und -D, haben ähnliche genomische Strukturen, die denen von PDGF-A und -B ähneln. Ihre Expression in den Zellen der arteriellen Gefäßwände und anderer vaskulärer Zellen deutet darauf hin, dass sie die Proliferation der Perizyten und der glatten Muskelzellen transduzieren können (Uutela et al. 2001).

Die Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors ist essentiell für die Transmission des mitogenen Signals in die Zellen. PDGF und seine Rezeptoren sind an vielen physiologischen Prozessen mitbeteiligt. Es wird angenommen, dass eine besonders hohe Aktivität des PDGF-Rezeptors eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose, Restenosen der Blutgefäße, Lungenfibrose, Glomerulonephritis und Rheumatoider Arthritis spielt.

Interessanterweise exprimieren einige maligne Tumore sowohl den PDGF-Rezeptor, als auch PDGF, was eine autokrine Stimulation des Tumorwachstums nahe legt.

Die Wirkung des PDGF auf die Thrombozyten selbst wurde untersucht durch exogene Addition des PDGF. Es wurde gezeigt, dass PDGF (50-100ng/ml) die thrombininduzierte Thrombozytenaggregation bei niedrigen Konzentrationen des Thrombins (0,1U/ml) hemmen kann (Vassbotn et al. 1994).

Thrombozyten enthalten PDGF in ihren dichten Granula. Dadurch kann die exogene Gabe von PDGF durch sezerniertes PDGF verfälscht werden. Wir untersuchten daher den Effekt von endogenem PDGF ausgehend von der Rezeptoraktivität und ihrer Hemmung durch spezifische Rezeptorkinaseinhibitoren.

Unter den bekannten PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren finden sich AG34, AG17, AG785, AG805, AG808, AG1295 und AG1296. Allen diesen Substanzen ist gemein, dass sie zu einem gewissen Grad den PDGF-Rezeptor hemmen können. Dabei hemmt AG34 kaum den PDGF-Rezeptor und ist wenig spezifisch. AG1296 hingegen gehört zu der neueren Generation der Tyrphostine mit einer hohen Potenz und einer hohen Selektivität für den PDGF-Rezeptor, was besonders im Hinblick auf die EGF-Rezeptorinhibition wichtig ist (Kovalenko et al. 1994; Lewitzki et al. 1995; Grazit et al. 1996).

Als Tyrosinkinaseinhibitor ändert AG1296 nicht die PDGF-Bindung an den PDGF-Rezeptor und hindert nicht die Rezeptordimerisierung.

Unter Vorinkubation der Thrombozyten mit 10 μ M AG1296 und einer Stimulation mit 1 μ M U46619 beobachteten wir nach 120 Sekunden eine 1,6-fache Zunahme der maximal erreichbaren Aggregation gegenüber den Kontrollen mit DMSO (Abb. 7). Diese Zunahme der

Aggregation ist umso deutlicher, je schwächer der Stimulus ist und lässt sich dann in Abhängigkeit von der AG1296-Konzentration titrieren (Abb. 6).

Unsere Ergebnisse bestätigen die Beobachtung des hemmenden Effektes von PDGF auf die Aggregation, was bisher von der Gruppe von Vassbotn gezeigt wurde (Vassbotn et al. 1994).

5.2. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ spielt eine kritische Rolle für die Thrombozytenadhäsion und Aggregation. In ruhenden Thrombozyten hat es eine niedrige Affinität zu seinen Liganden. An Stellen der vaskulären Verletzung und Exposition der Thrombozyten den Agonisten wie ADP oder vWF, kommt es zur Aktivierung einer Reihe intrazellulärer Signalkaskaden (inside-out signalling), was wiederum zur Aktivierung der ligandbindenden Funktion des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt.

Durch die Fibrinogenbindung („outside-in“ Signal) hat das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung der ERK2 (Nadal et al. 1997; Bugaud et al. 1999). Dieser negative Einfluss führt zur selektiven Dephosphorylierung von Threonin 183 von ERK2, wobei die Phosphorylierung von Tyrosin 185 von dem „outside-in“ Signal des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unbeeinflusst bleibt (Pawlowski et al. 2002).

Die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Der dafür eingesetzte monoklonale Antikörper PAC-1 bindet mit hoher Affinität und Spezifität an das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Schitz et al. 1998).

Die Abb. 9 zeigt die zeitliche Abhängigkeit der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung von Thrombozyten, die mit AG1296 – bzw. DMSO- vorinkubiert und durch U46619 stimuliert wurden. Verglichen mit Kontrollen kommt es bei einer Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1296 einerseits zu einer schnelleren Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und andererseits zu einem deutlich höherem Aktivierungsgrad von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, der über den gemessenen Zeitverlauf von 150 Sekunden aufrechterhalten wird. Diese Zunahme der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung erklärt die Zunahme der Aggregation unter der PDGF-RK-Inhibition durch AG1296 und bedeutet im Umkehrschluß, dass PDGF einen hemmenden Einfluss auf die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung hat.

5.3. Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Sekretion

Thrombozyten besitzen zwei große Populationen von sekretorischen Granula: die α -Granula und die dichten Granula. Weil bei der Sekretion nicht nur inhibierende Substanzen wie PDGF, sondern auch aktivierende Substanzen wie ADP freigesetzt werden und bei einer PDGF-Rezeptorkinaseinhibition das Ausmaß der Aggregation zunimmt, untersuchten wir den Einfluss des PDGFR-Inhibitors AG1296 auf die Sekretion.

P-Selektin befindet sich auf der Membran von α -Granula der ruhenden Thrombozyten. Es wird bei aktivierten Thrombozyten auf der Plasmamembran vorgefunden und dient als Marker für die stattgehabte Sekretion. P-Selektin ist das größte bekannte Selektin mit einer Molmasse von 140kDa (Palabrica et al. 1992, Toffman et al. 1995, Romo et al. 1999).

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die beginnende Aggregation unmittelbar nach der Thrombozytenaktivierung unabhängig von der Sekretion ist (Charo et al. 1977). Außerdem wurde gezeigt, dass ADP und die ADP-induzierte P2Y₁₂-abhängige G α i-Signaltransduktion wichtig für die durch das TXA₂ bedingte Aggregation ist (Paul et al. 1999; Dangelmaier et al. 2001). Dieser scheinbare Widerspruch wurde erklärt durch das Vorhandensein von zwei Sekretionswellen, die bei der Thrombozytenaktivierung durch das TXA₂ hervorgerufen werden. Die beiden Sekretionswellen entstehen nacheinander und ihre Beziehung zur Aggregation ist experimentell belegt. In humanen Thrombozyten wurde die Abhängigkeit der Sekretion von der PI-3-Kinasen abhängigen Signaltransduktion mittels Vorinkubation der Thrombozyten mit LY294002, einem nicht Isotyp spezifischen PI-3-Kinaseinhibitor, nachgewiesen. Im Model mit Mäusen, denen das Gen für die PI-3-Kinase p110 γ abladiert wurde, konnte beobachtet werden, dass die zweite Welle der Sekretion stark reduziert ist (Li et al. 2003).

