

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Sektion Klinische Pharmakologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

# **Regulation der ADP-Rezeptor-abhängigen Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in humanen Thrombozyten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Danica Lange

geboren am: 24. November 1976 in Rinteln

Betreuer: Prof. Dr. Peter Presek

Gutachter: Prof. Dr. Artur-Aron Weber

Datum der Verteidigung: 26. Februar 2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013342**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013342>]

**Meinen Eltern**

**Marion und Hans Lange**

## **Referat und bibliografische Beschreibung**

In Thrombin stimulierten Thrombozyten ändert sich das Muster der Phosphorylierung an Tyrosinresten bei einer Reihe von Proteinen. In dieser Arbeit waren die Signalwege der G-Protein gekoppelten ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 von besonderem Interesse. Um diese Signaltransduktionen zu untersuchen, wurden Thrombozyten aus dem Vollblut freiwilliger Spender gewonnen und nach verschiedenen Aktivierungsexperimenten mittels Western-Blot die an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine untersucht. Außerdem wurden Aggregationsmessungen im Aggregometer durchgeführt.

Nach einem primären Stimulus, zum Beispiel durch Thrombin, kommt es zur Degranulation und anschließend zur autokrinen Stimulation der Thrombozyten durch die freigesetzten Substanzen, unter anderem auch ADP. Es konnte gezeigt werden, dass dabei eine Reihe von Proteinen an Tyrosinresten phosphoryliert werden. Nach Inhibierung des P2Y12-Rezeptors mit einem spezifischen Antagonisten werden die Tyrosinphosphorylierungen von zwei Proteinen der relativen Molmasse von 27 und 31 kDa verhindert. Die Signale des P2Y1-Rezeptors haben jedoch keinen Einfluss auf diese Phosphorylierungen an Tyrosinresten.

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sich hierbei nicht um ein Phänomen handelt, das an die Aggregation gebunden ist.

Die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 können auch durch andere Thrombozyten aktivierende Substanzen induziert werden. Experimente mit diesen Substanzen brachten weiteren Aufschluss über intrazelluläre Signaltransduktionswege, insbesondere auf der Ebene der G-Proteine.

Außerdem wurden die Effekte der Adenylatzyklase und der Phosphoinositol-3-Kinase auf die genannten Phosphorylierungen untersucht.

Mit den Daten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Änderungen der Phosphorylierungen an Tyrosinresten einiger Proteine in humanen Thrombozyten sowohl von einem primären Stimulus, als auch durch die Degranulation induzierten sekundären Signale inhibitorischer G-Proteine abhängig sind.

Lange, Danica: Regulation der ADP-Rezeptor-abhängigen Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in humanen Thrombozyten. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2007

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
---------------------------------	----------

<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....</b>	<b>VII</b>
---	------------

<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>IX</b>
--	-----------

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>1.1 Humane Thrombozyten und Hämostase.....</b>	<b>1</b>
---	----------

<b>1.2 Intrazelluläre Signalkaskaden während der primären Hämostase ....</b>	<b>5</b>
--	----------

1.2.1 Primäres Aktivierungssignal über membranständige Rezeptoren.....	5
--	---

1.2.2 Sekundäre Signale über membranständige Rezeptoren .....	5
---	---

<b>1.3 Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten als Signaltransduktionsmechanismus in humanen Thrombozyten .....</b>	<b>12</b>
---	-----------

<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
--------------------------------------	-----------

<b>2.1 Material.....</b>	<b>15</b>
--------------------------	-----------

2.1.1 Chemikalien .....	15
-------------------------	----

2.1.2 Agonisten .....	16
-----------------------	----

2.1.3 Antagonisten und Inhibitoren.....	16
---	----

2.1.4 Antikörper .....	17
------------------------	----

2.1.5 Geräte und Materialien.....	17
-----------------------------------	----

<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>18</b>
--------------------------	-----------

2.2.1 Isolierung menschlicher Thrombozyten.....	18
---	----

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl der isolierten Thrombozyten.....	19
--	----

2.2.3 Aggregationsmessung .....	19
---------------------------------	----

2.2.4 Aktivierung von Thrombozyten und Präparation der Proteine für die Immuno(Western)-Blot-Analytik.....	19
---	----

2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	20
---	----

2.2.6 Immuno(Western)-Blot .....	21
----------------------------------	----

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Effekte primärer Thrombozytenaktivatoren auf die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten .....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Phosphorylierung an Tyrosinresten nach Stimulation mit Thrombin .....	24
<b>3.2</b>	<b>Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 durch weitere Agonisten und deren Abhängigkeit von sekundären Signalen .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Induktion der Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 durch 2-MeS-ADP, Kollagen und U46619 .....	32
3.2.2	Abhängigkeit der Kollagen-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 vom Signalweg des Thromboxan A <sub>2</sub> -Rezeptors.....	33
<b>3.3</b>	<b>Beeinflussung der Thrombin- und Kollagen-induzierten Aggregation durch die Signale der ADP-Rezeptoren .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Effekte der ADP-Rezeptor-Antagonisten auf die mit Thrombin induzierte Aggregation humaner Thrombozyten .....	34
3.3.2	Abhängigkeit der mit Thrombin und Kollagen induzierten Aggregation vom Thromboxan A <sub>2</sub> -Rezeptor-Signalweg .....	37
<b>3.4</b>	<b>Abhängigkeit der Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 31 und 27 kDa vom Glykoprotein IIbIIIa-Komplex .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5</b>	<b>Signale der G-Proteine.....</b>	<b>40</b>
3.5.1	Verstärkung der Thrombin-induzierten Phosphorylierung von p27 und p31 an Tyrosinresten durch Adrenalin.....	40
3.5.2	Imitierung der Phosphorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten durch die G-Proteine Gi und Gq mit Adrenalin und Serotonin.....	41
<b>3.6</b>	<b>Hemmung der Gi-abhängigen Signalwege bei der Thrombin-induzierten Phosphorylierung von p27 und p31 an Tyrosinresten....</b>	<b>42</b>

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Ausgangspunkt .....	45
4.2	Stellenwert der ADP-Rezeptoren bei der Phosphorylierung an Tyrosinresten von Proteinen humaner Thrombozyten .....	46
4.3	Indirekte Aktivierung der ADP-Rezeptoren durch Sekretion nach Stimulation anderer membranständiger Rezeptoren.....	47
4.4	Aktivierung des Glykoprotein IIbIIIa-Komplexes durch Signale des P2Y <sub>12</sub> -Rezeptors.....	49
4.5	Signale der G-Proteine.....	50
4.6	Aktivität der Adenylatzyklase und cAMP-Konzentrationen.....	52
4.7	Beteiligte Protein-Tyrosinkinasen und -phosphatasen .....	53
4.8	Problematik der Identifizierung von an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen.....	54
4.9	Zusammenfassung und Schlussfolgerung .....	55
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
	<b>Thesen .....</b>	<b>64</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XII</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>XIII</b>
	<b>Originalarbeiten.....</b>	<b>XIII</b>
	<b>Vorträge.....</b>	<b>XIII</b>
	<b>Poster.....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>XV</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>XVI</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XVII</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<b>Abbildung 1:</b> Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel über vWF und den thrombozytären vWF-Rezeptor .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Stabilisierung der Adhäsion über weitere Adhäsionsrezeptoren: Fibronektion, Kollagen, Laminin.....	2
<b>Abbildung 3:</b> Vernetzung von Thrombozyten durch Fibrinogen .....	4
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Reaktionskaskaden nach Aktivierung der P2Y-Rezeptoren.....	11
<b>Abbildung 5:</b> Zeitabhängigkeit der Thrombin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten .....	25
<b>Abbildung 6:</b> Spezifität des monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10 ....	26
<b>Abbildung 7:</b> Abhängigkeit der mit Thrombin induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten durch freigesetztes ADP und nachfolgender ADP-Rezeptor-Aktivierung.....	29
<b>Abbildung 8:</b> Konzentrationsabhängigkeit der AR-C66931MX-sensitiven Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 nach Stimulation mit Thrombin.....	31
<b>Abbildung 9:</b> ADP abhängige Phosphorylierung der Tyrosinreste von p27 und p31 durch Kollagen, U46619 und 2-MeS-ADP .....	32
<b>Abbildung 10:</b> Abhängigkeit der mit Kollagen induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 von der Aktivierung des Thromboxan A2-Rezeptors.....	34
<b>Abbildung 11:</b> Effekte der ADP-Rezeptor-Antagonisten auf die mit Thrombin induzierte Aggregation gewaschener humaner Thrombozyten .....	36
<b>Abbildung 12:</b> Abhängigkeit der mit Thrombin und Kollagen induzierten Aggregation vom Thromboxan A2-Rezeptor-Signalweg.....	38
<b>Abbildung 13:</b> Abhängigkeit der Phosphorylierung von p31 und p27 von der Signalübertragung nach Fibrinogenbindung an den Glykoproteinen IIb-IIIa-Komplex.....	40
<b>Abbildung 14:</b> Verstärkung der mit Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 durch Adrenalin .....	41
<b>Abbildung 15:</b> Phosphorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten durch Stimulation der G-Proteine Gi und Gq durch Adrenalin und Serotonin .....	42

<b>Abbildung 16:</b> Effekte von Inhibitoren der PI-3-Kinase und der Adenylatzyklase auf die Thrombin induzierte Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 .....	43
<b>Abbildung 17:</b> Schematische Darstellung der Signale der Phosphorylierung von p27 und p31 und der involvierten G-Proteine .....	51
<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Zusammensetzung der Gele in der PAGE.....	21
<b>Tabelle 2:</b> Densitometrische Auswertung von Westernblots der Thrombin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p39, p34, p31, p29 und p27 im zeitlichen Verlauf .....	27



## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
(c)AMP	(cyclo)Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Col	Kollagen
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Feldstärke
ECL	enhanced chemiluminescence system, Western-Blot-Detektionssystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ERK2	Extrazellulär regulierte Kinase 2
Fn	Fibronectin
GP	Glykoprotein
HRP-konjugiert	horseradish-Peroxidase-konjugiert
I	Stromstärke in Amper
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
KCl	Kaliumchlorid
KQAGDV	Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Aspartat-Valin

Lam	Laminin
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PG	Prostaglandin
PI-3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PRP	plättchenreiches Plasma
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RGD(S)	Arginin-Glycin-Aspartat(-Serin)
SDS	Dodecylsulfate Natrium-Salz
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SFLLRN	Serin-Phenylalanin-Leucin-Leucin-Arginin- Asparagin
SPD	storage pool deficiency (Speichergranula- defizienz)
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylen-diamine
Thr	Thrombin

TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TP	Thromboxanrezeptor
U	Spannung in Volt
vWF	von-Willebrand-Faktor

### Verwendete Maßeinheiten

A, mA	Ampere, Milliampere
ad lib	ad libitum (nach Belieben)
°C	Grad Celsius
E (Feldstärke)	Volt/Meter
kg, g, mg, µg	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Gravitationskonstante (in m <sup>3</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>-2</sup> )
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM, nM	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
min	Minuten
pH	potentia Hydrogenii
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunden
U, mU	Units, Milliunits
V, mV	Volt, Millivolt
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)

# 1 Einleitung

## 1.1 Humane Thrombozyten und Hämostase

Humane Thrombozyten sind kernlose Zellen, die durch Abschnürungen aus Megakaryozyten des Knochenmarks entstehen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Blutstillung und der arteriellen Thrombusformation.

Unter normalen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten frei im Blut. Werden sie jedoch aktiviert, zum Beispiel durch freiliegendes Kollagen der subendothelialen Matrix an der Innenseite eines geschädigten Gefäßes, dann laufen eine Reihe von Reaktionskaskaden ab, die letztendlich zur Aggregation führen.

Zunächst geschieht die Adhäsion, also Anlagerung der Thrombozyten über Membranglykoproteine an die Gefäßwand. Diese Kontaktaufnahme mit der Gefäßwand verläuft über die Interaktion zwischen dem am Subendothel Kollagen-immobilisierten vWF und dem thrombozytären Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor (vWF) (Glykoprotein Ib-V-IX) (Abbildung 1). Diese Interaktion setzt eine sehr hohe Affinität des Glykoproteins Ib-V-IX zum vWF voraus, da im arteriellen Stromgebiet große Scherkräfte herrschen. Die Bedeutung dieses Vorganges zeigt sich bei Patienten, die einen angeborenen Defekt des vWF (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) oder seines Rezeptors (Glykoprotein Ib; Bernard-Soulier-Syndrom) haben. Bei diesen Patienten besteht eine erhöhte Blutungsneigung.

Im Anschluss an die primäre Adhäsion erfolgt die Stabilisierung dieser ersten Kontaktaufnahme über weitere Adhäsionsrezeptoren aus der Familie der Integrine (Fibronektin-, Kollagen- und Lamininrezeptor; Abbildung 2).

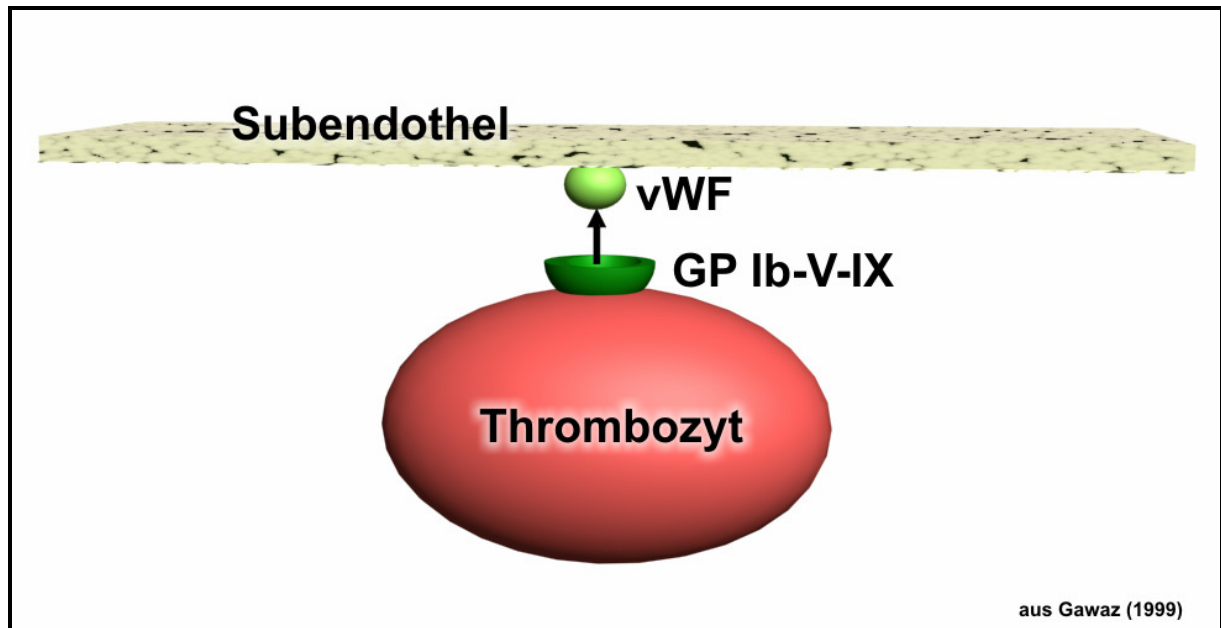


Abbildung 1: Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel über vWF und den thrombozytären vWF-Rezeptor

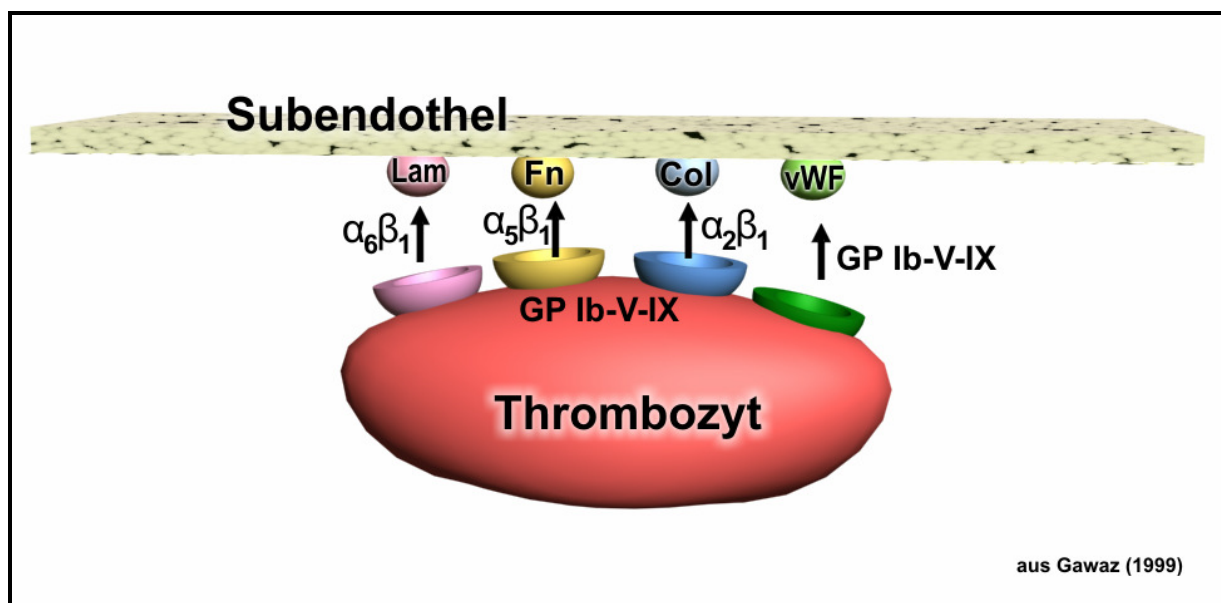


Abbildung 2: Stabilisierung der Adhäsion über weitere Adhäsionsrezeptoren: Fibronectin (Fn), Kollagen (Col), Laminin (Lam)