Mit unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass es bei Vorinkubation mit AG1296 zu einer Zunahme der Sekretion kommt (Abb. 8). Diese Zunahme ist allerdings erst nach 45 Sekunden statistisch signifikant. Dies spricht für eine Zunahme der zweiten Welle der Sekretion, die eine kritische Rolle für die Verstärkung der Aggregation spielt. Die initiale Sekretion bei der Aktivierung scheint gleich zu sein in AG1296-behandelten und -unbehandelten Thrombozyten. Somit nimmt die PDGF abhängige Signaltransduktion einen negativen, modulierenden Einfluss auf die zweite Welle der Sekretion. Da die zweite Welle der Sekretion von PI-3-Kinasen abhängig ist und durch die PDGF-Signaltransduktion gehemmt wird, liegt es nahe, dass auch die AG1296 induzierte Steigerung der zweiten Welle der Sekretion von PI-3-Kinasen abhängig ist.

Möglicherweise ist sogar die PDGF-Signaltransduktion selbst davon abhängig.

Insgesamt lässt es sich festhalten, dass ein Teil der Aggregationssteigerung unter AG1296-Vorinkubation über eine Zunahme der zweiten Welle der Sekretion geschieht.

5.4. PDGF-Rezeptor abhängige Signalwege

5.4.1. Die Rolle der MAPKinasen ERK2 und p38, der Proteinkinase B (Akt) und von Src in PDGFR-abhängigen Signalwegen

Nach der Bindung von PDGF an den PDGF-Rezeptor erfolgt eine Rezeptordimerisierung und anschließende Autophosphorylierung des Rezeptors. Die unterschiedlichen, phosphorylierten Domänen dienen als Andockungsstellen für intrazelluläre Adapterproteine und Enzyme, die wiederum über die Rezeptortyrosinkinaseaktivität phosphoryliert werden können.

Einige der wichtigen Enzyme für die Signalübertragung sowohl in Thrombozyten als auch in anderen Zellen sind Akt, p38-MAPK und ERK 2. Sie sind bekannte Regulatoren der Signaltransduktion und werden durch PDGF stimuliert (Dollof et al. 2005).

Zur Akt-Aktivierung kommt es in Thrombozyten durch Stimulation mit dem TXA₂-Analogon U46619, Collagen oder Thrombin (Kroner et al. 2000, Cho et al. 2002) Humane Thrombozyten enthalten zwei unterschiedliche Typen der Proteinkinase B (Akt): PKB α und PKB β (Kroner et al. 2000). Für die Aktivierung muss die Proteinkinase B in die Zellmembran transloziert, sowie an zwei von einander unabhängigen Stellen Threonin 308 und Serin 473 dual phosphoryliert werden. Da die Aktivierung der Proteinkinase B von PI-3-Kinasen abhängig ist und der MEK-Inhibitor U0126 keinen Effekt auf die ihre Aktivierung hat, werden zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege zu ERK2 und Proteinkinase B angenommen. Eine Vorinkubation mit AG1296 lieferte keine Steigerung der Proteinkinase B-Aktivierung in isolierten Thrombozyten (Abb. 10). Der gleiche Effekt wurde auch in einem Mausmodell bei in vivo Behandlung mit AG1296 beobachtet (Dell et al. 2006). Jedoch lässt sich die Hemmung bei 100 μ M AG1296 am ehesten als eine unspezifische Hemmung bei hoher Konzentration des Inhibitors deuten.

Die MAPK Familie umfasst vier Untergruppen: ERK2, c-Jun(JNK), ERK5/big MAP kinase (BMK1) und die p38-MAPK. Während der Thrombozytenaktivierung kommt es zur Aktivierung von ERK2, JNK und p38 (Kramer et al. 1995; Nadal et al. 1997).

Frühere Studien zeigten, dass ERK2 und p38 durch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden und oft eine antagonistische Rolle für Zellüberleben oder Zelltod haben (Zhang et al. 2001).

Interessanterweise ist neben Akt auch die Aktivierung der p38-MAPK von einer Vorinkubation mit AG1296 unabhängig (Abb. 12). Lediglich die ERK2 wird von der Vorinkubation mit AG1296 beeinflusst. Die hier beobachtete Zunahme der Phosphorylierung spricht für einen inhibitorischen Einfluss des PDGF auf die ERK2 (Flevaris et al. 2009).

Da aber die ERK2-Aktivierung, die eine Steigerung der Aggregation wie bereits nachgewiesen (Garcia et al. 2005) nicht erklären kann, ist ERK2 lediglich als ein Teil der Signaltransduktion

des PDGF-Rezeptors zu verstehen, der die Aggregation nicht beeinflusst. Die funktionelle Bedeutung von ERK2, die von Rosado et al. 2002 beschrieben wurde, liegt in der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms und damit der Ca^{2+} -Homöostase (Flevaris et al. 2009).

Eine mögliche Rolle von ERK2 könnte in der zytoskelettalen Umordnung der Membranproteine durch ERK2-Translokation bzw. in dem das Zytoskelett eine Basis zum Zusammenführen von ERK2 und seinen Substraten bildet liegen (McNicol et al. 2001).

Spätere Studien (Pawlowski et al. 2002) haben jedoch gezeigt, dass nur ein geringer Anteil von ERK2 in die Thrombozytenmembran transloziert wird und dass es sich dabei um die inaktive, monophosphorylierte PY-185 Form handelt und die dual phosphorylierte Form, PY-185 & PT-183 jedoch in der zytosolischen Fraktion vorgefunden wird.

Die Aktivierung nur eines der zentralen Enzyme, bei unverändertem Aktivierungsgrad von Akt und p38, spricht für eine spezifische Wirkung des PDGF-Transduktionsweges. Die Aktivierung der ERK2 geschieht durch die duale Enzymphosphorylierung an Y-185 und T-183. Wir konnten zeigen, dass es sowohl zu einer Y185-, als auch zu einer T183-Phosphorylierungszunahme unter AG1296 Vorinkubation kommt. Die in Westernblott festgestellte Phosphorylierung der ERK2 ist eine Resultante der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozessen aus MEK (positiver Einfluß), einer Phosphatase (negativer Einfluß), sowie einer Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ abhängigen Phosphatase, die selektiv zur Dephosphorylierung von Threonin 183 der ERK2 führt. Da bei PDGF-Rezeptorinhibition durch AG1296 die Aktivierung des Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zunimmt (Abb. 9), ist es anzunehmen, dass der inhibitorische Einfluß des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auch größer wird. Da aber die ERK 2-Aktivierung insgesamt unter Vorinkubation mit AG1296 zunimmt, muss die durch AG1296 induzierte MEK-Aktivierung bzw. die Hemmung der ERK2-Dephosphorylierung den inhibitorischen Einfluß des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ überwiegen.

Um nicht nur ein definiertes Gq-Signal über den TXA_2 -Rezeptor, sondern auch ein definiertes Gi über adrenergen α_{2a} - Rezeptor zu untersuchen, werden Thrombozyten in allen weiteren Versuchen mit U46619 und Epinephrin stimuliert. Dabei ist eine Reduktion der Streuung und eine geringere Standardabweichung (SD) bei der ERK2-Aktivierung zu erzielen (Abb. 17).