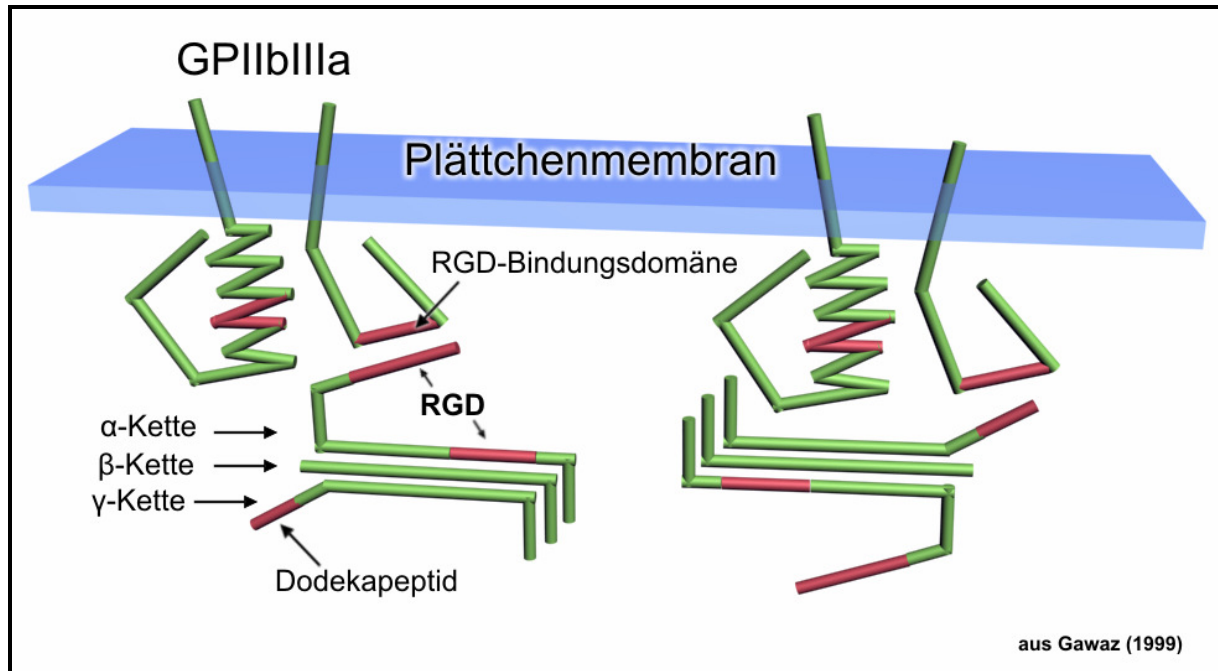
Insbesondere durch die Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und eine Formänderung (shape change) induziert. Die typische diskoidale Form der ruhenden Thrombozyten ändert sich durch multiple Ausstülpungen (Pseudopodien) der Zellmembran. So wird ihre Oberfläche von ca.  $8 \mu\text{m}^2$  auf ca.  $13 \mu\text{m}^2$  vergrößert. Außerdem werden eine Reihe von positiven Rückkopplungsmechanismen innerhalb der Zelle und an der Zellmembran in Gang gesetzt, wie zum Beispiel die Synthese von Thromboxan  $A_2$  (TXA $_2$ ) aus Arachidonsäure oder die Freisetzung von niedermolekularen Verbindungen wie ADP, ATP, Ca $^{2+}$ , Serotonin und anderer Mediatoren aus dichten Granula. Der Begriff „dichte Granula“ beruht auf ihrer hohen Dichte im Elektronenmikroskop. Außerdem finden sich noch  $\alpha$ -Granula und Lysosomen in den Thrombozyten. Die  $\alpha$ -Granula sind zahlenmäßig am häufigsten vorhanden und enthalten verschiedenste Enzyme, adhäsive Proteine, Wachstumsfaktoren, zytokinähnliche Proteine und Koagulationsfaktoren. Die Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme und ähneln den Lysosomen anderer Zellen.

Anschließend aggregieren die Thrombozyten, das heißt, sie bilden in Verbindung mit löslichen Plasmakomponenten einen Thrombus, der unter physiologischen Bedingungen jedoch auf den Bereich der Gefäßwandläsion beschränkt bleibt (primäre Hämostase). Dieser Thrombus ist aber noch relativ fragil und löst sich leicht wieder von der Gefäßwand ab. Stabilisiert wird der Thrombus letztendlich über die Calcium-abhängige Bindung von Fibrinogen (sekundäre Hämostase). Calcium und Fibrinogen liegen einerseits im Plasma vor, andererseits aber auch in thrombozytären Granula, so dass sie während der Aggregation in die Umgebung des Thrombozyten abgegeben werden. Während des Ablaufs der Gerinnungskaskade wird Fibrinogen, durch Thrombin katalysiert, zu Fibrin umgewandelt.

Die Bindung des Fibrinogens wird erst durch die Konformationsänderung am Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex möglich und ist streng von Ca $^{2+}$ -Ionen abhängig. Diese Konformationsänderung wird durch intrazelluläre Signalübertragung nach Aktivierung der Thrombozyten induziert. Die Bedeutung des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes wird bei Patienten mit Thrombasthenie (Morbus Glanzmann-Naegeli) deutlich. Auch haben diese Patienten eine höhere Blutungsneigung, da bei ihnen der Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex fehlt oder zumindest funktionslos ist.

Durch die Konformationsänderung liegen jetzt hochaffine Fibrinogenbindungsstellen vor, so dass Fibrinogenmoleküle binden können. Fibrinogen ist ein multivalentes Adhäsionsmolekül, das aus

je zwei  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Ketten besteht. Im Zentrum des Moleküls treffen sich alle sechs Ketten; dieser Bereich bildet die E-Domäne. Die nach außen gewandten Bereiche werden D-Domänen genannt. Über spezifische Bindungsregionen in der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kette (RGD- und eine Dodekapeptidsequenz: KQAGDV) kann ein Fibrinogenmolekül an jeweils zwei Thrombozyten binden (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Fibrinogenbrücke zwischen zwei GPIIb/IIIa-Molekülen**

Die Regulation dieser Thrombusformation verläuft über inhibitorische Mechanismen der Gerinnungskaskade (Antithrombin III, Protein C und S, u.a.). Beim Heilungsprozess wird der Thrombus durch Fibrinolyse wieder abgebaut [28].

## **1.2 Intrazelluläre Signalkaskaden während der primären Hämostase**

### **1.2.1 Primäres Aktivierungssignal über membranständige Rezeptoren**

#### **Der Thrombin-Rezeptor**

Der Thrombin-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen und gehört zur Familie der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR). Vier verschiedene PAR-Subtypen sind bis dato identifiziert worden. PAR-1,-3 und -4 werden von Thrombin aktiviert, PAR-2 dagegen von Trypsin [14]. Humane Thrombozyten exprimieren PAR-1 und PAR-4, wobei PAR-1 mengenmäßig überwiegt [15].

Thrombin ist eine Serinprotease, die im Plasma als inaktive Form (Prothrombin) vorliegt und im Verlauf der Gerinnungskaskade aktiviert wird. Der Thrombin-Rezeptor PAR-1 wird aktiviert, wenn Thrombin am N-terminalen Ende der Exodomäne des Rezeptors durch proteolytische Spaltung ein neues N-terminales Ende mit der Sequenz SFLLRN freigelegt hat. Diese Sequenz bindet intramolekular an den Rezeptor und aktiviert ihn [94], so dass dieses primäre Signal in die Zelle geleitet wird und sekundär über intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen zum Beispiel die Freisetzung von dichten Granula induziert wird, was unter anderem die sekundäre Aktivierung der P2Y-Rezeptoren durch ADP zur Folge hat.

Neuere Studien weisen darauf hin, dass auch Glykoprotein Ib (GPIb) ein Rezeptor für Thrombin sein könnte, und dass sowohl die Aktivierung von PAR-1, als auch GPIb für die komplette Thrombinantwort in Thrombozyten benötigt wird [19, 55].

### **1.2.2 Sekundäre Signale über membranständige Rezeptoren**

Auf der Oberfläche der Thrombozyten finden sich noch eine Reihe weiterer unterschiedlicher, funktionell wichtiger Rezeptoren. Neben dem Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex) und dem Glykoprotein Ib-V-IX für den vWF sind vor allem drei P2-Rezeptoren für Adeninnukleotide und der TXA<sub>2</sub>-Rezeptor ebenso wichtig für die Aggregation.

Insbesondere der TXA<sub>2</sub>-Rezeptor hat eine wichtige Funktion bei der Signalverstärkung. Es handelt sich hierbei um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, dessen Ligand, Thromboxan A<sub>2</sub>,



durch die Thromboxansynthasen aus Phospholipiden der Zellmembran gebildet wird. Wird diese Synthese verhindert, beispielsweise durch Acetylsalicylsäure, ist die Aggregation der Thrombozyten effektiv geblockt.

### **Die P2Y-Rezeptoren**

Bei den P2Y-Rezeptoren werden zwei verschiedene Rezeptorsubtypen unterschieden: die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (P2X) und die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren [26]. Bis dato sind sieben verschiedene P2X (P2X1-7) [45] und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) [1, 10, 87] identifiziert worden. Davon sind drei auf humanen Thrombozyten zu finden: der ionotrope P2X1-Rezeptor und die zwei metabotropen P2Y1- und P2Y12-Rezeptoren.

Beim P2X1-Rezeptor handelt es sich um einen ATP-Rezeptor und bei den beiden anderen um ADP-Rezeptoren [26]. P2Y1 und P2Y12 sind von zentraler Bedeutung für die ADP-induzierte Aggregation. Eine aktuelle Übersicht zur Funktion dieser Rezeptoren findet sich bei Hechler et al. [37].

Bei Stimulation mit ADP verläuft die Initiation der Aktivierung über das G-Protein Gq, hier an den P2Y1-Rezeptor gekoppelt; die alleinige Stimulation ist jedoch nicht ausreichend, um die komplette Thrombozytenaktivierung zu gewährleisten. Dafür wird die zusätzliche Aktivierung des G-Proteins Gi, in diesem Fall durch den P2Y12-Rezeptors benötigt, das die Antwort auf ADP und auch die anderer Agonisten potenziert und vervollständigt [26].

Die Existenz eines thrombozytären Gi-gekoppelten ADP-Rezeptors war schon seit geraumer Zeit vermutet und auch durch zahlreiche Studien belegt worden; die Identifizierung als P2Y12-Rezeptor gelang jedoch erst Anfang 2001 [40].

### **Der P2X1-Rezeptor**

Die Funktion des P2X1-Rezeptors ist lange Zeit kontrovers diskutiert worden [57]. Zunächst hielt man auch diesen Rezeptor für einen ADP-Rezeptor. Kürzlich konnte er jedoch als ein ATP-Rezeptor identifiziert werden, der vor allem für die initiale Formänderung (shape change) der Thrombozyten nach Stimulation und für die Aktivierung durch niedrige Konzentrationen von Kollagen verantwortlich ist. Besonders unter der Einwirkung höherer Scherkräfte im arteriellen

Gefäßsystem und für die Thrombusformation in kleinen Arteriolen scheint dieser Rezeptor eine wichtige Rolle zu spielen [36, 71, 73]. Da der Rezeptor zur Desensitierung durch Herunterregulation der Zahl der Rezeptoren an der Zellmembran nach Aktivierung mit ADP neigt, sind die Untersuchungen zur Funktion jedoch schwierig.

Nach Aktivierung des P2X1-Rezeptors kommt es zu einem schnellen Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum in den Thrombozyten (Abbildung 4). Dieser Calciumeinwärtsstrom ist sehr kurzfristig und von geringerem Ausmaß als nach Aktivierung des P2Y1-Rezeptors [93]. Bei der mit Kollagen induzierten Thrombozytenaktivierung wird über den P2X1-Rezeptor auch die extrazellulär regulierte Kinase 2 (ERK2) aktiviert. Die Autoren vermuten, dass die Sekretion über die Aktivierung von ERK2 und anschließender Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase geregelt ist [72, 91].

Obwohl der P2X1-Rezeptor bei alleiniger Aktivierung nicht in der Lage ist eine Aggregation hervorzurufen, so leistet er doch einen wichtigen Beitrag bei der Antwort auf niedrig dosiertes (0,5-1 µg/ml) Kollagen [71].

### **Der P2Y1-Rezeptor**

Der P2Y1-Rezeptor besteht aus 373 Aminosäuren und hat den klassischen Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben transmembranären Domänen. Der menschliche P2Y1-Rezeptor ist im Herzmuskel, in Blutgefäßen, in glatten Muskelzellen, im Nervengewebe, im Hoden, in der Prostata, in den Ovarien und auch auf Thrombozyten zu finden [78].

Mit Mäusen, die eine Deletion im kodierenden Gen für den P2Y1-Rezeptor aufweisen, wurden wichtige Untersuchungen zum Stellenwert dieses Rezeptors bei der Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten mit ADP durchgeführt. Wie erwartet, zeigen die Thrombozyten dieser Mäuse nach Stimulation mit ADP keinen shape change und nur bei sehr hohen Konzentrationen an ADP kommt es zu verminderter und reversibler Aggregation [51]. Auch bei Experimenten mit P2Y1-Rezeptor-spezifischen Antagonisten (A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P, A<sub>2</sub>P<sub>5</sub>P, MRS2179) zeigte sich eine verminderte Aggregation bei Aktivierung mit ADP. Diese Ergebnisse zeigen, dass der P2Y1-Rezeptor bei ADP-induzierter Aggregation eine Initiierungsfunktion hat [35, 85].

Nach Aktivierung des P2Y1-Rezeptors mit ADP kommt es über ein stimulatorisches G-Protein, G<sub>q</sub>, zu einer Reihe intrazellulärer Signale, die in Formänderung und eine vorübergehende

Aggregation münden. Die Formänderung der Thrombozyten wird durch zwei verschiedene Signalkaskaden hervorgerufen, und zwar einerseits durch den Gq-vermittelten Calciumeinstrom aus intrazellulären Speichern und andererseits durch G12/13-vermittelte Aktivierung der Rho-Kinase [74], beides Signalwege, die durch ADP-Stimulation über den P2Y1-Rezeptor aktiviert werden. Nach Aktivierung des P2Y1-Rezeptors wird über Gq die  $\beta$ -Isoform der Phospholipase C aktiviert. Dadurch kommt es zur Bildung der „Second Messenger“ Inositoltriphosphat und Diacylglycerol, die einen Calciumanstieg in der Zelle, im Gegensatz zum P2X1-Rezeptor jedoch aus intrazellulären Speichern, bewirken (Abbildung 4). Dieser Calciumeinstrom induziert die Bildung eines Faktors, der seinerseits die Aktivierung der p38 Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) bedingt [16].

Es wird angenommen, dass der P2Y1-Rezeptor auch an die Rho-Kinase gekoppelt ist [74], jedoch steht diese Behauptung den Ergebnissen der Experimente mit Mäusen mit P2Y1-Deletion gegenüber, bei denen mit ADP keine Formänderung erreicht werden konnte [68, 70]. Es ist bis dato immer noch ungeklärt, ob der Rezeptor wirklich beide dieser Signalkaskaden aktiviert [74].

Zusammenfassend kann man dem P2Y1-Rezeptor eine zentrale Rolle beim shape change der Thrombozyten und der Initiierung des primären Stimulus bei Signalen durch Agonisten, die sekundär zu einer ADP-Freisetzung führen, zuordnen. Dabei kommt es bei alleiniger P2Y1-Aktivierung zu einer verminderten, reversiblen Aggregation [34].

Die Signale des P2Y1-Rezeptors führen außerdem durch die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zur Aktivierung von Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ). Die  $\text{PLA}_2$  katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus den Membranphospholipiden. AA ist der Verläufer einer Reihe von Eikosanoiden wie zum Beispiel des Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ).  $\text{TXA}_2$  wird durch die Thromboxansynthasen gebildet und stimuliert nach Interaktion mit dem Thromboxanrezeptor (TP) die Sekretion von Granulainhaltstoffen [3].

**Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor**

Die pharmakologisch wichtige Funktion des zweiten ADP-Rezeptors, P2Y<sub>12</sub>, wurde bereits viele Jahre vor seiner eigentlichen Identifizierung beschrieben und ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden.

Studien mit den Thienopyridin-Derivaten Ticlopidin und Clopidogrel, zwei antithrombotisch wirksame Medikamente, brachten wichtige Erkenntnisse zur Charakterisierung dieses Rezeptors bei Aktivierung der Thrombozyten mit ADP und seiner Rolle im Rahmen der Thrombose [86]. Clopidogrel ist nach einer aufwendigen klinischen Studie (CAPRIE) mit fast 20 000 Patienten seit 1997 zur Thromboseprophylaxe zugelassen [8]. Ticlopidin und Clopidogrel sind sehr ähnlich in ihrer Struktur, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrem Nebenwirkungsspektrum und ihren pharmakologischen Eigenschaften. Beide sind jedoch „Prodrugs“, das heißt, sie sind nicht selbst die pharmakologisch wirksamen Substanzen, sondern werden erst durch hepatische Metabolisierung in ihre biologisch aktiven Metaboliten umgewandelt.

Weiter brachten die Untersuchungen mit selektiven P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten der AR-C-Reihe wichtige Informationen zur Funktion und intrazellulären Signalübertragung, und konnten dazu beitragen den Ablauf der Reaktionskaskaden besser zu verstehen.

Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor ist an das inhibitorische G $\alpha$ <sub>i2</sub>-Protein gekoppelt, wodurch es zur Hemmung der Adenylatzyklase (AC) kommt (Abbildung 4). Diese Kopplung war bereits vor der Identifizierung des Rezeptors bekannt [69].

Die Signalübertragungen durch das G $\alpha$ <sub>i2</sub>-Protein führen letztendlich zur Aktivierung des Glykoproteins IIb/IIIa, so dass bei Mäusen mit einer Deletion im G $\alpha$ <sub>i2</sub>-Gen sowohl die Glykoprotein IIb/IIIa-Aktivierung, die Hemmung der Adenylatzyklase und die Aggregation nach Aktivierung mit ADP oder anderen Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin, deutlich reduziert ist [43]. Experimente mit spezifischen Antagonisten und mit Thrombozyten von Patienten, die keinen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor exprimieren, haben hier die essentielle Funktion des Rezeptors bei ADP-induzierter Aggregation demonstriert [65]. Bei Aktivierung der Thrombozyten mit Agonisten, die eine ADP-Freisetzung aus dichten Granula bewirken, kommt es nach Blockade des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors noch zur Formänderung und zum Calciumeinstrom, jedoch zu einer deutlich verminderten Aggregation. Die Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors haben folglich eine verstärkende Funktion sowohl bei der ADP-induzierten, als auch bei der mit anderen Agonisten induzierten

Aggregation. Das Ausmaß der Verstärkung ist abhängig von der Stärke des primären Stimulus. So wird zum Beispiel bei Aktivierung mit hohen Thrombin-Konzentrationen dieses Verstärkungssignal nicht mehr benötigt, wie erstmals bei der Aktivierung der Phospholipase D (PLD) gezeigt werden konnte [60].

Nach P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Aktivierung wird einerseits über die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatzyklase gehemmt. Dieser Mechanismus ist aber nicht allein für die Effekte des Rezeptors verantwortlich. Zusätzlich wird durch das  $\beta/\gamma$ -Dimer des G-Proteins ebenso die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) aktiviert. Es werden prinzipiell anhand der Struktur, des Regulationsmodus und der Substratspezifität drei Klassen dieser Kinase unterschieden: Klasse I, II und III. Dabei ist die Klasse I für die Produktion des „Second Messengers“ Inositoltriphosphat verantwortlich und wird weiter unterteilt in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - und  $\gamma$ -Isoformen. Die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -Isoformen werden typischerweise von Tyrosinkinasen aktiviert und die  $\gamma$ -Isoform von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [42]. In Thrombozyten sind alle Klasse I-Isoformen zu finden. Thrombozyten von Mäusen, die keinen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor exprimieren, zeigten eine ADP-Antwort, die von der Aktivierung der PI-3-Ky abhängig ist [44], was noch einmal zeigt, dass bei Aktivierung der Thrombozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Aktivierung der  $\gamma$ -Isoform von großer Bedeutung ist [39].