Die Zunahme der ERK2-Aktivierung kann auf unterschiedlichen Wegen zustande kommen: entweder ist sie das Ergebnis einer Aktivierung von MEK, oder einer Hemmung der PDGF-abhängigen Phosphatase, die ERK2 dephosphoryliert, oder von beiden. Für diese Fragestellung behandelten wir Thrombozyten gleichzeitig mit U0126, einem spezifischem MEK-Inhibitor und AG1296 bzw. DMSO als Kontrolle. Da bei einer MEK-Inhibition und der daraus resultierenden Phosphorylierung der ERK2 von etwa 15- 30% (bezogen auf nicht mit U0126 vorbehandelte Thrombozyten) (Abb. 18) keine Zunahme der Phosphorylierung zwischen einer Vorinkubation mit DMSO oder AG1296 festgestellt werden konnte, bedeutet das, dass für diesen Effekt die MEK und nicht eine Phosphatase zuständig ist. Eine gleichbleibende Enzymphosphorylierung in diesem Versuch spricht für einen Substratmangel der MEK, die auf eine bestimmte % -Zahl

reduziert ist und nun ein phosphorylierungssteigernder Effekt durch AG1296 unterbleibt, da alle verfügbaren MEK-Enzyme bereits aktiviert sind. Der Effekt der Phosphatase ist auszuschließen, da es sonst bei einer konstanten, verminderten Phosphorylierung durch eine Abnahme der Dephosphorylierung es zu Akkumulation von PYP-ERK2 kommen sollte und damit zur Zunahme der absoluten Anzahl der phosphoryliert vorliegenden Enzyme. Eine wichtige Rolle für die Aktivierung von p38-MAPK und MEK/ ERK2 spielt die Signaltransduktion via Src.

Src → PLCγ ⇒ I₃P(1,4,5) ⇒ DAG ⇒ Ca²⁺ → PKCδ → p38MAPK und/oder MEK/ERK (Jacoub et al. 2006).

Src-Kinasen spielen eine wichtige Rolle für die Thrombozytenaktivierung durch vWF (Marshall et al. 2002). Dabei führt die Src-Inhibition durch PP2 zu ERK-Inhibition sowie zur Blockade der GPIIb-vermittelten TXA₂-Generierung (Garcia et al. 2005). Dies ist besonders wichtig, da eine vermehrte TXA₂-Generierung zu einer Zunahme der Integrin α_{IIb}β₃-Aktivierung führt, was wiederum die Aggregation verstärkt.

Bei Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem Src-Inhibitor PP2 nahm die ERK2-Aktivierung ab, konnte jedoch durch gleichzeitige Vorinkubation mit AG1296 wieder aufgehoben werden (Abb. 19). Die durch PP2 erzielte Hemmung der ERK2 kann durch gleichzeitige Vorinkubation mit AG1296 nicht nur aufgehoben werden, sondern annähernd im gleichen Maße gesteigert werden (Abb. 20). Dies legt es nahe anzunehmen, dass es zwei unterschiedliche Wege zu MEK gibt. Einerseits via Src und andererseits via den PDGF-Rezeptor. Beide Wege müssen eine gemeinsame Endstrecke haben, so dass bei einer Src Hemmung mehr Substrat für den durch AG1296 aktivierten Signaltransduktionsweg zur Verfügung steht. Also ist Src zwar wichtig für die ERK2-Aktivierung, ist jedoch nicht an der PDGF-abhängigen Signalwegen zu ERK2 beteiligt. Die Kontrollen mit PP3, dem biologisch unwirksamen Analogon von PP2, zeigten eine unveränderte ERK2-Aktivierung gegenüber den DMSO Kontrollen.

5.4.2. Die Rolle des G_i- oder G_q-Signals für die PDGFR abhängige ERK2-Aktivierung

Bei unseren Versuchen sehen wir also, dass bei einer Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1296 und Aktivierung der Thrombozyten durch G_q, via den TXA₂-Rezeptor und durch die zusätzliche Rekrutierung eines inhibitorischen G-Proteins, G_z, via den adrenergen α_{2a}-Rezeptor, zu ERK2-Aktivierung kommt. Um den für die PDGF-Signaltransduktion wichtigeren Weg einzuschränken, wurden die Thrombozyten (DMSO- vs. AG1296-vorinkubiert) bei konstantem G_i (1 μM Epinephrin) durch ein steigendes G_q (1, 10 und 30 μM U46619) stimuliert. Dabei nimmt die durch AG1296-Vorinkubation erzielte Zunahme der ERK2-Phosphorylierung

mit steigendem G_q zwar ab, bleibt jedoch nachweisbar selbst bei der höchsten G_q -Stimulation (Abb. 28). Das bedeutet, dass PDGF-Signalltransduktion vorwiegend über G_i abläuft. Im Gegensatz dazu, nimmt die ERK2-Aktivierung nicht nur ab, wenn man bei konstantem G_q ($1\mu\text{M}$ U46619) G_i -Signal erhöht (0,3, 1, 3, 10, 30 und $50\mu\text{M}$ Epinephrin), sondern die Zunahme ist beim großen G_i Stimulus nicht mehr nachzuweisen (Abb. 27). Dies bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen mit konstantem G_i und zunehmendem G_q . Es ist mittlerweile anerkannt, dass G_i -Signale durch G-Protein α -Untereinheiten der Adenylatcyclase und durch β/γ -Untereinheiten die PI-3-Kinasen aktiviert (Dorsam et al. 2004; Hechler et al. 2005). Da die hier untersuchte PDGF-Signalltransduktion und die Zunahme der ERK2-Aktivierung von G_i -Signal abhängen, liegt es nahe, dass die PDGF-Signalltransduktion durch PI-3-Kinasen geschieht bzw. von ihnen abhängig ist.

5.4.3. Die Rolle der Phosphoinositol-3-Kinasen für die PDGFR-abhängige ERK2-

Aktivierung

Phosphoinositol-3-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Adhäsion bei vielen verschiedenen Zelltypen. Die erste Klasse der PI-3-Kinasen wird unterteilt in Klasse Ia und Ib. Die Klasse Ia besteht aus p110 α , p110 β und p110 δ . Sie alle enthalten eine regulatorische Einheit (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) und werden durch Tyrosinkinase reguliert. Die Klasse Ib, mit einem einzigen Vertreter p110 γ und einer einzigartigen Struktur mit p84 und p101 als Untereinheiten, wird hingegen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, insbesondere $G\beta\gamma_i$ aktiviert. Thrombozyten enthalten, obwohl die PI-3-Kinase p110 δ Isoform nur geringfügig exprimiert wird, alle Isoformen der PI-3-Kinase der Klasse I. Zwei Isoformen der PI-3-Kinasen (β und γ) sind an der G_i -abhängigen Regulation des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ beteiligt. Eine Rolle der PI-3-Kinasen bei der Regulation der Integrine, einschließlich des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und der $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ und β_2 -Integrine wurde für Thrombozyten, Leukozyten und glatte Muskelzellen beschrieben, jedoch sind die genauen regulatorischen Mechanismen noch weitgehend unbekannt (Frazier et al. 1999, Constantin et al 2000, Jantzen et al. 2001, Barazi et al. 2002). Die Adhäsion der Thrombozyten ist abhängig von den kooperativen Signalmechanismen zwischen den PI-3-Kinasen der Klasse Ia und Ib. Diese kooperativen Signalwege nehmen Einfluss auf die Formation von stabilen Adhäsionen von Thrombozyt zu Thrombozyt. Dabei ist die p110 β -Isoform der PI-3-Kinase die dominante Isoform in der Regulation der G_i -abhängigen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kann aber auch durch die p110 γ Isoform der PI-3-Kinase (Schönwälder et al. 2007).