Insgesamt sind die Signalwege vom P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor ins Innere der Zelle zwar relativ gut untersucht, wurden aber trotzdem bezüglich ihrer Bedeutung für die Aggregation unter physiologischen Bedingungen noch nicht komplett verstanden.

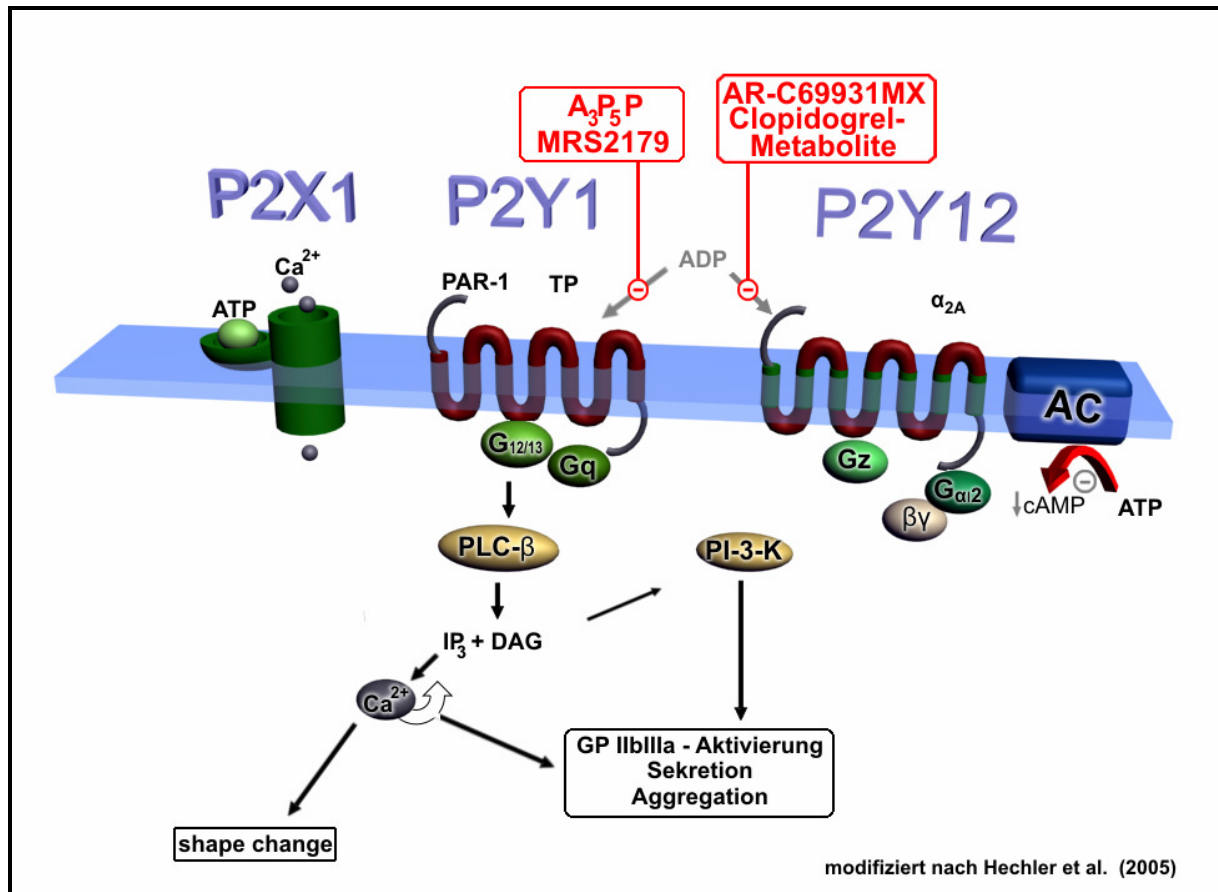


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reaktionskaskaden nach Aktivierung der P2Y-Rezeptoren

### Der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor

Ein weiterer wichtiger Rezeptor auf humanen Thrombozyten ist der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor (TP). Zwei Isoformen dieses Rezeptors konnten identifiziert werden: TP $\alpha$  und TP $\beta$  [38]. Obwohl mRNA beider Isoformen in Thrombozyten gefunden wurde, ist TP $\alpha$  die dominante Form auf den Thrombozyten [31, 61]. Beide Rezeptorsubtypen haben über G $\alpha_q$  Einfluss auf die PLC, ebenso aktivieren sie G<sub>12/13</sub>-abhängige Signaltransduktionswege. Ihre Einflussnahme auf die Aktivität der Adenylatzyklase ist jedoch gegensätzlich: bei TP $\alpha$ -Stimulation wird sie aktiviert, während TP $\beta$  hemmenden Einfluss auf ihre Aktivität und damit die cAMP-Konzentration hat.

Die Aktivierung der Thrombozyten mit Thromboxan A<sub>2</sub> führt ebenso wie die Stimulation mit Thrombin oder Kollagen indirekt zur Freisetzung von ADP aus dichten Granula, was in unseren Experimenten mit P2Y-Antagonisten bestätigt wurde, so dass auf diesem Wege ebenso das primäre Signal verstärkt wird [3].

Der Stellenwert des TP-Rezeptors wird anhand von Mäusen, die keinen TP-Rezeptor exprimieren, deutlich. Hier ist die Blutungszeit deutlich verlängert. Interessanterweise ist die Kollagen-induzierte Aggregation bei den TP-knock-out-Mäusen vermindert, während die ADP-induzierte Aggregation normal bleibt [90].

Klinisch kommt dem TP-Rezeptor somit ebenfalls eine große Bedeutung bei: die TP-Rezeptor-Antagonisten Ifetroban, Vapiprost und auch SQ29548 (in unseren Experimenten verwendet) vermindern effektiv die Thrombozytenaggregation [7].

Auch BM-573, einerseits ein Thromboxan-Synthase-Inhibitor und andererseits auch ein TP-Rezeptor-Antagonist zeigte tierexperimentell eine deutliche Wirksamkeit bei der Verhinderung von akuten Myokard-Infarkten [80].

### **1.3 Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten als Signaltransduktionsmechanismus in humanen Thrombozyten**

Ein wichtiger Mechanismus zur Weiterleitung intrazellulärer Signale ist die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten [41, 76]. Von Ferrel und Martin wurden 1988 zeitlich unterschiedliche Wellen von Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen im Molekulargewichtsbereich zwischen 27 und 170 kDa nach Stimulation humaner Thrombozyten mit Thrombin beschrieben [23]. Die gleichen Autoren haben des Weiteren gezeigt, dass die Phosphorylierungen einer Reihe von Proteinen durch „outside-in“-Signalgebung des Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplexes geregelt sind [24]. Auch in neueren Untersuchungen ist die Regulation der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten von Interesse, jedoch hauptsächlich im relativen Molmassenbereich oberhalb von 50 kDa [62].

Thrombin induziert über seinen Gq-gekoppelten Rezeptor in den Thrombozyten eine Reihe von Ereignissen, wie zum Beispiel die Freisetzung von ADP aus dichten Granula. Durch diese sekundäre Freisetzung von ADP werden die purinergen ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 aktiviert, und eine Reihe intrazellulärer Transduktionsmechanismen, wie auch Phosphorylierungen und -dephosphorylierungen an Tyrosinresten in Gang gesetzt.

In dieser Arbeit soll insbesondere der Stellenwert des Regulationsmechanismus der Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten bei der Thrombozytenaktivierung gezeigt

werden. Es sind bis dato noch nicht alle Signalübertragungsmechanismen nach Aktivierung dieser Rezeptoren verstanden worden, aber es werden nach und nach mehr involvierte Moleküle identifiziert und somit immer mehr Wege der Signalübertragung verstanden [26, 27, 48].

Nach Thrombinstimulation werden die primären Stimuli zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten durch die P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor Signale mehr als durch die Signale des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors verstärkt [66]. Thrombozyten von Patienten, die einen angeborenen Defekt im für den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor kodierenden Gen haben [40, 65], zeigen ein reduziertes Muster von Phosphorylierungen an Tyrosinresten nach Stimulation mit Thrombin oder ADP [52]. Das gleiche Phänomen wird sowohl bei menschlichen, als auch bei Thrombozyten von Ratten beobachtet, wenn diese zuvor mit Clopidogrel behandelt worden sind [12, 84]. Diese Untersuchungen zeigen aber nur die Änderungen im Phosphorylierungsmuster der Proteine oberhalb der Molmassen von 50 kDa. Mit Thrombozyten von Patienten mit Glanzmannscher Thrombasthenie [81] und ebenso mit Clopidogrel-vorbehandelten Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Tyrosinresten von p64 (Cortactin) und p100/105 von der Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes und von den Signalen, die durch die Fibrinogenbindung entstehen (outside-in-signaling), abhängig ist. Folglich müssen zwei verschiedene, die Phosphorylierung an Tyrosinresten beeinflussende Mechanismen nach P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoraktivierung unterschieden werden, und zwar auf der einen Seite die Wege der Signaltransduktion, die direkt nach Rezeptoraktivierung, und andererseits solche, die erst anschließend, nach Glykoprotein IIb/IIIa-Aktivierung, in Gang gesetzt werden.

Die Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten im Molmassenbereich oberhalb von 50 kDa sind zwar beschrieben worden, aber bis heute ist wenig bekannt über den Bereich unterhalb von 50 kDa.

In unseren Experimenten wurden jetzt erstmals die Effekte der P2Y-Rezeptoren auf die Phosphorylierung an Tyrosinresten des Molmassenbereiches unterhalb von 50 kDa in humanen Thrombozyten untersucht. Die Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, nicht aber die des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors, beeinflussen eindeutig die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27, p29, p31, p34, und p39 nach Thrombinstimulation. Insbesondere die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 scheinen direkt von den Signalen des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors abhängig zu sein, da hier nach



Hemmung des Rezeptors mit spezifischen, kompetitiven Antagonisten die Phosphorylierung an Tyrosinresten komplett gehemmt ist.

### **Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Signaltransduktion mittels Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten nach Aktivierung mit verschiedenen Agonisten der ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 auf humanen Thrombozyten zu untersuchen. Insbesondere die Ereignisse nach der Aktivierung mit Thrombin waren von Interesse.

Nach Aktivierung mit Thrombin, oder auch Kollagen und einigen anderen Thrombozyten-aktivierenden Substanzen, wird der primäre Stimulus durch Freisetzung verschiedener Mediatoren, unter anderem ADP, und schließlich autokriner Stimulation des Thrombozyten, durch sekundäre Signale verstärkt.

Es wurden die Phosphorylierungen an Tyrosinresten an einer Reihe von Proteinen untersucht, die sich nach diesen sekundären Signalen ereignen. Dabei war insbesondere die Rolle des P2Y12-ADP-Rezeptors im Vergleich mit dem P2Y1-ADP-Rezeptor von Interesse. Hierbei wurde der Fokus auf die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von Proteinen der relativen Molmasse von 27 und 31 kDa bezüglich der Signaltransduktion, die zu diesen Phosphorylierungen führt, gerichtet.

Die Untersuchungen wurden mit spezifischen Antikörpern und hauptsächlich mit der Methode des Immuno-(Western)-Blots durchgeführt. Ebenso wurden Aggregationsmessungen nach Inhibition mit spezifischen Rezeptor-Antagonisten und anschließender Stimulation mit verschiedenen Agonisten untersucht. Im Mittelpunkt standen auch bei diesen Experimenten stets die beiden ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12.

Außerdem wurde untersucht, ob sich die Signale der ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 durch Aktivierung anderer Rezeptoren, die an analoge G-Proteine koppeln, imitieren lassen.

Zuletzt wurde die Funktion einzelner in den Signaltransduktionsmechanismus involvierter Signalmoleküle charakterisiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Sigma, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
ECL (enhanced chemiluminescence system, Western-Blot-Detektionssystem)	Amersham Bioscience, UK
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fibrinogen	Sigma, München
D(+)-Glukose (Dextrose)	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Glycerin	Serva, Heidelberg
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt
Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo)-phenylazo]-2,7-naphtalen-disulfonsäure)	Sigma, München
SDS (Dodecylsulfate Natrium-Salz)	Serva, Heidelberg

o-Phospho-L-Serin	Sigma, München
TEMED (N, N, N', N' -tetramethylethylen-diamine)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma, München
o-Phospho-DL-Tyrosin	Sigma, München
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Agonisten

Substanz	Bezugsquelle
2-Methylthio-ADP (2-MeS-ADP)	Sigma, München
Epinephrine (Adrenalin)	Sigma, München
Forskolin	Sigma, München
Kollagen	Nycomed, Ismaning
Prostaglandin I <sub>2</sub>	Sigma, München
Serotonin	Sigma, München
Thrombin, bovines	Sigma, München
U46619 [9,11-dideoxy-11 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -epoxymethano-prostaglandine(F2 $\alpha$ )]	Sigma, München

### 2.1.3 Antagonisten und Inhibitoren

Substanz	Bezugsquelle
A <sub>3</sub> P <sub>5</sub> P (Adenosin 3' 5' -diphosphat)	Sigma, München
Acetylsalicylsäure (Aspirin)	Sigma, München
Apyrase, grade III, from potato	Sigma, München
AR-C69931MX (N6-methylthioethyl-2,-trifluoropropylthio- D- $\beta$ - $\gamma$ -dichloromethylene-ATP)	AstraZeneca, Wilmington, DE, USA
Hirudin	Loxo, Dossenheim
LY294002	Biomol, Hamburg
MRS2179 [N6-methyl, 2' -deoxyadenosine 3' , 5' -biphosphate]	Tocris, Bristol, UK
RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser)	Sigma, München
S1197 (3-{2-[4-(S)-(4-aminoiminomethyl-phenyl)-4-methyl-2,5-dioxo-imid-azolidin-1-yl]acetyl-amino}-3-(S)-phenylpropionic acidhydrochlorid)	Aventis Pharma, Frankfurt (Dr. M. Just)

SQ29548 [1S-[1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ (Z), 3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ ]]-7-[[2- [(phenylamino)carbonyl]hydrazinol]methyl]-7- oxabicyclo(2.2.1)hept-2-yl]-5-heptenoic acid	Biomol, Hamburg
SQ22536 (9-(tetrahydro-2'-furyl)adenite)	Calbiochem (Merck Biosciences) Schwalbach
Wortmannin	Sigma, München

## 2.1.4 Antikörper

Substanz	Bezugsquelle
Anti-Phosphotyrosin, monoklonaler Maus-Antikörper, Klon 4G10	Upstate Biotechnology, Biomol, Hamburg
Anti-ERK2 (D-2), monoklonaler Maus-Antikörper gegen unmodifiziertes ERK2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus-Antikörper, polyklonales Kaninchen IgG Peroxidase konjugiertes (HRP) IgG)	Dako, München

## 2.1.5 Geräte und Materialien

Gerät	Bezugsquelle
Aggregometer (Platelet aggregation profiler PAP 4)	Bio/Data Corp. Hatboro PA, USA
Blotkammer (Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer)	Biorad, München
Densitometer GS 800 und Quantity One® Software	Biorad, München
Glasküvetten, silikonisiert	Mölab, Langenfeld
Nitrozellulose (Protran)	Schleicher & Schuell
Röntgenfilme (Hyperfilm™)	Amersham, Bioscience
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Sorvall, Langensfeld
Zentrifuge	Hermle, Wehingen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung menschlicher Thrombozyten

Die Thrombozyten werden aus dem Blut gesunder, freiwilliger Spender isoliert, die mindestens zwei Wochen vor dem Blutspendetermin keine Medikamente eingenommen haben, die einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben. Hierzu zählen insbesondere Analgetika und nichtsteroidale Antiphlogistika sowie Acetylsalicylsäure (ASS), die irreversibel die Cyclooxygenase (COX) hemmt. Die gesamte Präparation wird bei Raumtemperatur nach der Methode von Greinacher durchgeführt [30]. Als Antikoagulanzen wird dem frisch abgenommenen Blut ACD-A-Lösung (2,2 % Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 0,8 % Citronensäure-Monohydrat, 2,5 %  $\alpha$ -D(+)-Glukose) im Verhältnis 1:6 (w/v) zugesetzt. Zur Trennung des plättchenreichen Plasmas (PRP) von den restlichen Blutbestandteilen wird das Vollblut in 13 ml Zentrifugenröhrchen (95 x 16,8 mm im Durchmesser, Sarstedt, Nümbrecht) transferiert und bei 120 x G für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere der beiden Phasen, das PRP, wird mit einer Pipette abgenommen. Dabei sind Verunreinigungen aus der unteren Phase, in der sich Erythrozyten, Granulozyten und Lymphozyten befinden, zu vermeiden. Zu je 1 ml PRP werden 111  $\mu$ l ACD-A und 2,5  $\mu$ l Apyrase hinzugefügt. Apyrase dient zur Hydrolyse des während der Präparation freigesetzten ADPs, so dass eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten verhindert wird. Anschließend wird das PRP für sieben Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Der Überstand, das plättchenarme Plasma, wird verworfen und jedes Sediment (von 10 ml Vollblut) mit je 1 ml Waschpuffer (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 5,5 mM Glukose, 1 U/ml Apyrase, 1 U/ml Hirudin, pH 6,4) resuspendiert, ein weiterer Milliliter Waschpuffer hinzugefügt, und die Suspension 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Der Waschpuffer für den zweiten Waschschrift ist frei von Hirudin, um in anschließenden Aggregationsexperimenten eventuelle Interaktionen durch Rückstände des Hirudins mit Thrombin zu verhindern. Der Inkubation im Wasserbad folgt eine weitere Zentrifugation für sieben Minuten bei 450 x G. Anschließend wird die Thrombozytenzahl pro Milliliter mit Suspensionspuffer (Die Zusammensetzung des Suspensionspuffers entspricht dem

Waschpuffer, jedoch ohne Apyrase und Hirudin und zusätzlich 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) auf die gewünschte Konzentration eingestellt (pH 7,4).

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl der isolierten Thrombozyten**

Nach der Präparation werden 10 µl der vorliegenden Thrombozytensuspension mit Suspensionspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Von dieser verdünnten Suspension werden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, mit einem Phasenkontrastmikroskop die Thrombozytenzahl in drei Gruppenquadraten gezählt, und die Zellzahl pro Milliliter (Mittelwert x 100 (Verdünnungsfaktor) x 250000) berechnet.

### **2.2.3 Aggregationsmessung**

Für die Aggregationsmessungen wird die Thrombozytensuspension auf  $3\text{--}5 \times 10^8$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Von dieser Suspension werden 198 µl entweder mit je 11 µl eines spezifischen Antagonisten oder mit Kontrollpuffer für fünf Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktionen werden in silikonisierten Glasküvetten mit je einem Magnetrührer durchgeführt. Die Eichung des Nullwertes wird mit Suspensionspuffer durchgeführt. Anschließend wird das Ausmaß der Aggregation nach Zugabe einer biologisch aktiven Substanz (11 µl) unter ständigem Rühren (900 rpm) im Aggregometer (Platelet aggregation profiler PAP 4) nach der Methode von Born (1962) gemessen. Dabei zeichnet ein angeschlossener Schreiber das Ausmaß der Aggregation in Prozent indirekt als Maß der Zunahme der Lichtdurchlässigkeit der Zellsuspension auf. Die Aufzeichnung wird gestoppt, wenn keine Veränderung der Aggregation mehr zu erkennen ist.

### **2.2.4 Aktivierung von Thrombozyten und Präparation der Proteine für die Immuno(Western)-Blot-Analytik**

Zu Stimulierungsexperimenten wird die Zellzahl auf  $5 \times 10^8$  Thrombozyten pro Milliliter eingestellt. Jeweils 180 µl Zellsuspension werden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und entweder mit 10 µl eines Inhibitors oder Kontrollpuffers für fünf Minuten vorinkubiert. Anschließend wird mit 10 µl einer biologisch aktiven Substanz für 30 Sekunden stimuliert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl SDS-Probenpuffer (10 % SDS, 1,43 M β-Mercaptoethanol,

20 % Glycerin, 20 % 0,625 M Tris-HCl pH 6,8 (v/v), 6 M Harnstoff, Bromphenolblau ad lib) gestoppt. Die gesamte Reaktion wird bei 37°C auf einem Thermomixer (Eppendorf) unter ständigem Rühren mit jeweils zwei Metallkugeln bei 700 rpm durchgeführt. Nach Zugabe des Puffers werden die Proben für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend bei -80°C zur anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immuno-(Western)-Blot-Analytik eingefroren.

### **2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird nach der Methode von Laemmli durchgeführt [49]. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt über Flachgele in vertikalen Gelelektrophoresekammern gefüllt mit Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v)) in 9 %igen bzw. 10 %igen Trenngelen. Die Zusammensetzungen der Gemische sind aus Tabelle 1 zu entnehmen. Vor dem Auftragen werden alle Proben für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Zur Bestimmung der relativen Molmassen der Proteine wird ein Gemisch aus folgenden Markerproteinen eingesetzt [96]: Myosin (205 kDa),  $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Katalase (60 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Laktalbumin (14 kDa).

Die SDS-PAGE wird in einer Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer von Biorad, München durchgeführt. Die Trennung wird gestoppt, sobald die Front aus Farbstoff aus dem Gel herausgelaufen ist. Im Anschluss werden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbelösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure (v/v), 0,05 % Coomassie-R250 (w/v)) gefärbt und das Gel mit 10 %iger Essigsäure entfärbt, oder das ungefärbte Gel zur weiteren Analytik (Western-Blot) verwendet.

**Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung der Gele in der PAGE**

Substanz	Trenngel*		Sammelgel*
	9%	10%	
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,375 ml	3,750 ml	835 µl
Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8	5,625 ml	5,625 ml	---
Tris-HCl 0,625M, pH 6,8	---	---	625 µl
20% (w/v) SDS	56,5 µl	56,5 µl	25 µl
TEMED	5,65 µl	5,65 µl	5 µl
Aqua bidest.	2,125 ml	1,75 ml	3,5 ml
APS	79 µl	79 µl	25 µl

\*Mengenangaben für jeweils zwei Gele

### 2.2.6 Immuno(Western)-Blot

Nach der SDS-PAGE kann das ungefärbte Gel im Western-Blot-Verfahren analysiert werden. Dafür werden acht Bögen Filterpapier und ein Stück Nitrozellulosemembran pro Gel auf Gelgröße zugeschnitten. Nachdem alle Filterpapierbögen und die Nitrozellulosemembran mit Blotpuffer (20 mM Tris, 300 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,015 % SDS (w/v)) befeuchtet worden sind, werden die einzelnen Lagen folgendermaßen in eine vertikale Blotkammer gepackt:

#### Anode

Schwamm  
vier Lagen Filterpapier  
SDS-Gel  
Nitrozellulosemembran  
vier Lagen Filterpapier  
Schwamm

#### Kathode



Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen werden.

Der Proteintransfer geschieht über ein von außen angelegtes elektrisches Feld für drei Stunden bei 4°C mit konstant 125 mA Stromstärke (I) pro Gel. Die Feldstärke E ändert sich dabei im Verlauf entsprechend der Spannung (U) nach der Formel  $E = U/s$ . Um das Ausmaß des Proteintransfers beurteilen zu können, wird das Gel nach dem Transfer mit Coomassie Färbelösung angefärbt. Die auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine werden mit Ponceau-Färbelösung (0,5 % Ponceau S (w/v), 5% Essigsäure (v/v)) sichtbar gemacht und die Markerproteine mit einem weichen Bleistift eingezeichnet. Anschließend wird die Membran mit TBS-T-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 0,1 % (w/v) Tween 20) entfärbt. Vor der Inkubation mit dem gewünschten Antikörper, werden zunächst alle freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit einer BSA-Lösung (5% (w/v) in TBS-T-Puffer) zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blocken wird die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur mit einigen Millilitern TBS-T gewaschen und anschließend mit dem geforderten Antikörper (wenn nicht anders angegeben: Anti-Phosphotyrosin-Maus-Antikörper (Klon 4G10; 0,5µg/ml in TBS-T, 5% (w/v) BSA in TBS-T-Puffer) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils fünf Minuten am nächsten Tag wird die Nitrozellulosemembran mit dem korrespondierenden zweiten Antikörper (bei Anti-Phosphotyrosin als ersten Antikörper: Anti-Maus-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiertes IgG) 1:2000 in TBS-T) eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Nitrozellulosemembran mit einem Gemisch aus jeweils 4 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 (Chemiluminollösung) für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper ist Peroxidase konjugiert, welche die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert. Die Lichtemissionen werden durch Auflegen von Röntgenfilmen und anschließendem Entwickeln der Filme in der Dunkelkammer sichtbar gemacht.

Die Intensität der Phosphorylierungen verschiedener Molekulargewichtsbereiche (der einzelnen Banden) wird mittels quantitativer Densitometrie (Linearität der Phosphorylierung bei einer

Dichte (Schwarzfärbung) von 0 bis 160 OD/mm<sup>2</sup>) mit einem GS 800 Densitometer (BioRad) und entsprechender Software (Quantity One®, BioRad) evaluiert.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Effekte primärer Thrombozytenaktivatoren auf die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten**

##### **3.1.1 Phosphorylierung an Tyrosinresten nach Stimulation mit Thrombin**

##### **Zeitabhängigkeit der Thrombin-induzierten Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten**

Die Aktivierung humaner Thrombozyten mit Thrombin ist ein unter physiologischen Bedingungen ablaufender Prozess. Dabei kommt es nach der primären Stimulation, durch Aktivierung des Thrombin-Rezeptors sekundär zur Freisetzung von ADP aus dichten Granula, wodurch die ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 aktiviert werden. Diese Aktivierung führt zu zahlreichen Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten und somit zur Signaltransduktion in das Innere der Zelle. Diese Phosphorylierungen an Tyrosinresten verlaufen in zeitlich unterschiedlichen Phasen [23].

Um die zu verschiedenen Zeiten phosphorylierten Proteine systematisch zu beschreiben, wurde eine zeitabhängige Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin von 15 Sekunden bis drei Minuten durchgeführt. Von besonderem Interesse waren hierbei die Proteine unterhalb von 50 kDa (Abbildung 5), da dieser Molmasenbereich bezüglich der Phosphorylierungen an Tyrosinresten bisher kaum untersucht worden ist.

In unstimulierten Thrombozyten sind die Proteine von 29 kDa (p29), 34 kDa (p34) und 39 kDa (p39) bereits an den Tyrosinresten phosphoryliert. Nach Thrombinstimulation nehmen diese Phosphorylierungen augenfällig zu. Wie in

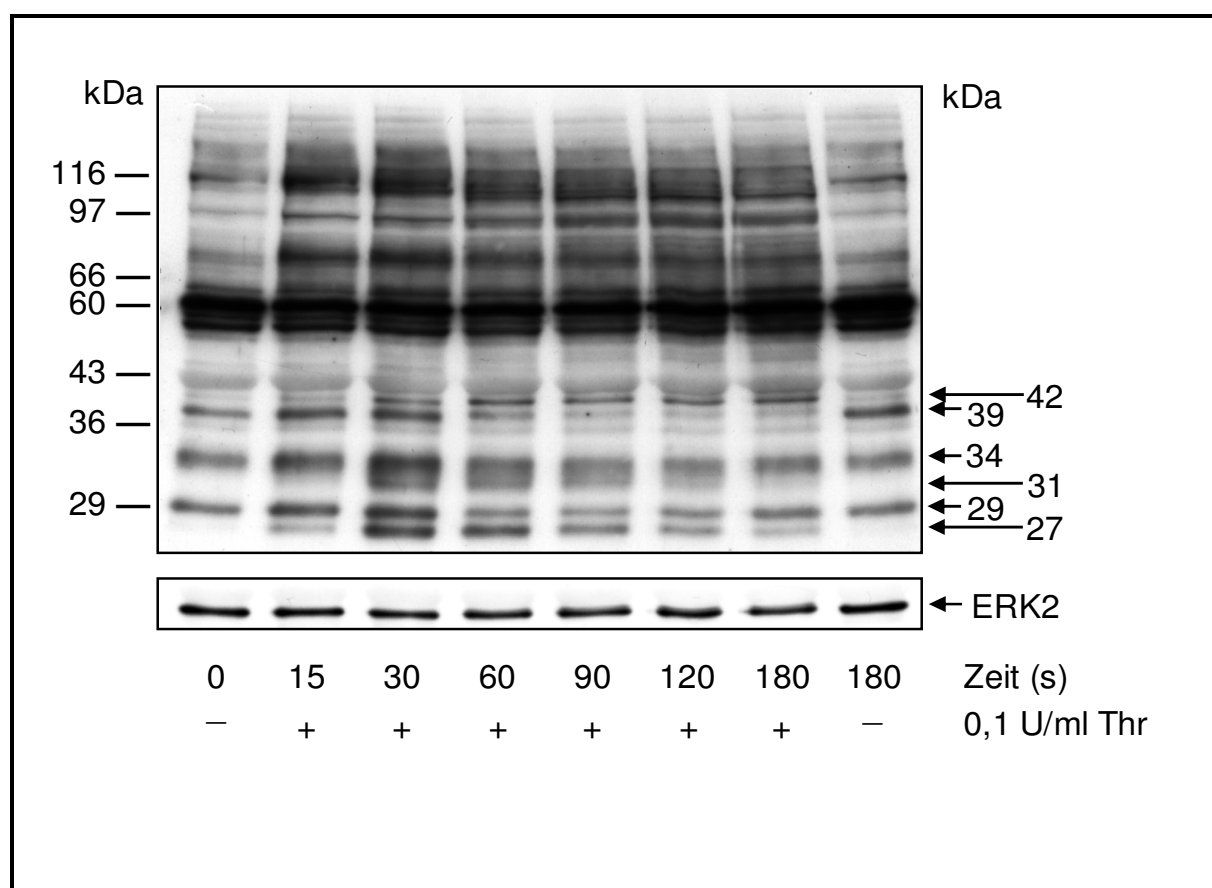
Abbildung 5 deutlich zu erkennen ist, treten nach Aktivierung mit 0,1 U/ml Thrombin zusätzlich Phosphorylierungen an Tyrosinresten bei 27 kDa (p27), 31 kDa (p31) und 42 kDa (p42) auf. Das Maximum dieser Phosphorylierungen ist nach 30 Sekunden Stimulationsdauer erreicht. Nachfolgend kommt es bei allen dieser Proteine im zeitlichen Verlauf bis 180 Sekunden zu einer Dephosphorylierung, außer bei der extrazellulär regulierten Kinase 2 (ERK2). Erst kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ERK2 (MAPK) bereits nach 30

sekundiger Thrombinstimulation an Tyrosin 185 phosphoryliert wird, und diese Phosphorylierung während der gesamten Plättchenaktivierung bestehen bleibt [21].

Zur Bestätigung, dass in allen Proben die identische Proteinmenge enthalten ist, wurde der Gesamtgehalt an unmodifiziertem ERK in den einzelnen Proben bestimmt (

Abbildung 5, unterer Teil).

Tabelle 2 zeigt die quantitative Analyse der Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der einzelnen Proteine an Tyrosinresten. Die Zunahme der Phosphorylierung nach Thrombinstimulation bis zu 30 Sekunden ist besonders deutlich bei p27 und p31, bei denen in ruhenden Thrombozyten noch keine Phosphorylierung detektierbar ist (Tabelle 2). Die Zunahme der Phosphorylierungen von p27, p29, p31, p34 und p39 bis 30 Sekunden ist signifikant, ebenso die Dephosphorylierungen im zeitlichen Verlauf bis 180 Sekunden.



**Abbildung 5: Zeitabhängigkeit der Thrombin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten**

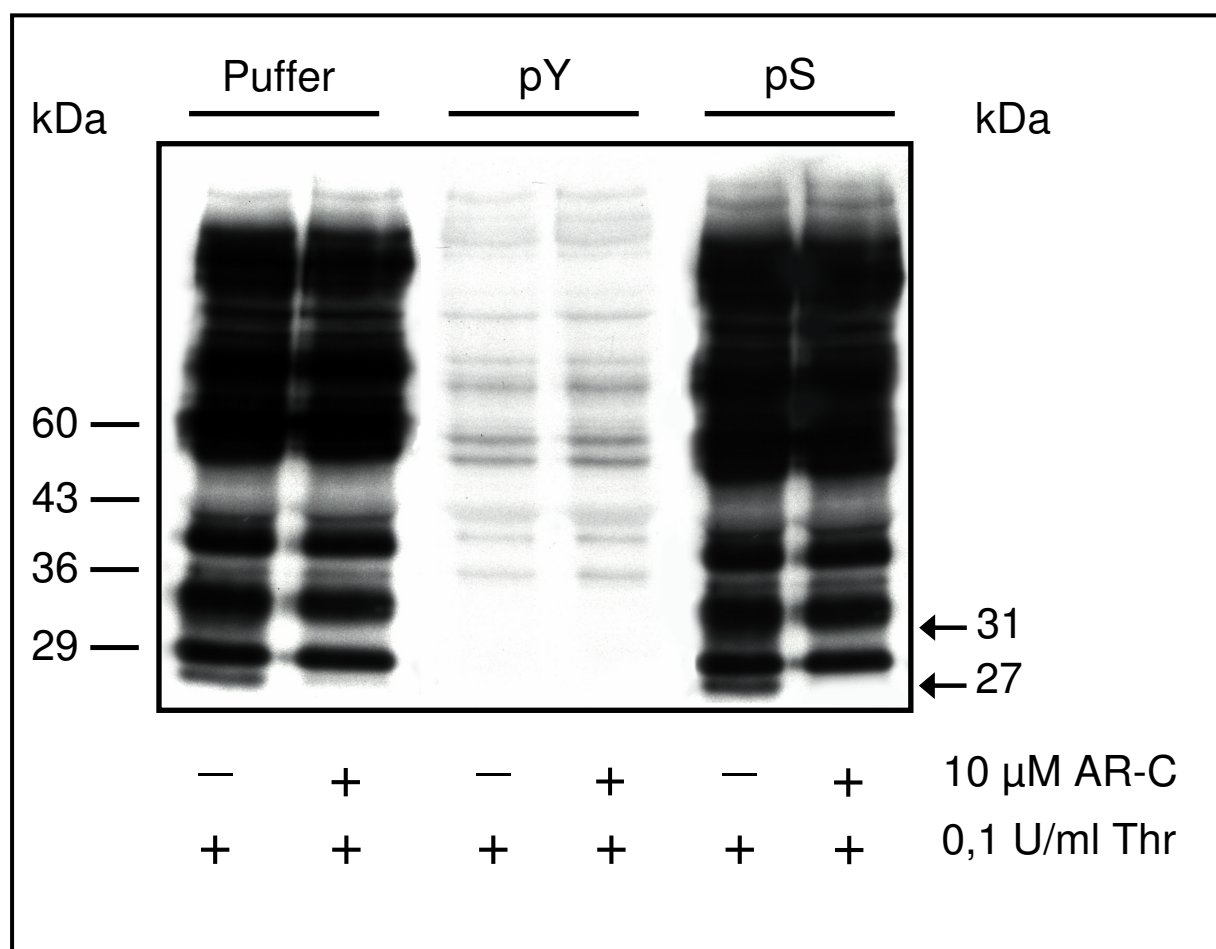
Gewaschene humane Thrombozyten (Kapitel Methoden: 2.2.1) wurden mit 0,1 U/ml Thrombin für die jeweils angegebenen Zeiten unter ständigem Rühren bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot, wie im Kapitel Methoden unter 2.2.5 - 2.2.6 beschrieben, analysiert. Zur Detektion der an Tyrosinresten phosphorylierten

Proteine wurde der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 eingesetzt. Zum quantitativen Vergleich der Proteinmengen wurde in jeder einzelnen Probe mit dem Anti-ERK2(D-2)-Antikörper die ERK2-Menge bestimmt (unterer Teil der Abbildung).

Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente. Der Index am linken Bildrand markiert Molmassen standardisierter Proteine in kDa. Am rechten Bildrand sind diejenigen Molmassen gekennzeichnet, bei denen sich die Menge der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine unterhalb von 50 kDa im zeitlichen Verlauf ändert.

### Spezifität des monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10

Um den Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 auf Spezifität im Bereich unter 50 kDa zu prüfen, wurde er mit seinem spezifischen Antigen, Tyrosinphosphat, vorinkubiert. Als Negativkontrolle diente Serinphosphat und Puffer. Im mittleren Teil der Abbildung 6 ist eindeutig zu erkennen, dass nach Vorinkubation mit Tyrosinphosphat nahezu alle Antigen-Bindungsstellen bereits abgesättigt sind, und der Antikörper kaum unspezifisch an Proteine bindet. Erst bei Überbelichtung sind Spuren von Phosphorylierungssignalen im Bereich unter 50 kDa zu erkennen, die als unspezifisch zu werten sind.



**Abbildung 6: Spezifität des monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10**

Die fünfminütige Vorinkubation mit 10 μM AR-C und die anschließende Stimulation gewaschener Thrombozyten (Kapitel Methoden: 2.2.1) mit 0,1 U/ml Thrombin für 30 Sekunden, die Analytik in der SDS-

PAGE und der anschließende Immuno-(Western)-Blot wurden wie im Kapitel Methoden unter 2.2.4 und 2.2.6, beschrieben.