Wortmannin, ein nicht selektiver PI-3-Kinaseninhibitor, der alle Isoformen der PI-3-Kinasen hemmt, wurde in unserem Model eingesetzt um die Beteiligung der PI-3-Kinasen an PDGF-abhängigen Signaltransduktionswegen zu ERK2 zu untersuchen.

Bei Vorinkubation der Thrombozyten mit 300nM Wortmannin kommt es zu einer geringeren Steigung der Aggregationskurve, sowie zu einer Reduktion der maximal erreichbaren Aggregation von 71,7%. Eine Steigerung der maximalen Aggregation um 16,3% war in 2 Vorversuchen durch die gleichzeitige Vorinkubation mit AG1296 durchaus zu erzielen. Auch die Aktivierung der ERK2 ist durch Vorinkubation mit Wortmannin gehemmt. Diese Hemmung lässt sich ähnlich wie die Hemmung der Aggregation nicht durch die PDGFR-Inhibition durch AG1296 aufheben und bleibt bestehen bei einer Vorinkubation mit 1000nM Wortmannin (Abb. 21). Dies zeigt einerseits, dass PDGF-Signaltransduktion zur ERK2 über PI-3-Kinasen abläuft und nicht erst stromabwärts von PI-3-Kinase geschieht und andererseits, dass PI-3-Kinasen an der Steigerung der Aggregation (wahrscheinlich über Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung) beteiligt sind. Um die zwei für die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung wichtigen Isoformen der PI-3-Kinasen (p110 β und p110 γ) und ihre Beteiligung bei den PDGF-abhängigen Signalwegen zu ERK2 zu untersuchen, setzten wir die isoformenspezifische PI-3-Kinase Inhibitoren AS252424 und TGX-221 ein.

AS252424 ist ein selektiver und spezifischer Inhibitor der PI-3-Kinase p110 γ . Im Gegensatz zu den Versuchen mit Wortmannin und TGX-221 konnte bei Vorinkubation der Thrombozyten mit AS252424 kein Einfluss auf die Aggregation festgestellt werden (Abb. 23). Bei der ERK2-Aktivierung zeigte eine Vorinkubation mit AS252424 nur eine geringe Abnahme gegenüber den nicht vorbehandelten Thrombozyten. Allerdings war die Zunahme der ERK2-Aktivierung durch AG1296 deutlich reduziert (Abb. 25) und kann 115% nicht überschreiten. Dieser „ceiling effect“ zeigt ein gleiches Verhalten wie bei unseren Untersuchungen an Src und weist auf 3 unterschiedliche Wege zu ERK2. Durch Hemmung der PI-3-Kinase p110 γ und vorausgesetzter gemeinsamer Endstrecke der drei unterschiedlichen Signalwege kommt es zur Zunahme der Substratkonzentration oder der Verfügbarkeit für den durch den AG1296-aktivierten Weg. Wenn alle Substrate phosphoryliert vorliegen, kann die Phosphorylierung nicht mehr gesteigert werden und der „ceiling effect“ ist erreicht.

Um den Einfluss einer weiteren wichtigen Isoform der PI-3-Kinase zu untersuchen, benutzten wir TGX-221, einen Inhibitor der PI-3-Kinase p110 β . Es besitzt eine über 1000-fache Selektivität gegenüber PI-3-Kinase p110 α und einer breiten Spanne von anderen Proteinkinasen. Die dabei erzielte Inhibition der PI-3-Kinase p110 β hat keinen Einfluss auf P2Y12-abhängigen zytosolischen Ca^{2+} -Einstrom oder „shape change“ der Thrombozyten. Bei Vorinkubation mit TGX-221 beobachteten wir eine Abnahme der ERK2-Aktivierung mit steigenden TGX-221-Konzentrationen. Bei geringeren TGX-221 Konzentrationen von 100nM war jedoch eine Steigerung der ERK2-Aktivierung durch die PDGFR-Inhibition mit AG1296 zu

erzielen. Diese Zunahme der ERK2-Aktivierung ist jedoch bei steigender TGX-221-Konzentration immer geringer ausgeprägt bis sie schließlich bei 1000nM kaum mehr nachweisbar ist (Abb.26).

Auch bei der Aggregation kommt es zu einer geringeren Steigung der Aggregationskurve sowie einer herabgesetzten maximal erreichbaren Aggregation. Die Aggregation kann dabei bei großen TGX-221 Konzentrationen nur geringfügig durch AG1296 gesteigert werden (Abb. 22). In 2 Vorversuchen konnte bei einer Vorinkubation mit 100nM TGX-221 und 10 μ M AG1296 eine deutliche Zunahme der Aggregation von 17% auf 43% erreicht werden. Somit sind die PDGFR-abhängigen Signalwege nicht nur abhängig von PI-3-Kinase p110 β , sondern PI-3-Kinase p110 β selbst ist ein unverzichtbarer Teil von ihnen.

Bei höheren Konzentrationen von TGX-221 ab 1000nM verhält sich die ERK2-Aktivierung entsprechend den Versuchen mit Wortmannin. Dies alles legt nahe, dass auch der Wortmannin-Effekt mit dem entsprechenden Einfluss auf die ERK2 und auf die Aggregation durch PI-3-Kinase p110 β bewerkstelligt wird.

5.5. Problematik der verschiedenen PDGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren

5.5.1 Aggregation und Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Kinasen unter

Vorinkubation mit AG17

AG17, (3,5)-di-tert-butyl-4-Hydroxybezylden-Malononitril, gehört zur Gruppe der Tyrphostine, die als Phosphotyrosinkinaseblocker fungieren und durch diese Eigenschaft eine mögliche Anwendung in Erkrankungen, die sich durch eine Hyperaktivität der Tyrosinkinasen auszeichnen, finden könnten. AG17 wurde als spezifischer PDGF- und EGF- Rezeptortyrosinkinaseinhibitor beschrieben (Grazit et al. 1989; Bilder et al. 1991). Die früheren Studien untersuchten die Effekte des AG17 entweder durch in vitro PDGF- bzw. EGF-Rezeptorkinaseinhibition, oder in Zellkulturen, die mit PDGF oder EGF stimuliert wurden. AG17 wurde als potenter Inhibitor zellulärer Funktionen in peripheren mononuklearen Zellen, die mit IL-2 und Lectin stimuliert wurden beschrieben (Lander et al. 1992)

Ähnlich einer Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1296, führt eine Vorinkubation mit AG17 zu einer Steigerung der Aggregation (Abb. 30). Allerdings kann bei den Untersuchungen der Signalwege ein gänzlich abweichendes Aktivierungsmuster der untersuchten Enzyme beobachtet werden. So ist bei der ERK2-Aktivierung keine Zunahme, sondern eine Abnahme zu verzeichnen (Abb. 31). Im Gegensatz dazu nehmen die Aktivierung des p38 (Abb. 32) und der Proteinkinase B (Akt) (Abb. 33) zu.

Aus früheren in vitro Untersuchungen ist es bekannt, dass AG17 in gereinigten Mitochondrien als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung agiert und somit zur ATP-Verarmung führt, wobei der genaue Mechanismus der mitochondrialen Toxizität noch unbekannt ist (Freisleben et al. 1988; Terada et al. 1984). Deshalb wurde eine These geäußert, dass der antiproliferative Effekt von AG17 nicht durch Inhibition der Signaltransduktion, sondern durch seinen Effekt auf den zellulären Metabolismus zustande kommt. Im Gegensatz zu anderen Proteintyrosinkinaseinhibitoren (PTKI), wie z.B. Quercetin oder Genestein, für die bei hohen Konzentrationen des Inhibitors auch eine mitochondrienschädigende Wirkung nachgewiesen wurde (Young et al. 1993), kann AG17 schon in einer Konzentration von 2µM toxisch für die Mitochondrien in lebenden HL-60-Zellen sein (Burger et al. 1995).