Der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 wurde entweder mit 10 mM Tyrosinphosphat (pY), 10 mM Serinphosphat (pS) oder Kontrollpuffer (Puffer) jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, und erst anschließend zur Detektion der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran verwendet.

### Quantifizierung der Thrombin-induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p39, p34, p31, p29 und p27 im zeitlichen Verlauf.

**Tabelle 2: Densitometrische Auswertung des Westernblots der Thrombin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p39, p34, p31, p29 und p27 im zeitlichen Verlauf**

Zeit Protein	0s	15s	30s	60s	90s	120s	180s
p39	52 ± 8	90 ± 3	100,0	58 ± 2	48 ± 9	46 ± 10	53 ± 10
p34	44 ± 4	81 ± 4	100,0	59 ± 2	52 ± 5	52 ± 9	60 ± 8
p31	n.d.	29 ± 3	100,0	67 ± 4	49 ± 7	34 ± 7	33 ± 8
p29	47 ± 2	78 ± 3	100,0	45 ± 2	40 ± 5	47 ± 9	58 ± 5
p27	n.d.	24 ± 1	100,0	70 ± 3	48 ± 3	34 ± 4	26 ± 3

Die Phosphorylierungsmuster von drei Experimenten, wie in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt, wurden densitometrisch (Kapitel Methoden: 2.2.5) analysiert. Die Bande mit der größten Intensität wurde als 100% für das jeweilige Protein definiert. Die angegebenen Intensitäten sind jeweils Mittelwerte in Prozent (+/-SEM). Die Zunahme der Phosphorylierung nach Thrombinstimulation bis zu 30 Sekunden ist ebenso signifikant wie die folgende Dephosphorylierung im zeitlichen Verlauf (Bestimmung der p-Werte mit GraphPadPrism Software mit gepaartem t-Test,  $p \leq 0,05$ ).

n.d.: Phosphorylierung nicht detektierbar.

### Effekte verschiedener P2Y-Rezeptorantagonisten auf die mit Thrombin induzierten Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten

Das aus dichten Granula stimulierter Thrombozyten freigesetzte ADP, und die nachfolgende P2Y1- und P2Y12-Rezeptor-Aktivierung ist bei vielen physiologischen Agonisten, einschließlich Thrombin, ein wichtiges Signal zur Verstärkung der Wirkung des primären Stimulus. Nach Vorinkubation der Thrombozyten mit dem ADP-Scavenger Apyrase kommt es nach Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin zu einer abgeschwächten Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine bei 27 und 31 kDa (nicht gezeigte Daten).

Zur weiteren Klärung welche Signale der ADP-Rezeptoren bei Stimulation mit Thrombin an der Phosphorylierung von Tyrosinresten beteiligt sind, wurden die Thrombozyten vor der Aktivierung mit spezifischen, kompetitiven Antagonisten der P2Y-Rezeptoren inkubiert.

In Abbildung 7A ist deutlich zu erkennen, dass durch Vorinkubation mit 10  $\mu$ M AR-C66931MX, einem spezifischen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten, die mit 0,1 U/ml Thrombin induzierten Phosphorylierungen insgesamt inhibiert werden, bei p27 und p31 kommt es jedoch zur vollständigen Hemmung der Phosphorylierung. Die spezifischen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 (100 $\mu$ M) und A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P (500 $\mu$ M) haben keinen Einfluss (Abbildung 7B).

Ebenso zeigte sich, dass durch 10  $\mu$ M AR-C66931MX die in Abbildung 5 dargestellten Dephosphorylierungen von p29, p34 und p39 im zeitlichen Verlauf verhindert werden. Hier ist exemplarisch der Vergleich der Phosphorylierungen nach 30 und 90 Sekunden zu sehen (Abbildung 7C).

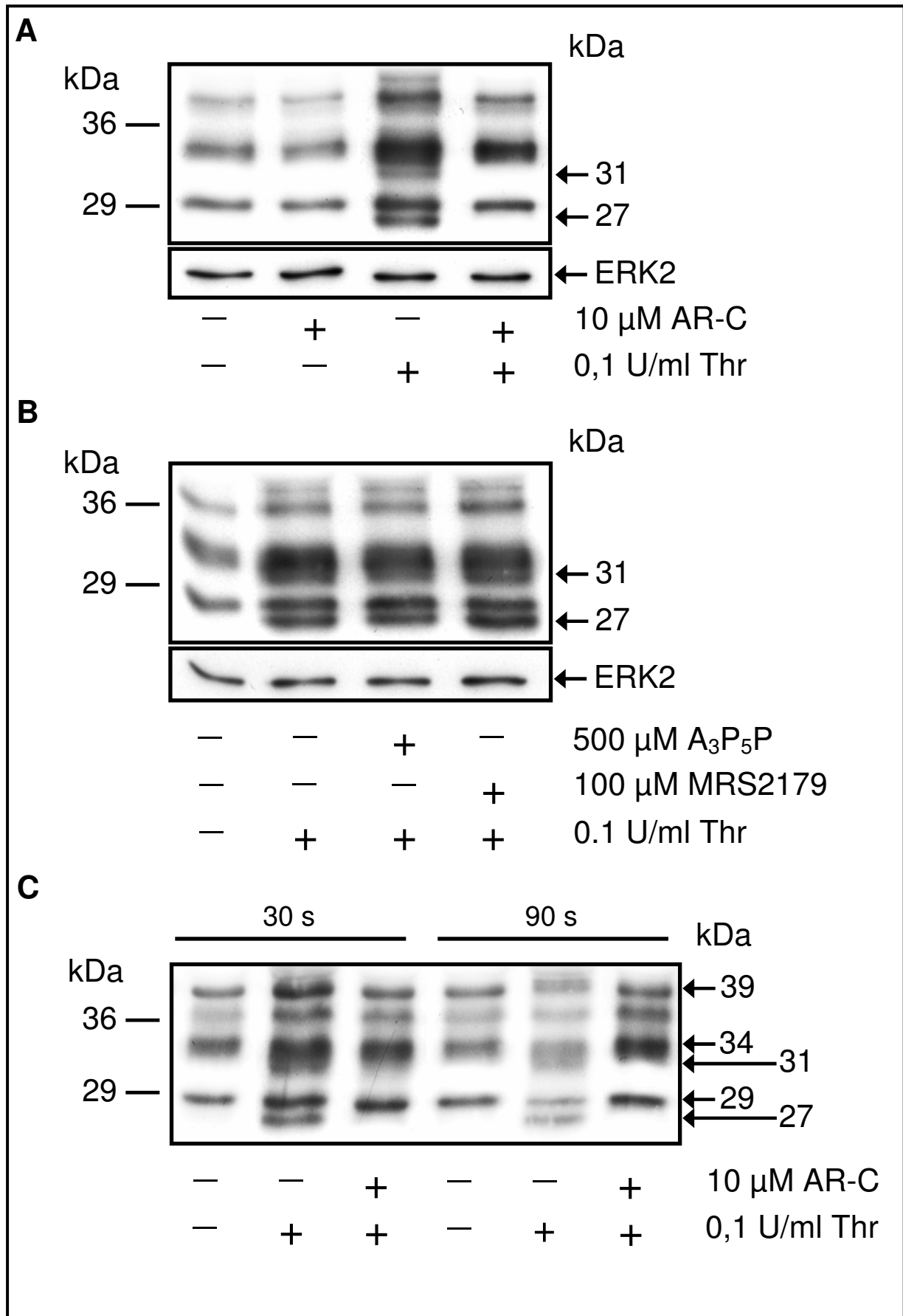


Abbildung 7: Abhängigkeit der mit Thrombin induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten durch freigesetztes ADP und nachfolgender ADP-Rezeptor-Aktivierung



Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden mit den jeweils angegebenen Antagonisten oder Kontrollpuffer für fünf Minuten unter ständigem Rühren bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit Thrombin oder Puffer für 30 oder 90 Sekunden stimuliert. Die Proben wurden, wie in „Methoden“ 2.2.5-2.2.6 beschrieben, mit SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. In allen drei Blots wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 oder Anti-ERK2(D-2)-Antikörper (jeweils unterer Kasten in A und B) als erster Antikörper benutzt. Am linken Bildrand sind die standardisierten Molmassen markiert. Am rechten Bildrand sind die apparenten Molmassen der Proteine unterhalb von 50 kDa gekennzeichnet, bei denen sich die Phosphorylierungen im zeitlichen Verlauf ändern.

Alle dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils mindestens drei gleiche, unabhängige Experimente.

**A:** Effekte des spezifischen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten AR-C69931MX (10 µM) auf die mit Thrombin (30 s) induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten.

**B:** Effekte der spezifischen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P (500 µM) und MRS2179 (100 µM) auf die mit Thrombin (30 s) induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten.

**C:** Effekte der Vorinkubation mit AR-C69931MX (10 µM) auf die Phosphorylierung an Tyrosinresten bei Stimulation mit Thrombin für 30 und 90 Sekunden.

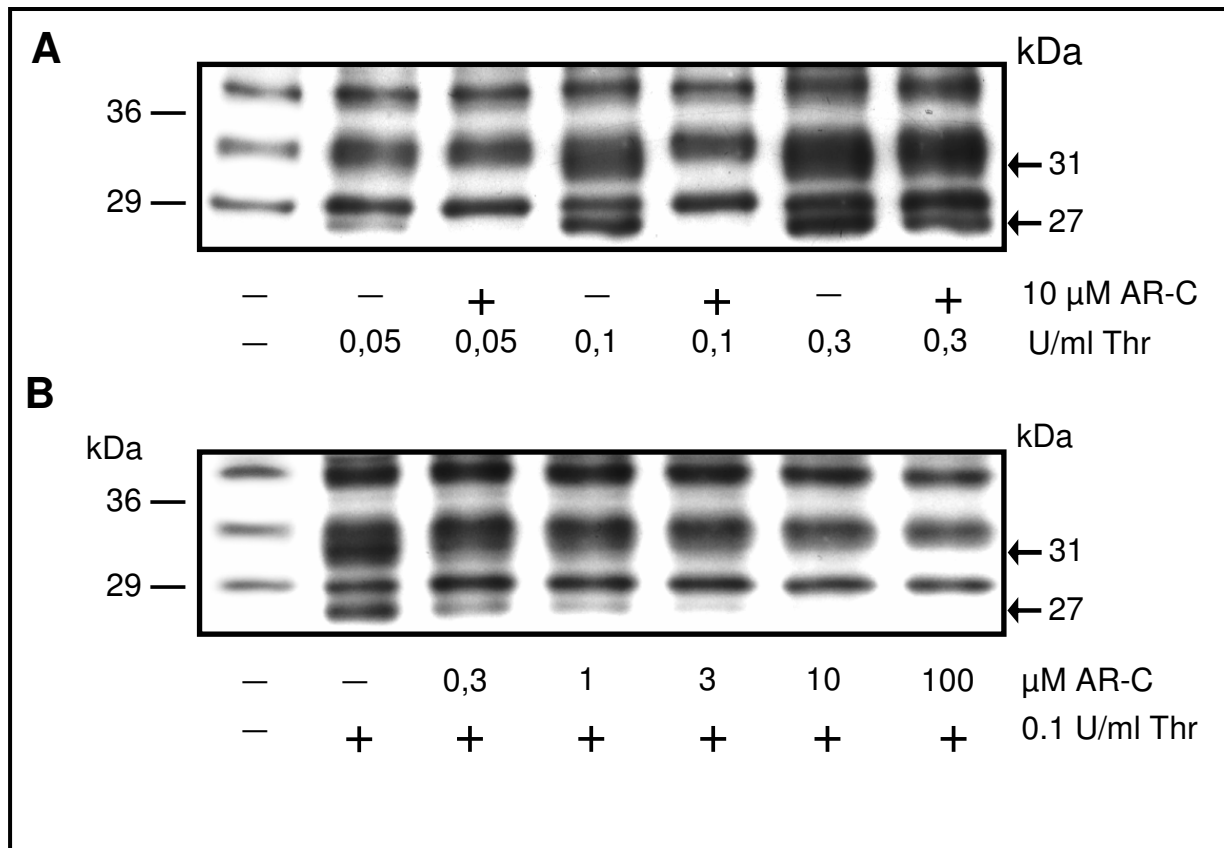
### **Einfluss verschiedener Thrombinkonzentrationen**

Die mit Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten sind von der Konzentration des eingesetzten Thrombins abhängig (Abbildung 8A). Bei Aktivierung der Thrombozyten mit 0,05 U/ml Thrombin sind im Molmassenbereich von 27 und 31 kDa nur schwache Phosphorylierungen zu erkennen, die mit steigender Thrombinkonzentration (0,1 und 0,3 U/ml) an Intensität zunehmen.

Durch Vorinkubation mit 10 µM AR-C66931MX werden die mit 0,05 und 0,1 U/ml Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa komplett inhibiert.

Bei Aktivierung mit 0,3 U/ml Thrombin jedoch zeigt sich nach Vorinkubation mit 10 µM AR-C66931MX nur eine minimale Hemmung dieser Phosphorylierungen. Selbst bei Konzentrationserhöhungen des AR-Cs auf bis zu 100 µM können die mit 0,3 U/ml Thrombin hervorgerufenen Phosphorylierungen bei 27 und 31 kDa nicht vollständig gehemmt werden (nicht gezeigte Daten).

In Abbildung 8B ist die konzentrationsabhängige Hemmung der mit 0,1 U/ml Thrombin nach 30 Sekunden Stimulationszeit induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa durch AR-C69931MX gezeigt. Schon nach Vorinkubation mit 0,3 µM AR-C66931MX kommt es zu einer leichten Hemmung dieser Phosphorylierungen bei Aktivierung mit Thrombin. Bei Vorinkubation mit 10 µM AR-C69931MX oder höheren Konzentrationen sind die mit 0,1 U/ml Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinsresten der Proteine von 27 und 31 kDa komplett gehemmt.



**Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der AR-C66931MX-sensitiven Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 nach Stimulation mit Thrombin**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden für jeweils fünf Minuten mit AR-C69931MX oder Probenpuffer unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend 30 Sekunden mit Thrombin oder Puffer, wie in „Methoden“ 2.2.4 beschrieben, aktiviert. Die Analytik der Proben wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot („Methoden“ 2.2.5-2.2.6) durchgeführt.

An den Bildrändern finden sich links die apparenten Molmassen der Proteinmarker, und rechts sind Positionen von p31 und p27 angegeben.

A: Effekte verschiedener Thrombin-Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,3 U/ml) auf die AR-C (10  $\mu$ M) sensitive Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31.

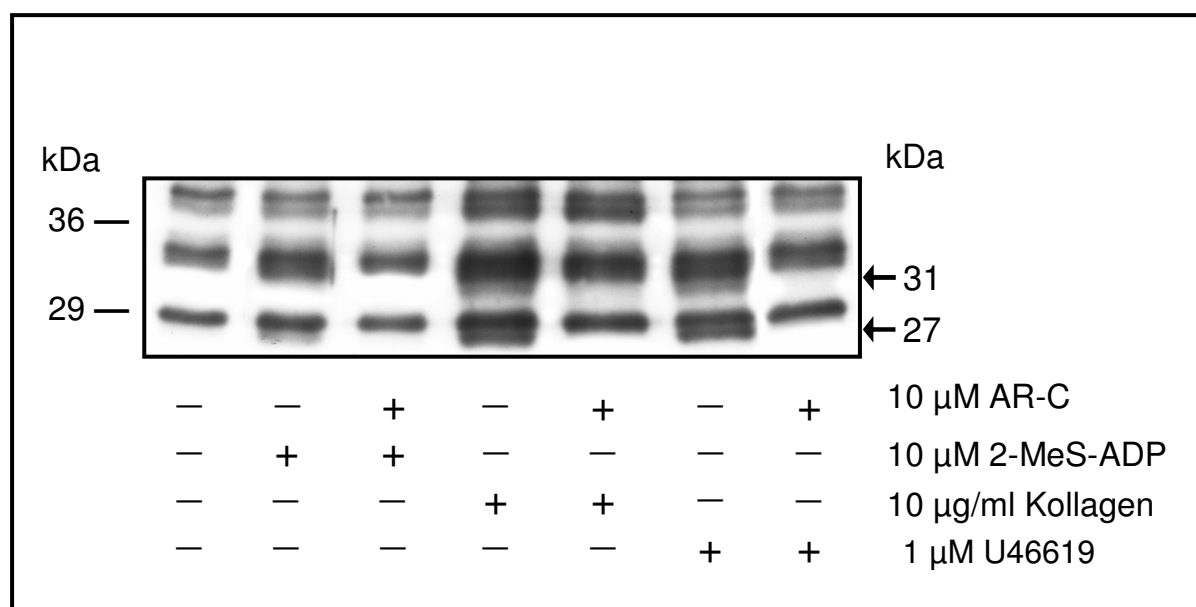
B: Konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 durch AR-C69931MX bei Stimulation mit 0,1U/ml Thrombin.

### 3.2 Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 durch weitere Agonisten und deren Abhängigkeit von sekundären Signalen

#### 3.2.1 Induktion der Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 durch 2-MeS-ADP, Kollagen und U46619

Die Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen oder U46619, einem Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist, führen, genau wie die Aktivierung mit Thrombin, zur Freisetzung von ADP aus den dichten Granula und somit zur Aktivierung der P<sub>2</sub>Y-Rezeptoren. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass durch Aktivierung mit Kollagen und U46619 ebenfalls die Tyrosinreste der Proteine p27 und p31 phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen sind gleichwohl AR-C-sensitiv.

2-MeS-ADP, ein ADP-Analogon mit höherer Affinität zu den ADP-Rezeptoren als ADP selbst, induziert lediglich schwache, AR-C69931MX-sensitive, Phosphorylierungen an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa.



**Abbildung 9:** ADP abhängige Phosphorylierung der Tyrosinreste von p27 und p31 durch Kollagen, U46619 und 2-MeS-ADP

Gewaschenen Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden entweder mit 10 μM AR-C69931MX oder Probenpuffer für fünf Minuten unter ständigem Rühren bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit 10 μM 2-MeS-ADP, 10 μg/mg Kollagen oder 1 μM U46619 für 30 Sekunden stimuliert (s. „Methoden“ 2.2.4). Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Immuno(Western)-Blot mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 („Methoden“ 2.2.5-2.2.6).

### **3.2.2 Abhängigkeit der Kollagen-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 vom Signalweg des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors**

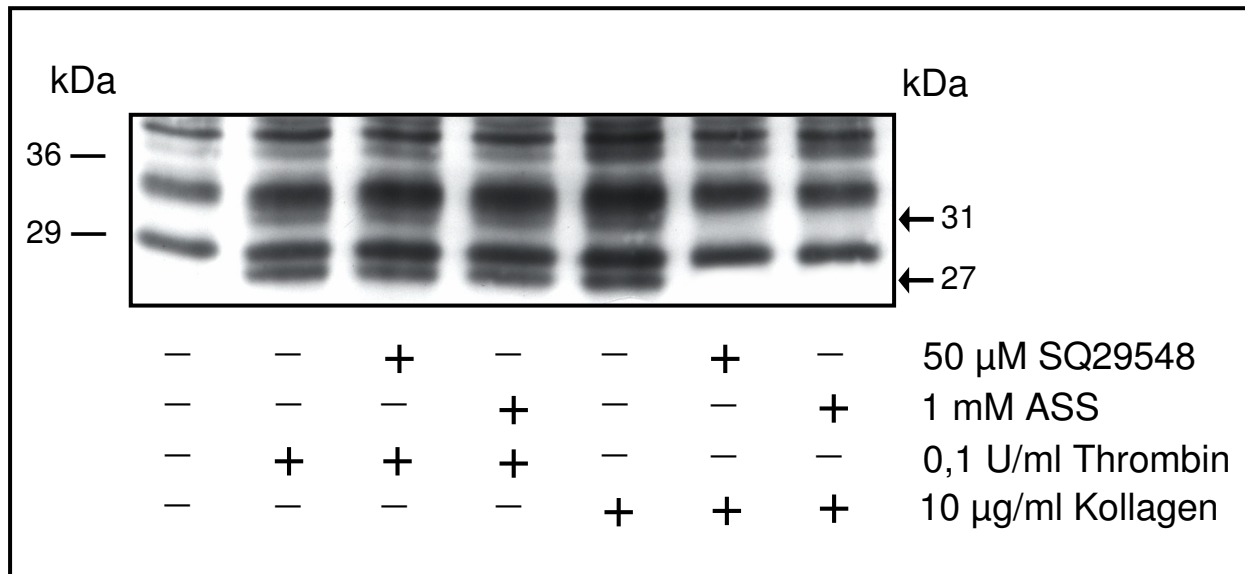
Kollagen ist ebenso wie Thrombin ein wichtiger physiologischer Plättchenaktivator. Neben dem von Willebrand Faktor ist es maßgeblich an der Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand nach Schädigung des Endothels beteiligt. In Abbildung 9 wurde bereits gezeigt, dass Kollagen eine AR-C-sensitive Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 induziert. Es wurden bereits eine Reihe Kollagen-induzierter Ereignisse, die von der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptoraktivierung abhängig sind, gefunden. Deswegen ist als nächstes untersucht worden, inwieweit der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor (TP) in die oben genannten Phosphorylierungen involviert ist.

Um die Rezeptoraktivierung zu verhindern, wurden die Thrombozyten vor der Stimulation mit Kollagen entweder mit Acetylsalicylsäure (ASS) oder mit SQ29548 vorinkubiert. ASS verhindert durch irreversible Hemmung der Cyclooxygenase die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> aus Arachidonsäure. SQ29548 ist ein spezifischer, kompetitiver Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist.

In Abbildung 10 ist eindeutig erkennbar, dass durch Vorinkubation mit diesen beiden Substanzen und anschließender Kollagenaktivierung die Phosphorylierung der Tyrosinreste von p27 und p31 gehemmt wurden.

Mit Thrombin zeigte sich kein hemmender Effekt auf diese Phosphorylierungen bei gleicher Vorinkubation (Abbildung 10).

Auch nach Vorinkubation mit SQ29548 in höheren Konzentrationen (bis zu 100 µM) zeigte sich keine Hemmung der Phosphorylierungen von p27 und p31 nach Aktivierung mit Thrombin (nicht gezeigte Daten).



**Abbildung 10: Abhängigkeit der mit Kollagen induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 von der Aktivierung des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) werden unter Rühren bei 37°C entweder mit 50  $\mu$ M SQ29548 oder Probenpuffer für fünf Minuten oder für 30 Minuten mit 1  $\mu$ M Acetylsalicylsäure vorinkubiert und anschließend mit 10  $\mu$ g/ml Kollagen, 0,1U/ml Thrombin oder Probenpuffer für 30 Sekunden aktiviert („Methoden“ 2.2.4). Die Analyse der Proben (SDS-PAGE, Western-Blot mit Antiphosphotyrosin-Antikörper 4G10) wurde wie in „Methoden“ 2.2.5-2.2.6 beschrieben durchgeführt.

An den Bildrändern finden sich links die Molmassen der Proteinmarker, und rechts sind Positionen von p31 und p27 angegeben.

### 3.3 Beeinflussung der Thrombin- und Kollagen-induzierten Aggregation durch die Signale der ADP-Rezeptoren

#### 3.3.1 Effekte der ADP-Rezeptor-Antagonisten auf die mit Thrombin induzierte Aggregation humaner Thrombozyten

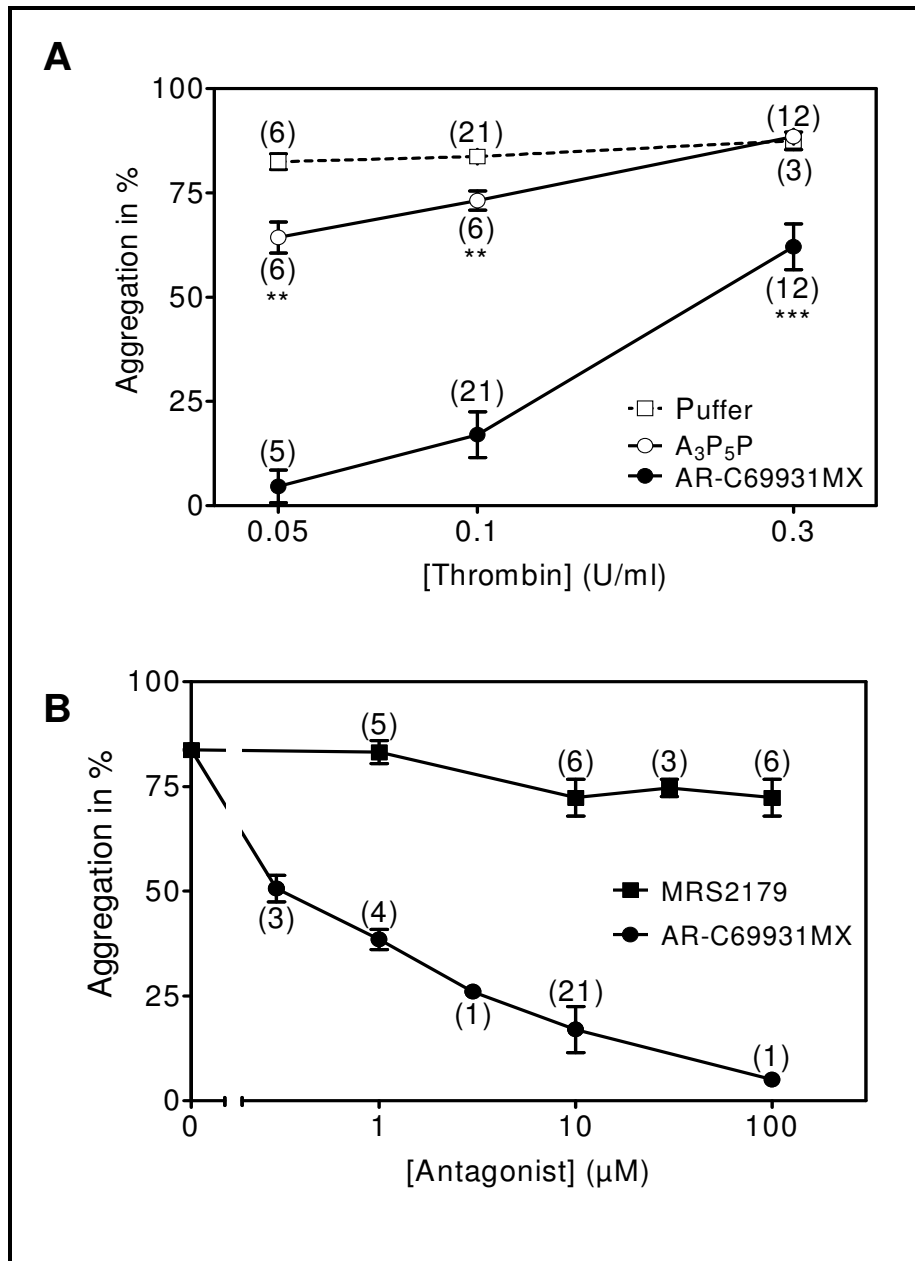
Nachdem für die mit Thrombin induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 die Abhängigkeit von der Aktivierung des P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptors gezeigt werden konnte, wurde als Nächstes untersucht, ob die Signale der ADP-Rezeptoren P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> und P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> an der mit Thrombin induzierten Aggregation gewaschener humaner Thrombozyten beteiligt sind.

Durch Vorinkubation mit A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P, einem spezifischen P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, lässt sich die mit Thrombin induzierte Aggregation bei Konzentrationen von 0,05 und 0,1 U/ml signifikant um 22 %, bzw. 13 % hemmen. Keine signifikante Hemmung durch A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P war nach Stimulation mit 0,3 U/ml Thrombin zu beobachten.

Dagegen haben die Signale des P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptors größeren Einfluss auf die Aggregation. AR-C66931MX (10  $\mu$ M) hemmt die mit 0,05 U/ml Thrombin induzierte Aggregation um 94 %

und mit 0,1 U/ml um 80 %. Auch bei Stimulation mit 0,3 U/ml hemmt AR-C69931MX die Aggregation um 30 %. (Abbildung 11A).

In Abbildung 11B ist die konzentrationsabhängige Hemmung durch die ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P der mit 0,1 U/ml Thrombin hervorgerufenen Aggregation gezeigt. Diese Aggregation mit 0,1 U/ml Thrombin ist mit AR-C66931MX konzentrationsabhängig hemmbar (IC<sub>50</sub> 0,8 µM). Im Vergleich dazu ist die Hemmung der mit 0,1U/ml Thrombin induzierten Aggregation durch MRS2179, einem spezifischen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist, nur gering ausgeprägt (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Effekte der ADP-Rezeptor-Antagonisten auf die mit Thrombin induzierte Aggregation gewaschener humaner Thrombozyten**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden mit den in der Abbildung angegebenen Antagonisten unter Rühren bei 37°C für 5 Minuten vorinkubiert und dann für je 30 Sekunden mit 0,05, 0,1 oder 0,3 U/ml Thrombin stimuliert. Das Ausmaß der Aggregationen wurde wie in „Methoden“ 2.2.3 beschrieben im Aggregometer gemessen. Die Daten sind Mittelwerte in % ( $\pm$ SEM) der Lichttransmission, die mit dem ansteigenden Ausmaß der Aggregation zunimmt im Vergleich zu Suspensionspuffer.

Die Anzahl der Experimente ist in Klammern in den Abbildungen neben den Messpunkten angegeben.

A: Hemmung der Thrombin-induzierten Plättchenaggregation mit P2Y-Rezeptor-Antagonisten. Die Thrombozyten wurden mit 500  $\mu$ M A<sub>3</sub>P<sub>5</sub>P, 10  $\mu$ M AR-C69931MX oder Probenpuffer vorinkubiert und dann mit Thrombin in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Analyse der Daten erfolgte mit GraphPadPrism software (ungepaarter t-Test; \*\* $p \leq 0,004$ ; \*\*\* $p \leq 0,0003$ ) bezogen auf die jeweilig gemessene Aggregation ohne Inhibitor.

B: Konzentrationsabhängige Hemmung der mit Thrombin induzierten Plättchenaggregation mit P2Y-Rezeptor-Antagonisten. Die Plättchen wurden wie oben beschrieben mit MRS2179 und AR-C69931MX in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend mit 0,1U/ml Thrombin stimuliert.

### **3.3.2 Abhängigkeit der mit Thrombin und Kollagen induzierten**

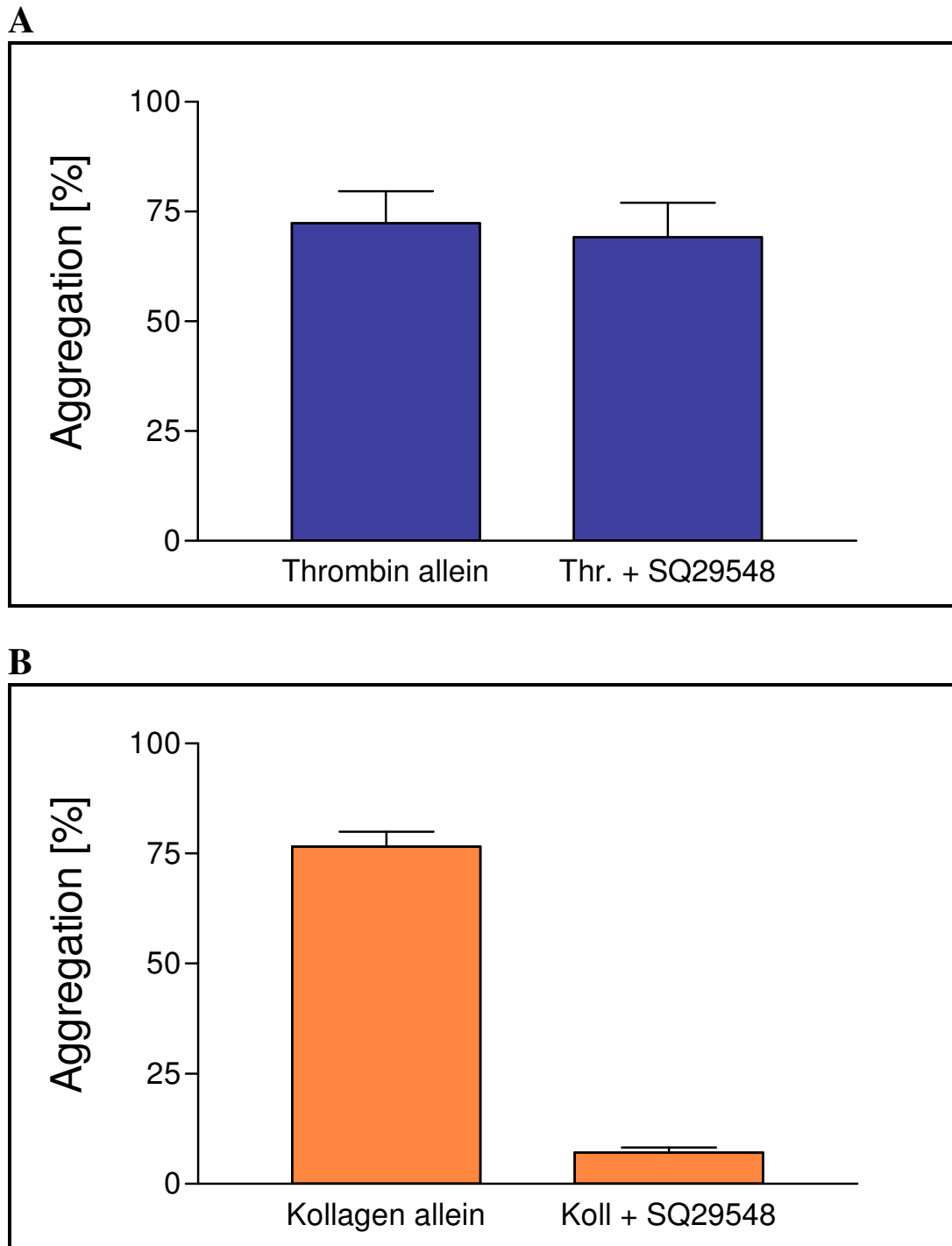
#### **Aggregation vom Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Signalweg**

Der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor ist, wie oben gezeigt wurde, in die mit Kollagen induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 involviert, nicht jedoch in die Phosphorylierung dieser Proteine durch Thrombin. In Abbildung 12 ist die Beteiligung des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors an der mit Kollagen und Thrombin induzierten Aggregation gezeigt.

Nach Vorinkubation mit SQ29548, einem spezifischen Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten, ist bei anschließender Stimulation mit Thrombin keine Hemmung zu erkennen (Abbildung 12A). Bei gleicher Vorinkubation und folgender Stimulation mit Kollagen jedoch ist die Hemmung der Aggregation um 89 % signifikant hemmbar (Abbildung 12B).

Der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor hemmt somit eindeutig die mit Kollagen induzierte Aggregation, jedoch nicht die mit Thrombin induzierte Aggregation.





**Abbildung 12: Abhängigkeit der mit Thrombin und Kollagen induzierten Aggregation vom Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Signalweg**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden entweder mit Probenpuffer oder 10  $\mu$ M SQ29548 für fünf Minuten bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend mit 0,1 U/ml Thrombin oder mit 10  $\mu$ g/ml Kollagen aktiviert. Das Ausmaß der Aggregation wurde im Aggregometer, wie in „Methoden“ 2.2.3 beschrieben, gemessen.

Die Daten sind Mittelwerte in % ( $\pm$ SEM) der Lichttransmission, die mit dem ansteigenden Ausmaß der Aggregation zunimmt im Vergleich zu Suspensionspuffer, gemessen im Maximum der Aggregation.

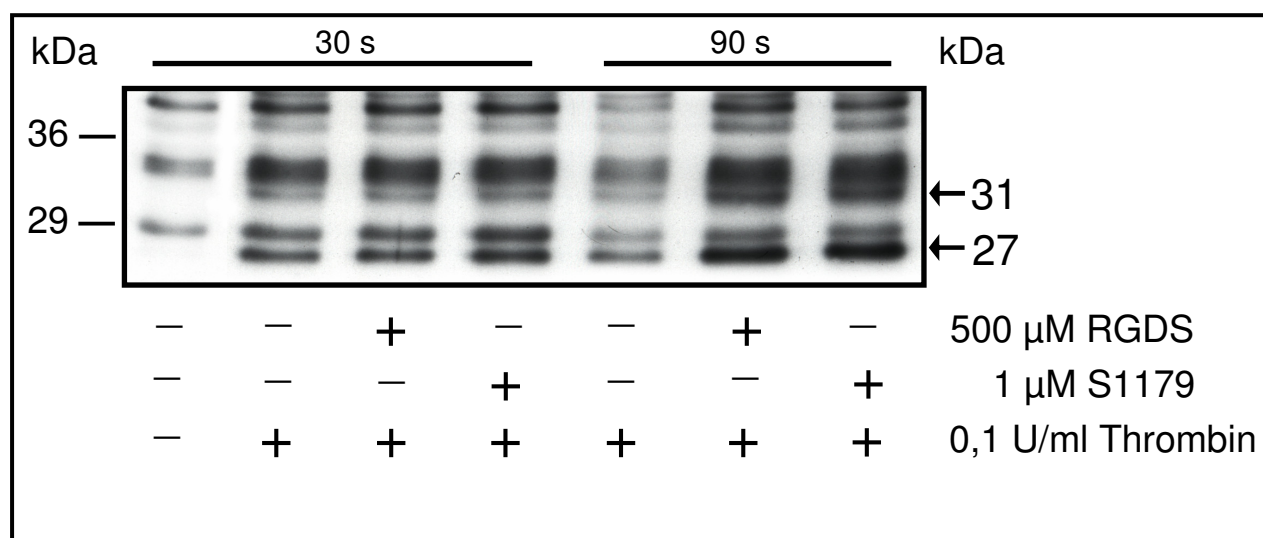
### 3.4 Abhängigkeit der Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 31 und 27 kDa vom Glykoprotein IIbIIIa-Komplex

Die Aktivierung des membranständigen Glykoprotein IIbIIIa Komplexes (GPIIbIIIa) ist essentiell für die Thrombozytenaggregation. Der zur Superfamilie der Integrine gehörende Proteinkomplex dient als Rezeptor für Fibrinogen, vWF, Fibronectin und andere Adhäsionsproteine. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten findet am GPIIbIIIa-Komplex eine Konformationsänderung statt, so dass die Ligandenbindungsstellen frei liegen und die Fibrinmonomere binden können.