Da bei unseren Versuchen hohe Konzentrationen von AG17 erforderlich waren, um einen Effekt auf Thrombozyten nachzuweisen, müssen wir davon ausgehen, dass dieser Inhibitor in seiner Wirkung eher unspezifisch ist und die erzielten Ergebnisse nicht auf der Hemmung des PDGF-Rezeptors alleine beruhen. Obwohl es möglich ist, dass bei sehr niedrigen Konzentrationen des AG17 die spezifische Wirkung des Inhibitors durch proteinkinasevermittelte Signaltransduktion über die Effekte auf die ATP-Produktion dominieren könnte, müssen zukünftige Untersuchungen noch zeigen, ob der Effekt des AG17 in Thrombozyten tatsächlich auf der Hemmung der PDGF-abhängigen Signalwegen beruht und nicht durch mitochondriale Toxizität hervorgerufen wird und in wie weit die Inhibition spezifisch ist.

5.5.2. Aggregation und Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Kinasen unter

Vorinkubation mit AG1478

AG1478, (4-(3-chlorophenylamino)-6,7-dimethoxyquinazoline), ist ein selektiver EGFR-Inhibitor, der auch PDGF-Rezeptortyrosinkinase hemmen kann. (Osherov et al. 1994; Levitzki et al., 1995).

AG1478 inhibiert die PDGFR-Phosphorylierung geringgradig bei 0,1-1µM AG1478 und vollständig bei 10-100µM AG1478 in NIH 3T3 Mausfibroblasten (Lipson et al. 1998).

Die Inhibition von EGFR durch AG1478 geschieht im Vergleich dazu bei 0,1-1µM AG1478 (Lipson et al. 1998).

Die Untersuchungen der Enzym-Aktivierung bei PDGFR-Inhibition durch den EGFR-Inhibitor AG1478 zeigten keine Änderung der Aktivierung von p38 (Abb. 36), jedoch eine Zunahme der ERK2-Aktivierung (Abb. 35). Bei der Akt-Aktivierung beobachtet man eine Hemmung bei Vorinkubation mit 30µM AG1478 (Abb. 34).

Insgesamt entspricht das Aktivierungsmuster der intrazellulären Enzyme bei einer Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1478 dem, der mit AG1296 vorinkubierten Throm-

bozyten. Wie bereits durch Lipson et al. 1998 demonstriert wurde, sind AG1478 und AG1296 potente selektive Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, die für Untersuchungen der Liganden induzierter Signalwege geeignet sind. Dennoch ist es von immenser Bedeutung zu erkennen, dass die Selektivität der Inhibitoren nur bei niedrigen Konzentrationen gegeben ist und dass unterschiedliche Signalwege unterschiedlich sensitiv gegenüber der rezeptorspezifischen Inhibition sind.

5.6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Vorinkubation der Thrombozyten mit AG1296 zu einer Zunahme der Aggregation führt, die über eine Zunahme der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung sowie Steigerung der zweiten Welle der Sekretion bewerkstelligt wird.

Den Signalwegen des PDGF-Rezeptors scheint eine zentrale Rolle bei der ERK2-Aktivierung zuzukommen. Im Gegensatz zu Studien, in denen die Proliferation untersucht wurde und stets die ERK2-Aktivierung durch PDGF nachgewiesen wurde, können wir zeigen, dass in humanen Thrombozyten PDGFR einen negativ regulierenden Einfluss auf die ERK2-Aktivierung hat.

Die PDGFR-abhängigen Signalwege verlaufen unabhängig von Src-Kinasen und sind abhängig von der PI-3-Kinase p110 β -Isoform. Dabei wird dieser Weg am stärksten durch eine G_i-abhängige Kaskade beeinflusst. Das G_i-Signal ist für die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung zwingend notwendig. Dies belegt die zentrale Rolle von PI-3-Kinasen bei der Aktivierung der ERK2 sowie des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$. Die ERK2-Aktivierung geschieht dabei durch eine Aktivierung von MEK-Kinasen und nicht durch Hemmung von PDGFR-abhängigen ERK2-Phosphatasen. ERK2 könnte zusätzlich, parallel zu den Ergebnissen in GPIb-stimulierten Thrombozyten (A.Garcia et al. 2002), zur Zunahme der TXA₂-Generierung führen und somit indirekt zu einer Zunahme der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung führen.

5.7. Ausblick

Die Effekte sowie Singalwege des PDGF-Rezeptors sind so vielfältig, dass es unmöglich ist alles in einer Arbeit abzudecken.

Weitere Untersuchungen sind nötig um die Rolle der anderen PI-3-Kinasen Isotypen (p110 α , p110 δ) zu definieren. Dies könnte mit Hilfe von gentechnisch veränderten *knock-out* Tieren oder eventuell mit Hilfe von isotypspezifischen Inhibitoren untersucht werden.

Bei bis dato zur Verfügung stehenden AK mit geringer Spezifität zum PDGF-Rezeptor wäre eine Entwicklung eines spezifischeren AK mit einer hohen, selektiven PDGF-Rezeptorerkennung hilfreich für den Nachweis der PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibition durch verschiedene Inhibitoren.

Interessant wären Untersuchungen mittels FACS-Analyse von *platelet derived microparticles* (PDMP), die mit der Sekretion auf der Thrombozytenmembran erscheinen und die Verknüpfung zur plasmatischen Gerinnung herstellen. Im Hinblick auf die von uns festgestellte Zunahme der Sekretion nehmen wir an, dass auch die PDMP zunehmen.

Der postulierte Einfluss der PI-3-Kinasen auf die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seine Bedeutung für die Effekte der PDGFR-Tyrosinkinase kann ein weiteres Kapitel der Forschung eröffnen. Weitere Untersuchungen der ERK2 könnten ihre Bedeutung PDGFR-abhängigen Signalwege aufzeigen.

6. Literaturverzeichnis (alphabetisch nach Erstautor)

Abrams, T., Lee, L., Murray L., J., Pryer, N., K., Cherrington, J., M.

SU 11248 inhibits KIT and platelet derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2:471-478.

Barazi, H., O., Li, Z., Cashel, J., A., Krutzsch, H., C., Annis, D., S., Mosher, D., F., Roberts, D., D. Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha Vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem.* 2002; 277:42859-42866

Baurand, A., Eckly, A., Bari, N., Léon, C., Hechler, B., Cazenave, J., P., Gachet, C.

Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost.* 2000;84:484-91.

Baurand, A., Raboisson, P., Leon, C., Baurand, Cazenave, J., P., Bourguignon, J., J., Gachet, C. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 412: 213-221.

Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C., H., Alitalo, K., Eriksson, U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:512-6.