Um den Stellenwert der Fibrinogenbindung und damit der Aggregation bezüglich der Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 zu untersuchen, wurden die Thrombozyten entweder mit RGDS, einem Tetrapeptid, das die Fibrinbindungsstelle besetzt, oder mit S1197, einem nicht peptidischen RGD-Mimetikum, vorinkubiert.

In Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass trotz der Blockade der Fibrinbindungsstellen nach Thrombinstimulation die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 unbeeinflusst sind. Die Signalübertragung über den GPIIbIIIa-Komplex ins Zellinnere („outside-in-signaling“) ist folglich nicht an den Signalübertragungsereignissen, die zu diesen Phosphorylierungen führen, beteiligt.

Die in Abbildung 5 und Abbildung 7 gezeigten Dephosphorylierungen von p29, p34 und p39 nach 90 Sekunden Stimulationszeit werden jedoch durch RGDS und S1197 gehemmt.



**Abbildung 13: Abhängigkeit der Phosphorylierung von p31 und p27 von der Signalübertragung nach Fibrinogenbindung an den Glykoproteinen IIb-IIIa-Komplex**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden für fünf Minuten mit 500  $\mu$ M RGDS, 1  $\mu$ M S1197 oder Probenpuffer bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend für 30 oder 90 Sekunden mit 0,1U/ml Thrombin stimuliert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10, wie im Kapitel „Methoden“ 2.2.5-2.2.6 beschrieben.

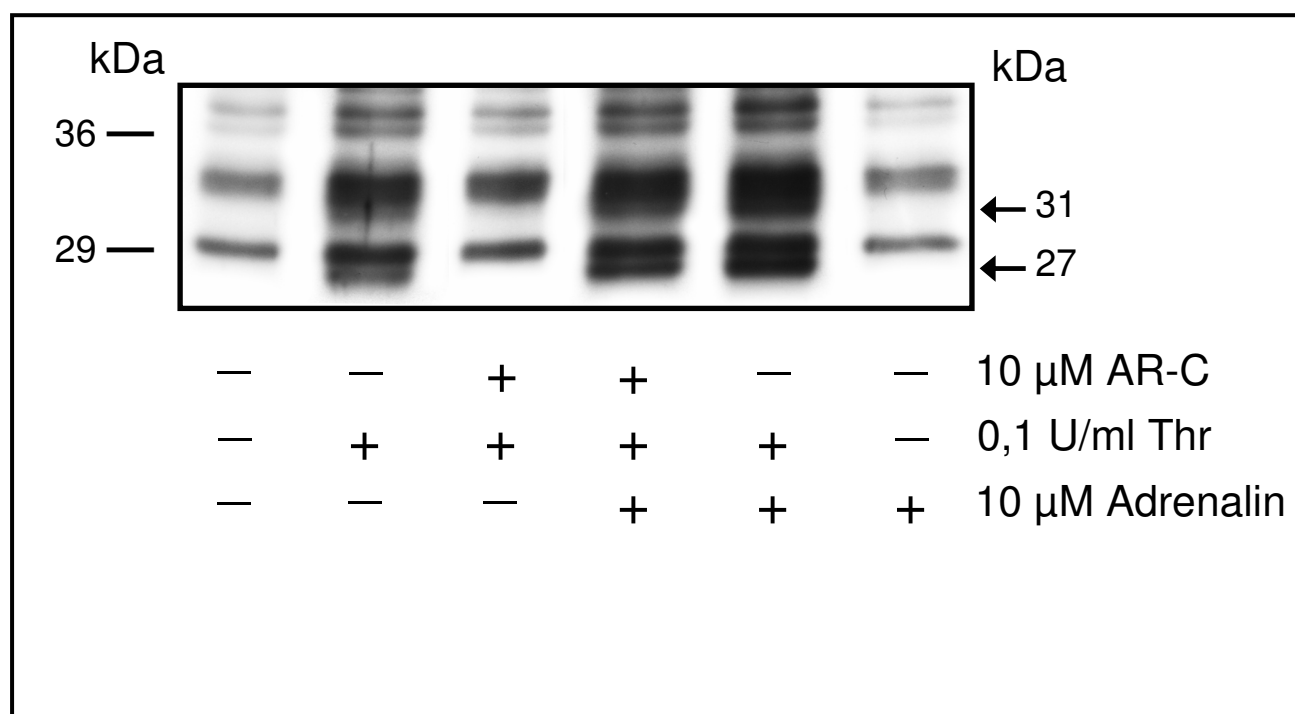
Angabe der Molmassen in kDa (links Markerproteine, rechts Positionen von p27 und p31).

### 3.5 Signale der G-Proteine

#### 3.5.1 Verstärkung der Thrombin-induzierten Phosphorylierung von p27 und p31 an Tyrosinresten durch Adrenalin

Die Aktivierung der Thrombozyten mit Adrenalin allein induziert, wie oben erwähnt, keine Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa. Auch eine Aggregation isolierter Thrombozyten wird mit alleiniger Stimulation mit Adrenalin nicht erreicht (nicht gezeigte Daten). Jedoch können die mit 0,1 U/ml Thrombin induzierten Phosphorylierungen der Proteine von 27 und 31 kDa durch zusätzliche Aktivierung mit Adrenalin verstärkt werden (Abbildung 14).

Die Vorinkubation der Thrombozyten mit AR-C69931MX verhindert die Signale über das inhibitorische Gi-Protein des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors. Dieser Effekt kann durch zusätzliches Adrenalin umgangen werden, da trotz Vorinkubation mit AR-C66931MX und anschließender Stimulation mit Thrombin in Gegenwart von Adrenalin die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 wieder nachweisbar sind (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Verstärkung der mit Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 durch Adrenalin**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden für fünf Minuten mit AR-C69931MX oder Probenpuffer bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend mit 0,1 U/ml Thrombin oder/und 10  $\mu$ M Adrenalin für 30 Sekunden stimuliert. Die Analyse der Proben erfolgte wie oben beschrieben mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 („Methoden“ 2.2.5-2.2.6).

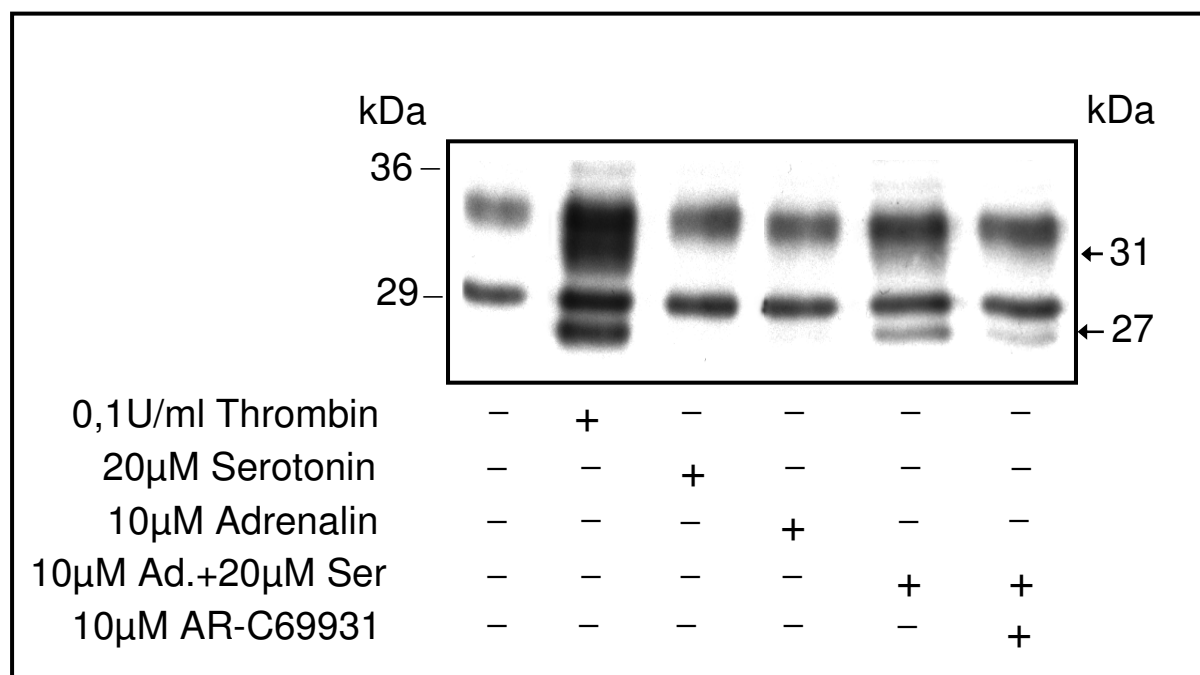
### 3.5.2 Imitierung der Phosphorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten durch die G-Proteine Gi und Gq mit Adrenalin und Serotonin

Die Rezeptoren für Adrenalin und Serotonin sind, ebenso wie P2Y1 und P2Y12, G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Der Adrenalinrezeptor ist an das inhibitorische Gi $\alpha$ 2 und der Serotoninrezeptor an das stimulatorische Gq gekoppelt.

Es wird untersucht, ob die Signale zur Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa durch Aktivierung dieser analog gekoppelten Rezeptoren imitiert werden können (Abbildung 15).

Durch Aktivierung der Thrombozyten mit Adrenalin oder Serotonin allein ist kein Phosphorylierungssignal bei 27 und 31 kDa zu erkennen. Die gleichzeitige Aktivierung von Gq und Gi $\alpha$ 2 mit diesen beiden Agonisten lässt eine schwache Phosphorylierung an Tyrosinresten

von p27 und p31 erkennen, die durch Vorinkubation mit AR-C69931MX partiell inhibierbar ist (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Phosphorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten durch Stimulation der G-Proteine Gi und Gq durch Adrenalin und Serotonin**

Gewaschene Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden für fünf Minuten mit Probenpuffer oder 10 µM AR-C69931MX bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und danach für 30 Sekunden mit 0,1 U/ml Thrombin, 10 µM Adrenalin, 20 µM Serotonin oder mit einem Gemisch aus 10 µM Adrenalin und 20 µM Serotonin aktiviert. Die Analyse der Proben erfolgte wie in „Methoden“ 2.2.5-2.2.6 beschrieben mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10.

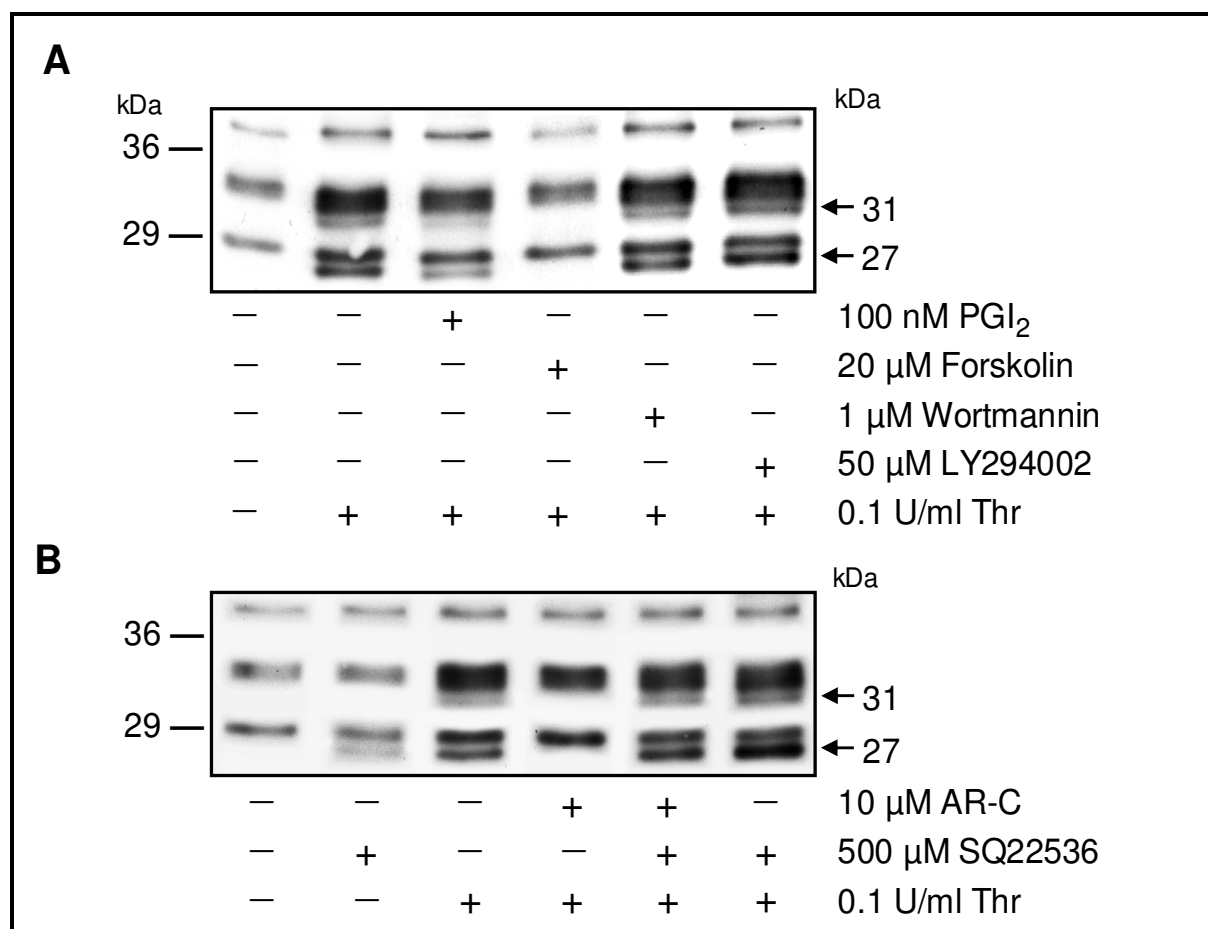
### 3.6 Hemmung der Gi-abhängigen Signalwege bei der Thrombin-induzierten Phosphorylierung von p27 und p31 an Tyrosinresten

Der P2Y12-Rezeptor ist, wie oben bereits mehrfach erwähnt an das inhibitorische G-Protein G $\alpha$ 2 gekoppelt. G $\alpha$ 2 induziert über die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), und über die  $\alpha$ -Untereinheit kommt es zur Hemmung der Adenylatzyklase [26, 48].

In Abbildung 16 ist untersucht worden, von welchen Signaltransduktionsmechanismen die mit Thrombin induzierten Phorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten abhängig sind. Die Hemmung der PI3-K sowohl mit 1 µM Wortmannin, als auch mit 50 µM LY294002 haben keinen Effekt auf die mit 0,1 U/ml Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten

von p27 und p31. Wird die cAMP Konzentration mit Prostaglandin I<sub>2</sub> (100 nM) rezeptorvermittelt vor der Stimulation mit Thrombin erhöht, so sind die Phosphorylierungen an Tyrosinresten bei 27 und 31 kDa nur abgeschwächt nachweisbar. Nach Vorinkubation mit Forskolin, einem direkten Adenylatzyklaseaktivator, werden diese Phosphorylierungen komplett verhindert (Abbildung 16A). Daraus folgt, dass die Adenylatzyklase, nicht aber die Phosphoinositol-3-Kinase in die Mechanismen der Signaltransduktion, die zu den Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 führen, involviert ist.

Bestätigt wird diese Annahme auch dadurch, dass andererseits die Hemmung der Adenylatzyklase mit 500 µM SQ22536 allein eine diskrete Tyrosinphosphorylierung von p27 und p31 zu induzieren vermag. Folgerichtig wird auch der hemmende Effekt von AR-C69931MX auf diese Phosphorylierungen durch Vorinkubation mit SQ22536 aufgehoben.



**Abbildung 16: Effekte von Inhibitoren der PI-3-Kinase und der Adenylatzyklase auf die Thrombin induzierte Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31**

Gewaschene humane Thrombozyten („Methoden“ 2.2.1) wurden vorinkubiert und anschließend für 30 Sekunden stimuliert, wie in „Methoden“ 2.2.4 beschrieben. Alle Reaktionen wurden bei 37°C unter ständigem Rühren durchgeführt. Die Proben wurden wie oben beschrieben („Methoden“ 2.2.5-2.2.6) mittels SDS-PAGE und

anschließendem Immuno-(Western-)-Blot analysiert. Die gezeigten Blots sind jeweils repräsentativ für drei gleiche, unabhängige Experimente.

A: Hemmung der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten durch Stimulation der Adenylzyklase und Hemmung der PI-3-Kinasen. Die Thrombozyten wurden entweder mit Puffer oder 100 nM PGI<sub>2</sub> für 30 Sekunden, mit 20 µM Forskolin für fünf Minuten, oder 1 µM Wortmannin oder 50 µM LY294002 für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 30 Sekunden mit 0,1 U/ml Thrombin oder Puffer stimuliert.

B: Der hemmende Effekt von AR-C69931MX auf die Thrombin-induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten wird durch die Hemmung der Adenylzyklase mit SQ22536 aufgehoben. Die Thrombozyten wurden vor der Stimulation mit Thrombin entweder mit Puffer, SQ22536 oder AR-C69931MX für fünf Minuten unter ständigem Rühren bei 37°C vorinkubiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ausgangspunkt

In der Literatur sind bereits zahlreichen Studien zu finden, die die Funktion der ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 auf humanen Thrombozyten charakterisieren [27]. Besonders Untersuchungen mit ADP als Agonist brachten aufschlussreiche Erkenntnisse über die verschiedenartige Beteiligung dieser Rezeptoren im Rahmen der Aktivierung und anschließenden Aggregation. Unter physiologischen Bedingungen wird ADP nach einem primären Signal, wie zum Beispiel der Aktivierung durch Kollagen oder Thrombin, aus dichten Granula sezerniert. Auf diese Weise kommt es sekundär zur Aktivierung der ADP-Rezeptoren und zur Weiterleitung ihrer Signale in das Innere der Thrombozyten. In den hier vorgestellten Untersuchungen standen die ADP-Rezeptor-abhängigen Phosphorylierungen an Tyrosinresten im Vordergrund.