Bilder, G., Krawiec, J., A., McVety, K., Gazit, A., Gilon, C., Lyall, R., Zilberstein, A., Levitzki, A., Perrone, M., H., Schreiber, A., B. Tyrphostins inhibit PDGF-Induced DNA synthesis and associated early events in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 1991; 260: C721-C730

Bilder, G., Wentz, T., Leadley, R., Amin, D., Byan, L., O'Conner, B., Needle, S., Galczenski, H., Bostwick, J., Kasiewski, C., Myers, M., Spada, A., Merkel, L., Ly, C., Persons, P., Page, K., Perrone, M., Dunwiddie, C. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation.* 1999; 99: 3292-3299.

Buchdunger, E., Cioffi, C., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B., J., Lydon, N., B. Phosphotyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295: 139-145.

Burger, A.,M., Kaur, G., Alley, M., C., Supko, J., G., Malspeis, L., Grever, M., R., Sausville, E., A. Tyrphostin AG17, [(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-malonitrile], inhibits cell growth by disrupting Mitochondria. *Cancer Research*, 1995; 2794-2799.

Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Lévy-Toledano, S., Rosa, J., P., Bryckaert, M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood*. 1999; 94:3800-5.

Bryckaert, M., Eldor, A., Fontenay, M., Gazit, A., Oshero, N., Gilon, C., Levitzki, A., Tobelem, G. Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis and tyrosine kinase activity in cultured bone marrow fibroblast by tyrphostins. *Exp Cell Res*. 1992; 37: 255-261.

Cazenave, J., P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., Gachet, C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004; 272:13-28.

Charo, I., F., Feinman, R., D., Detwiler, T., C. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest*. 1977; 60:866-73.

Cho, M., J., Pestina, T., I., Steward, S., A., Lowell, C., A., Jackson, C., W., Gartner, T., K. Role of the Src family kinase Lyn in TxA2 production, adenosine diphosphate secretion, Akt phosphorylation, and irreversible aggregation in platelets stimulated with gamma-thrombin. *Blood*. 2002;99:2442-7.

Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B., Heldin, C., H. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF-receptor. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4917- 4921, 1989.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J., Y., Butcher, E., C., Laudanna, C. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000; 13: 759-769

Coussens, L., Van Beveren, C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, R., L., Isacke, C., M., Verma, I., M., Ullrich, A. Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene forms at carboxyl terminus. *Nature* 320: 277-280, 1986.

Dangelmaier, C., Jin, J., Smith, J., B., Kunapuli, S., P. Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost.* 2001;85:341-8.

Dell, S., Peters, S., Mütter, P., Kociok, N., Jousen, A., M. The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:1928-37.

Dolle, R., Dunn, J., Bobko, M., Singh, B., Kuster, J., E., Baizman, E., Harris, A., L., Sawutz, D., G., Miller, D., Wang, S. 5,7-Dimethoxy-3-(4-pyridinyl)quinolone is a potent and selective inhibitor of human vascular beta-type platelet-derived growth factor tyrosine kinase. *J Med Chem.* 1994; 37: 2627-2629.

Dorsam, R.,T., Kim, S., Murugappan, S., Rachoor, S., Shankar, H., Jin, J., Kunapuli, S., P. Differential requirements for calcium and Src family kinases in platelet GPIIb/IIIa activation and thromboxane generation downstream of different G-protein pathways. *Blood.* 2005;105:2749-56. Epub 2004 Nov 16.

Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood.* 2009;113:893-901.

Frazier, W., A., Gao, A., G., Dimitry, J., Chung, J., Brown, E., J., Lindberg, F., P., Linder, M., E. The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J Biol Chem.* 1999; 274:8554-8560

Fredriksson, L., Li, H., Erikson, U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 197-204.

Freisleben, H., Fuchs, J., Mainka, L., Zimmer, G. Reactivity of mitochondrial sulfhydryl groups toward dithionitrobenzoic acid and bromobimanes under oligomycin-inhibited and uncoupling conditions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1988; 266: 89-97.

Garcia, A., Quinton, T., M., Dorsam, R., T., Kunapuli, S., P. Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood.* 2005;106:3410-4.

Geiger, J., Walter, U. Nonselective cation channels. *Pharmacology, Physiology and Biophysics* (Siemen D. and Hescheler J. eds) pp.281-288, 1993 Birkhäuser Verlag Basel

Goldschmidt, P.J., Lopes, N., & Crawford, L., E. Atherosclerosis and coronary artery diseases. In: *Platelet*. Ed. Michelson A. D., pp. 375-398. CA: Elsevier/ U.S.A., 2002.

Grazit, A., Yaish, P. Gilon, C., Levitzki, A. Tyrphostins 1: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem*. 1989; 32:2344-2362.

Habib, A., Fitz Gerald G., A., Maclouf, J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem*. 1999;274:2645-51.

Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A., Heldin. A major part of platelet derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J. Biol. Chem*. 263: 16493-16498, 1988.

Hammacher, A., M., Nister, B., Westermark. A human glioma cell line secretes three structurally different dimeric forms of platelet derived growth factor. *Eur. J. Biochem*. 176; 179-186, 1988

Hart, C., E., Bailey, M., Curtis, D., A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R., Forstrom, J., W. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 29; 166-172, 1990.

Haugh Laboratory, Signal transduction networks and quantitative cell biology; Schematic presentation of PDGF-receptor and phosphorylation sites. 911 Partners Way, Raleigh, NC 27695-7905, USA

Hechler, B., Cattaneo, M., Gachet, C. The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:150-61.

Hechler, B., Nonne, C., Roh, E., J., Cattaneo, M., Cazenave, J., P., Lanza, F., Jacobson, K., A., Gachet, C. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316:556-63.

Jackson, S., P., Yap, C., L., Anderson, K., E. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:387-92.

Jackson, S., P., Scjoenwaelder, S., M., Goncalves, I., Nesbitt, W., S., Yap, C., L., Wright, C., E., Kenche, V., Anderson, K., E., Dopheide, S., M., Yuan, Y., Sturgeon, S., A., Prabakaran, H., Thompson, P., E. PI-3Kinase p-110 β : A new target for antithrombotic therapy. *Nature Med* 2005, 11, 507-514.

Jantzen, H., M, Milstone, D., S., Gousset, L., Conley, P., B., Mortensen, R., M. Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest.* 2001;108:477-83.

Kilic, T., Alberta, J., A., Zdunek, P., R., Acar, M., Iannarelli, P., O'Reilly, T., Buchdunger, E., Black, P., M, Stiles, C., D. Intracranial inhibition of platelet derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth with an orally active inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res.* 2000; 60: 5143-5150.

Kovalenko, M., Gazit, A., Böhmer, A., Rorsman, C., Rönstrand, L., Heldin, C., H., Waltenberger, J., Böhmer, F., D., Levitzki, A. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res.* 1994 1;54:6106-14.

Kramer, R., M., Roberts, E., F., Strifler, B., A., Johnstone, E., M. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 1995 17;270:27395-8.

Kroner, C., Eybrechts, K., Akkerman, J., W. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem.* 2000;275:27790-8.

Lander, H., Levine, D., Novogrodsky, A. Agonistic effects of tyrphostins on human peripheral mononuclear cells. *Cell. Immunol.*, 1992; 144: 155-168.

Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., Betsholtz, C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994;8:1875-87.

Levitzki, A., Gilon C. Tyrphostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991; 12: 171-173

- Lewitzki, A., Grazit, Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 1995;267:1782-8.
- Li, Z., Xi, X., Du, X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signalling pathway in the activation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem*. 2001; 276:42226-42232.
- Li, Z., Zhang, G., Le Breton, G., C., Gao, X., Malik, A., B., Du, X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem*. 2003; 278: 30725-30731.
- Li, Z., Zhang, G., Feil, R., Han, J., Du, X. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood* 2006; 107:965-972.
- Lipson, K., E., Pang, L., Chen, H., Tai J.-M., Hirth, P., Grazit, A., Levitzki, A. and McMahon. Inhibition of PDGF and EGF signalling events after treatment of cells with specific synthetic inhibitors of tyrosine kinase phosphorylation. 1998; *J. Pharmacol Exper. Ther.* 285: 844-852.
- Marshall, S., J., Asazuma, N., Best, D., Wonerow, P., Salmon, G., Andrews, R., K., Watson, S., P. Glycoprotein IIb-IIIa-dependent aggregation by glycoprotein Iba is reinforced by a Src family kinase inhibitor (PP1)-sensitive signalling pathway. *Biochem J*. 2002; 361: 297-305.
- Matsui, T., Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J., Aaronson, S. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF-receptor Genes. *Science* 243: 800-803, 1989.
- McNicol, A., Shibou, T., S., Pampolina, C., Israels, S., J. Incorporation of map kinases into the platelet cytoskeleton. *Thromb Res*. 2001;103:25-34.
- Nadal, F., Lévy-Toledano S., Grelac, F., Caen, J., P., Rosa, J., P., Bryckaert, M. Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in platelets. *J Biol Chem*. 1997; 272:22381-22384.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J., W., Zirngibl, H., Fässler, R. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 2001;20:2120-30.

Nieswandt, B., Bergmeier, W., Eckly, A., Schulte, V., Ohlmann, P., Cazenave, J., P., Zirngibl, H., Offermanns, S., Gachet, C. Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood*. 2001;97:3829-35.

Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., Mokhtari-Nejad, R., Rackebrandt, K., Cazenave, J., P., Ohlmann, P., Gachet, C., Zirngibl, H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*. 2001 Feb; 193: 459-69.

Nieswandt, B., Schulte, V., Zywiec, A., Gratacap, M., P., Offermanns, S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin α IIb β 3 activation in platelets. *J Biol Chem*. 2002; 277: 39493-8.

Nylander, S., Mattsson, C., Ramström, S., Lindahl, T., L. The relative importance of the ADP receptors, P2Y12 and P2Y1, in thrombin-induced platelet activation. *Thromb Res*. 2003; 111: 65-73.

Offermanns, S., Laugwitz, K., L., Spicher, K., Schultz, G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:504-8.

Offermanns, S., Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G-proteins. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1994; 350: 329-38.

Ohlmann, P., Laugwitz, K., L., Nürnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J., P., Gachet, C. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J*. 1995; 312:775-9.

Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.M., Sajer, S.A., Furie, B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*. 1992; 359: 848-51.

Paul, B.Z., Jin, J., Kunapuli, S. Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem*. 1999; 274: 29108-14.

Pavelka, M., Roth, J. Funktionelle Ultrastruktur; Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben S.324-25; Springer-Verlag, Wien/New York 2005.

Pawlowski, M., Ragab, A., Rosa, J.P., Bryckaert, M. Selective dephosphorylation of the threonine(183) residue of ERK2 upon (alpha)IIb(beta)3 engagement in platelets. *FEBS Lett.* 2002;521:145-51.

Pomel, V., Klicic, J., Covini, D., Church, D., Shaw, J., P., Roulin, K., Burgat-Charvillon, F., Valognes, D., Camps, M., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B., Perrin, D., Leroy, D., Gretener, D. Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent and selective inhibitors of phosphoinositide 3-Kinase γ . *J.Med.Chem.* 2006; 49, 3857-3871.

Presek P., Fälker K., Lange D., ADP secretion and subsequent P2Y12 receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets. *Thromb Haemost.* 2004; 92:114-23.

Romo, G., M., Dong, J., F., Schade, A., J., Gardiner, E., E., Kansas, G., S., Li, C., Q., McIntire, L., V., Berndt, M., C., López, J., A. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *J Exp Med.* 1999; 190: 803-14.

Rosado, J., A., Brownlow, S., L., Sage, S., O. Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca²⁺ entry by conformational coupling in human platelets. *J Biol Chem.* 2002; 277: 42157-63.

Rosenkranz, S., Kazlauskas, A. Evidence for distinct signalling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* 1999; 16:201-16

Pearson, G., Robinson, F., Beers, Gibson, T., Xu, B., E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M., H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22: 153-83.

Samuelsson, B., Folco, G., Granström, E., Kindahl, H., Malmsten, C. Prostaglandins and tromboxanes: biochemical and physiological considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 1978; 4:1-25.

Savi, P., Herbert, J., M. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31:174-83.

Schmitz, B., Thiele, J., Otto, F., Farahmand, P., Henze, F., Frimpong, S., Wickenhauser, C., Fischer, R. Evidence for integrin receptor involvement in megakaryocyte-fibroblast interaction: a possible pathomechanism for the evolution of myelofibrosis. *J Cell Physiol.* 1998; 176: 445-55.

Schmidt, Lang; *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie; Kapitel V (W. Jelkmann): Blut und Immunabwehr; S. 510-527; Modifiziert Abb. 23.7; Springer-Verlag 2007.*

Schoenwaelder, S., M., Ono, A., Sturgeon, S., Chan, S., M., Mangin, P., Maxwell, M., J, Turnbull, S., Mulchandani, M., Anderson, K., Kauffenstein, G., Rewcastle, G., W., Kendall, J., Gachet, C., Salem, H., H., Jackson, S., P. Identification of a unique Co-operative Phosphoinositide 3-Kinase Signalling Mechanism Regulation Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Adhesive Functions in Platelets. *J Biol Chem.* 2007; 282: 28648-28658.

Soriano P. The PDGF- α receptor is required for the neural crest cell development and the normal patterning of the somites. *Development* 124: 2691-2700, 1997

Terada, H., Kumazawa, N., Ju-Ichi, M., Yoshikawa, K. Molecular basis of the protonophoric and uncoupling activities of the potent uncoupler SF-6847 ((3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene) malonitrile) and derivatives. Regulation of their electronic structures by restricted intramolecular rotation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 767: 192-199.

Tymkewycz, P.M., Jones, R.L., Wilson, N.H., et al. Heterogeneity of thromboxane A_2 (TP-) receptors: Evidence from antagonist but not agonist potency measurements. *Br. J. Pharmacol.* 102: 607-614, 1991.

Uutela, M., Laurén, J., Bergsten, E., Li, X., Horelli-Kuitunen, N., Eriksson, U., Alitalo, K. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFC genes. *Circulation.* 2001;103: 2242-7.

Vassbotn, F., S., Havnen, O., K., Heldin, C., H., Holmsen, H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269:13874-9.

Wymann, M., P., Pirola, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1436: 127-50.

Yacoub, D., Theoret, J.-F. et al. Essential role of Protein Kinase C δ in Platelet Signalling, $\alpha_{IIb}\beta_3$ Activation, and Thromboxane A2 Release. *J Biol Chem.* 2006; 281:30024-30035.

Yarden, Y., Escobedo, J., A., Kuang, W., J., Yang-Feng, T., L., Daniel, T., O., Tremble, P., M., Chen, E., Y., Ando, M., E., Harkins, R., N., Francke, U. Structure of the receptor for the platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323: 226-232, 1986.

Young, S., W., Poole, R., C., Hudson, A., T., Halestrap, A., P., Denton, R., M., Tavaré, J., M. Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein-kinase independent systems. *FEBS Lett.*, 1993; 278-282.

Young, M., A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., Kuriyan, J. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains and Hck underlies their activation by c-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 2001; 105: 115-26

Yu, J., Lokker, N., Hollenbach, S., Apatira, M., Li, J., Betz, A., Sedlock, D., Oda, S., Nomoto, Y., Matsuno, K., Ide, S., Tsukuda, E., Giese, N., A. Efficacy of the novel selective platelet derived growth factor receptor antagonist CT52923 on cellular proliferation, migration, and suppression of neointima following vascular injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298:1172-1178.

Zhang, J., Vanhaesebroeck, Rittenhouse, S., E. Human platelets contain p110delta phosphoinositide 3-kinase. 2002 *Biochem biophys. Res. Commun.* 296, 178-181.

Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., Pelech, S. Stress induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 6905-6908.

7. Thesen der Dissertation

1. Der PDGF-Rezeptorkinaseinhibitor AG1296 steigert die Aggregation der Thrombozyten. Dabei kommt es auch zu einer Zunahme der Sekretion.
2. Der PDGF-Rezeptorkinaseinhibitor AG1296 steigert die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$.
3. Einer der von PDGF-Rezeptor abhängigen Signalwege führt über die MEK-Kinase zur Zunahme der ERK2-Aktivität. Dieser Weg ist abhängig von der PI-3-Kinase p110 β und unabhängig von PI-3-Kinase p110 γ und Src.
4. Der PDGF-Rezeptorkinaseinhibitor AG17 zeigt nur bei hohen Konzentrationen eine Wirkung auf Thrombozyten. Dabei ist seine mitochondriale Toxizität problematisch, so dass keine selektive Wirkung am PDGF-Rezeptor für Thrombozyten postuliert werden kann.
5. Das gleiche Aktivierungsmuster der intrazellulären Kinasen wie ERK2, p38 und Akt kann sowohl bei Vorinkubation mit PDGF-Rezeptorkinaseinhibitor AG1296 als auch mit dem EGF- und PDGF-Rezeptorkinaseinhibitor AG1478 nachgewiesen werden.

Inhibition der PDGF-Rezeptortyrosinkinase in humanen Thrombozyten: funktionelle Aspekte und PI-3-Kinase abhängige Aktivierung von ERK2

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Willi Groß

geboren am 18.12.1978 in Bajram-Ali, Turkmenistan

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Groß

Vorname: Willi

Geb.- Datum: 18.12.1978

Schulbildung

- 1985-1993 Mittelschule in Bajram-Ali (Turkmenistan)
- 1985-1993 Städtische Musikschule Bajram-Ali, Ausbildung in Solfeggio, Chor und Klavier,
Abschluss: Gesamtnote „sehr gut“
- 11/ 1993 Umsiedlung nach Deutschland
- 1994-1999 Deutsch-Orden Gymnasium, Bad Mergentheim,
Abschluss: Abitur (NC=1,5)
- 1996 Schüleraustausch Digne les Bains, Frankreich
- 1996 Aufnahme in den deutschen Schach-A-Kader
- 1996 Ehrenamtliche Leitung der Schach-AG des Deutsch-Orden-Gymnasiums
- 1996-1998 städtische Musikschule (Klavier und Gitarre)
- 1996-1997 Symphonieorchester des Deutsch-Orden-Gymnasiums (Klavier und Cembalo),
Tournee „da Capo al Finland“
- 5/ 1998 Gewinn des Schulwettbewerbes der französischen Sprache und als Preis Teilnahme
am Deutsch-Französischen Austausch 07/1998

Wehrdienst

- 11/1999- 8/2000 Artillerie, Topographisches Batallion in Idar-Oberstein und Ulm

Akademische Weiterbildung

- 9/ 2000- 6/ 2001 Akademisches Jahr in *Education First*, Santa Barbara, USA;
- 1/ 2001-6/ 2001 Studium der altgriechischen Philosophie an *City College Santa Barbara*, USA; Abschluss: Gesamtnote „sehr gut“
- 4/2001 *Proficiency* Stufe im “*Test of English for International Communication (TOEIC)*”

Studium und Promotion

- 10/2001- 3/2008 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 9/ 2003 Ärztliche Vorprüfung

- 2004 Wissenschaftliche Hilfsassistentz im Kursus der Neuroanatomie
- 2/ 2005 Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. med. Peter Presek in Insitut
der Pharmakologie und Toxikologie Halle(Saale)
- 9/ 2005 Erster Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens der Medizin *USMLE Step1*
- 8/2006-7/2007 Praktisches Jahr:
1. Tertial Dermatologie: Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie Halle(Saale)
2. Tertial Innere Medizin: *Stony Brook University*, Long island, New York, USA.
3. Tertial Chirurgie: *Texas Heart Institute*, Houston, Texas, USA
- 10/ 2007- 3/ Wissenschaftliche Arbeit in Insitut der Pharmakologie und Toxikologie, Halle(Saale)
2008
- 4/ 2008 Staatsexamen
- 6/ 2008 zweiter Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens der Medizin *USMLE Step2*

Berufliche Weiterbildung und Laufbahn

- Seit 6/ 2008 Assistenzarzt in der inneren Medizin, Franziskushospital,
Osnabrück
- Seit 10/ 2009 Weiterbildung zur Erlangung der Zusatzbezeichnung
Palliativmedizin
- 11/ 2009- 12/ 2009 Kurs der Rettungs- und Notfallmedizin, Arnsberg
- 4/ 2010 Kurs der Intensivmedizin, Arnsberg

Osnabrück, den

Willi Groß

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Willi Groß, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr.med.) selbständig und nur unter Verwendung zugelassener Hilfsmittel, ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe und erstmalig einreiche.

Osnabrück, den

Willi Groß

Erklärung über Promotionsversuche

Ich, Willi Groß, erkläre hiermit, dass ich keine frühere Promotionsversuche unternommen habe und die vorliegende Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr.med.) erstmalig einreiche.

Osnabrück, den

Willi Groß

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne so viele Menschen, die mich schon vor und während der Arbeit unterstützt haben nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich hiermit meinen herzlichsten Dank aussprechen und hoffe dass ich auch in der Zukunft auf diese Menschen zählen kann.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr.med. Peter Presek danken für den stetigen Zuspruch, Ermunterung und wissenschaftlichen Antrieb der Dissertation. Ich fand in Ihm einen brillianten Wissenschaftler, der mir viel theoretisch und praktisch beibringen konnte und stets Zeit für mich fand.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Cornelia Lange, die mir die Handhabung des Westernblotts zeigte und viele Westernblottfilme in einer ausgezeichneten Qualität für mich entwickelte.

Ich danke Frau Dr.rer.nat. Angelika Frühauf, die mich tatkräftig in der Durchführung der Experimente mittels Durchflusszytometrie unterstützte.

Hochachtungsvoll danke ich meinen Eltern, die mich immer in allen meinen Bestreben und ganz besonders bei der Dissertation auf jede erdenkliche Art unterstützt haben.

Und „*last, but not least*“ danke ich herzlich meiner Freundin und jetzt Ehefrau und Mutter unseres Sohnes, Elena Groß, für die endlose Geduld und Verständnis, die Sie mir immer entgegen zu bringen vermochte.