In früheren Untersuchungen wurden Änderungen im Muster der Phosphorylierungen an Tyrosinresten mit der Aktivierung des P2Y12-Rezeptors in Zusammenhang gebracht [12, 52]. Bei Levy-Toledano wurden die Phosphorylierungen an Tyrosinresten nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP, IBOP, einem Thromboxan A<sub>2</sub>-Analogon, und Thrombin im Bereich von 60-130 kDa von einem Patienten mit einem Defekt im P2Y12-kodierenden Gen im Vergleich zu normalen Thrombozyten untersucht [52]. Bei diesen Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass die Signale des P2Y12-Rezeptors auf die Tyrosinphosphorylierung der Proteine von 55, 64, 80, 100, 105 125/130 und 140 kDa einen Einfluss haben. Des Weiteren brachten Experimente mit Thrombozyten von Patienten mit einem genetischen Defekt, der mit einer verminderten Zahl von dichten oder  $\alpha$ -Granula einhergeht („storage pool deficiency“ - SPD), wichtige Erkenntnisse über die Rolle des sekundär freigesetzten ADPs und somit der Aktivierung des P2Y12-Rezeptors nach Thrombin- und Kollagenstimulation [2]. Die Autoren konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten nach Stimulation mit Thrombin oder Kollagen bei Thrombozyten von diesen Patienten komplett ausblieb. Bei Patienten mit einem  $\alpha$ -Granula Defekt ( $\alpha$ -SDP) war im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten ebenfalls ein lückenhaftes Muster der Phosphorylierungen an Tyrosinresten zu erkennen. Hier wurde jedoch nur die Aktivierung mit Thrombin untersucht.



## 4.2 Stellenwert der ADP-Rezeptoren bei der Phosphorylierung an Tyrosinresten von Proteinen humaner Thrombozyten

Von besonderem Interesse waren bei unseren Untersuchungen die Phosphorylierungen an Tyrosinresten der Proteine unterhalb des Molekularmassenbereichs von 50 kDa. Hier konnten wir zeigen, dass sich nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin bei einer Reihe von Proteinen (27, 29, 31, 34, 39 kDa) Änderungen im Phosphorylierungsmuster ereignen (Abbildung 5). Durch Vorinkubation mit verschiedenen ADP-Rezeptorantagonisten stellte sich heraus, dass die Signale vom P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor an der Phosphorylierung von Tyrosinresten der oben genannten Proteine beteiligt sind, nicht jedoch die Signale ausgehend vom P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (Abbildung 7). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Signale des an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor koppelnden inhibitorischen G-Proteins G $\alpha$ 2 für die Phosphorylierungen der Tyrosinreste dieser Proteine benötigt werden. AR-C69931MX, ein hochspezifischer, kompetitiver Antagonist des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, hemmt konzentrationsabhängig die mit bis zu 0,1 U/ml Thrombin induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten der Proteine von 27 und 31 kDa (Abbildung 8). Bei höheren Thrombin-Konzentrationen war jedoch ein geringeres Ausmaß der Hemmung deutlich zu erkennen. Ab einer genügend hohen Konzentration von Thrombin (hier 0,3 U/ml) ereignen sich diese Phosphorylierungen also weitgehend unabhängig vom freigesetzten ADP, und andere Mechanismen der Signalübertragungen, die zu diesen Phosphorylierungen führen, überwiegen. Dieses Phänomen wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe am Beispiel der Phospholipase D (PLD)-Aktivierung gezeigt. Martinson et al. demonstrierten 1998, dass die Aktivierung der PLD nach Inkubation der Thrombozyten mit Apyrase und ARL 66096 und anschließender Aktivierung mit Thrombin gehemmt ist. Die alleinige Stimulation mit ADP reicht jedoch nicht aus, um eine Aktivitätssteigerung der PLD zu induzieren [60].

Die Phosphorylierungen von p27 und p31 können nicht nur indirekt durch Freisetzung von ADP aus dichten Granula nach Thrombinaktivierung induziert werden, sondern auch durch direkte Stimulation der Thrombozyten mit 2-MeS-ADP, wobei die ADP-Rezeptoren primär aktiviert werden. 2-MeS-ADP ist ein ADP-Analogon mit höherer Affinität zu den ADP-Rezeptoren als ADP.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 konzentriert, weil diese Proteine in ruhenden Thrombozyten nicht an Tyrosinresten phosphoryliert vorliegen (Abbildung 5).

#### **4.3 Indirekte Aktivierung der ADP-Rezeptoren durch Sekretion nach Stimulation anderer membranständiger Rezeptoren**

Die bisher beschriebenen Phosphorylierungen werden ebenso durch Kollagen und den Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten U46619 induziert. Durch diese beiden, die Thrombozyten aktivierenden Substanzen, wird, ebenso wie nach Thrombinstimulation, ADP aus dichten Granula freigesetzt, und somit der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor aktiviert. Auch bei den durch Kollagen und U46619 induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 findet sich die Abhängigkeit von der Signalübertragung vom P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor, da die auf diesem Wege induzierten Phosphorylierungen ebenso AR-C69931MX-sensitiv sind (Abbildung 9).

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die Aggregation humaner Thrombozyten nach Aktivierung mit Kollagen sowohl von der Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> durch die COX in der Zellmembran, als auch von der ADP-Freisetzung abhängig [4, 79]. Nach Blockade des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors mit dem spezifischen Antagonisten SQ29548, oder nach Hemmung der COX und somit der Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> durch Acetylsalicylsäure, ist die mit Kollagen induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 gehemmt. Bei Aktivierung mit Thrombin werden die Proteine jedoch trotz Ausschaltung der Thromboxan A<sub>2</sub>-Signale weiterhin phosphoryliert (Abbildung 10). Der hemmende Effekt der Acetylsalicylsäure auf diese Phosphorylierungen kann durch gleichzeitige Stimulation mit Kollagen (10 µg/ml) und dem Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten U46619 (1 µM) aufgehoben werden, nicht jedoch bei gleichzeitiger Stimulation mit ADP (bis zu 100 µM) und Kollagen (nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kollageneffekte sowohl von der Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese, als auch von der durch Thromboxan A<sub>2</sub> hervorgerufenen ADP-Freisetzung abhängig sind.

Bei der Aggregation zeigte sich ebenfalls, dass bei Vorinkubation mit SQ29548 und anschließender Stimulation mit Kollagen die Aggregation nahezu komplett gehemmt war, nicht jedoch bei Stimulation mit Thrombin (Abbildung 12).

Thromboxan A<sub>2</sub> aktiviert die G-Proteine Gq und G12/13 [67]. In Experimenten mit Mäusen mit Deletion im Gq-Gen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Gi und G12/13 für die Aktivierung von Glykoprotein IIbIIIa und anschließende Aggregation der Thrombozyten, ausreichend ist [64]. Andererseits werden die Signale von Gq für die Freisetzung von beispielsweise ADP aus dichten Granula durchaus benötigt [68].

Für niedrige Konzentrationen des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten U46619 konnte gezeigt werden, dass sie eine Freisetzung von Calcium und eine Formänderung der Thrombozyten (shape change) über Signale von G12/13 bewirken können. Bei höheren Konzentrationen kommt es durch Gq-Signale zur Freisetzung von ADP und auf diesem Wege zur Aktivierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors und zur Aggregation der Thrombozyten [75]. Dieses Ereignis muss folgerichtig der Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 voraus gehen, da wir für diese Phosphorylierungen eine Abhängigkeit von den Signalen des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors zeigen konnten (Abbildung 9). Bei Aktivierung der Thrombozyten mit 2-MeS-ADP sind die Phosphorylierungen von p27 und p31 nur sehr schwach zu erkennen. Die Erklärung dafür könnte die relativ geringe Anzahl von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche sein [6, 95]. Ungefähr 150 P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren sind pro Thrombozyt exprimiert, aber zwischen 1000 und 2000 Thrombin-Rezeptoren (PAR-1) wurden nachgewiesen [27].

Die Phosphorylierungen von p27 und p31 an Tyrosinresten sind sowohl von der ADP-Sekretion, die durch ein primäres Gq-Signal ausgelöst wird, als auch von den Signalen des Gi-gekoppelten P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, der durch die ADP-Freisetzung aktiviert wird, abhängig.

Der Glykoprotein IIbIIIa-Komplex ist für die Vernetzung der einzelnen Thrombozyten über Fibrinogenbrücken verantwortlich. Es stellt sich folglich die Frage, inwieweit die Aktivierung dieses Komplexes in die zur Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 führenden Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors involviert ist.

Die Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors sind durchaus wichtig für die Aktivierung des GP IIbIIIa-Komplexes, was kürzlich in mehreren Studien gezeigt werden konnte [43, 44, 64]. Für die Phosphorylierungen einiger Proteine während der durch Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung wurde ebenfalls eine Abhängigkeit vom Glykoprotein IIbIIIa-Komplex demonstriert. Von Ferrell et al. wurde bereits 1989 gezeigt, dass eine Reihe von Proteinen nach Stimulation mit Thrombin an Tyrosinresten phosphoryliert wurde, und dass diese

Phosphorylierungen durch GPIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten inhibierbar sind. Ebenso fehlten Patienten mit Glanzmannscher Thrombasthenie diese Phosphorylierungen. [24, 52] Der Fokus lag in diesen Untersuchungen jedoch bei Proteinen oberhalb des Molekulargewichtsbereiches von 50 kDa.

#### **4.4 Aktivierung des Glykoprotein IIbIIIa-Komplexes durch Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors**

AR-C69931MX vermag die Thrombin induzierte Aggregation komplett zu hemmen (Abbildung 11). Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass die Hemmung der Phosphorylierungen von p27 und p31 und ebenso die Hemmung der Dephosphorylierungen von p29, p34 und p39 lediglich ein Phänomen der mangelnden Aktivierung des GP IIbIIIa sind. Wir konnten jedoch zeigen, dass trotz veränderter Fibrinogenbindung an dem Glykoprotein IIbIIIa-Komplex mit RGDS oder dem nicht peptidergen Antagonisten S1197 (Abbildung 13) die Tyrosinreste von p27 und p31 unvermindert phosphoryliert werden. Damit ist eindeutig bewiesen, dass diese Phosphorylierungen nicht von den Signalen des GP IIbIIIa-Komplexes abhängig sind.

Andererseits werden die in Abbildung 5 beschriebenen Dephosphorylierungen durch Hemmung der Fibrinogenbindung verhindert (Abbildung 13). Außerdem ist die Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 unter diesen Bedingungen verstärkt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die vom P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor mediierte Kinaseaktivität über der vom Glykoprotein IIbIIIa-Komplex regulierten Phosphataseaktivität vorherrscht.

Für die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 liegt also eine direkte Abhängigkeit von den Signalen des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors vor, wobei die Dephosphorylierungen von p29, p34 und p39 von der Aktivierung des Glykoprotein IIbIIIa-Komplexes und dessen „outside-in-signaling“ abhängig sind.

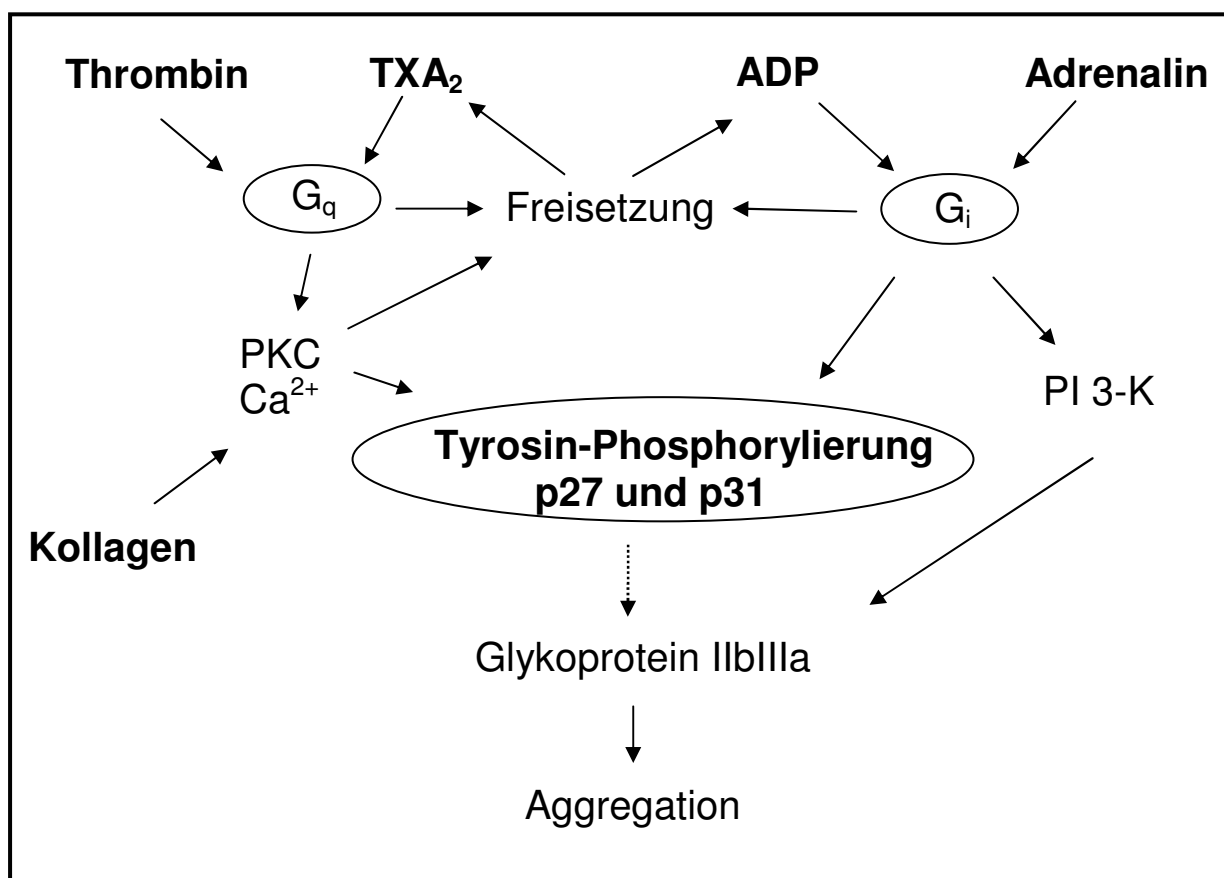
## 4.5 Signale der G-Proteine

Um den Stellenwert der Signale inhibitorischer G-Proteine für die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 genauer beschreiben zu können, haben wir Experimente mit Adrenalin durchgeführt. Adrenalin interagiert ebenfalls über den  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor mit einem inhibitorischen G-Protein, G<sub>i</sub>, auf humanen Thrombozyten. Die Stimulation der Thrombozyten mit Adrenalin allein bewirkt jedoch noch keine Aktivierung [50, 89]. Wie in Abbildung 15 gezeigt, vermag Adrenalin allein auch keine Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 zu induzieren, jedoch wird der Thrombineffekt durch Adrenalin verstärkt. Überraschenderweise wird der hemmende Effekt von AR-C69931MX auf diese Phosphorylierungen von Adrenalin aufgehoben. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Thrombozytenaggregation bei der Aktivierung mit Thrombin konnten vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe erstmalig auch für die ERK2-Aktivierung gezeigt werden [21, 79]. Dies trifft auch für die Aktivierung mit Kollagen zu [79]. Bereits 1990 konnten Gachet et al. zeigen, dass Adrenalin in der Lage ist die mit ADP induzierte Aktivierung der Thrombozyten von Blutspendern, die zuvor Ticlopidin, einen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten genommen hatten, zu imitieren und zu verstärken [25]. Außerdem reagieren Thrombozyten von Patienten, die auf Adrenalin-Stimulation keine Reaktion zeigen, sogenannte „Epinephrine-nonresponders“, nur vermindert auf ADP-Stimulation. Auch die Phosphorylierung an Tyrosinresten ist davon betroffen. Dies weist darauf hin, dass sich der  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor und der purinerge P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor intrazelluläre Signaltransduktionswege teilen [63]. In den Untersuchungen von Nakahashi et al. wurde gezeigt, dass die ausbleibende Antwort auf Epinephrine bei „Epinephrine-nonresponders“ weder auf einen Unterschied im kodierenden Gen für den  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor, noch auf eine verminderte Rezeptoranzahl auf der Thrombozytenoberfläche, sondern auf unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden zurückzuführen ist.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors einerseits über die  $\alpha$ -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins G<sub>i</sub> die Adenylatzyklase hemmen, und andererseits über die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit die Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3-K) induzieren [20, 26, 48, 92]. In Thrombozyten ist sowohl die Isoform PI3-K $\beta$ , als auch PI3-K $\gamma$  exprimiert. In der Literatur finden sich jedoch unterschiedliche Aussagen, welche Isoform die Glykoprotein IIb/IIIa-Aktivierung reguliert. In einer aktuellen Arbeit von Cosemans et al. wird

postuliert, dass beide Isoformen für eine stabile Thrombusformation benötigt werden [13]. Dieses Beispiel verdeutlicht gut, dass die genauen Mechanismen der Signaltransduktion, die nach Aktivierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors innerhalb der Zelle ablaufen, bis dato noch nicht komplett erklärt werden können.

Die folgende Abbildung (Abbildung 17, modifiziert nach Fälder [22]) fasst schematisch die Signaltransduktionswege auf der Ebene der G-Proteine, deren Signale zur Protein Tyrosinphosphorylierung von p27 und p31 führen, zusammen.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Signale der Phosphorylierung von p27 und p31 und der involvierten G-Proteine**

Die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub> oder Kollagen führt zur Weiterleitung der Signale von der Zellmembran über ein G-Protein zur Sekretion von beispielsweise ADP aus dichten Granula, so dass indirekt in einem positiven „feed-back“-Mechanismus die ADP-Rezeptoren autokrin stimuliert werden. Das gleiche gilt für die G<sub>i</sub>-Stimulation mit Adrenalin.

Außerdem ist in der Abbildung schematisiert dargestellt, wie die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten induziert wird. In der Abbildung wird nochmals deutlich, dass die alleinige Stimulation von G<sub>q</sub> nicht ausreichend ist. Ebenso ist die Unabhängigkeit von der Glykoprotein IIb/IIIa-Aktivierung, also der Aggregation zu erkennen.

#### 4.6 Aktivität der Adenylatzyklase und cAMP-Konzentrationen

Wird die Adenylatzyklase mit PGI<sub>2</sub> aktiviert, und die Thrombozyten anschließend mit ADP oder Adrenalin stimuliert, so ist ein deutlicher Abfall der cAMP-Konzentration zu messen. Dieser Effekt konnte aber bis jetzt noch nicht für die basale Aktivität der Adenylatzyklase nachgewiesen werden [83, 97]. Ebenso wurde durch die direkte Hemmung der Adenylatzyklase mit einem ADP-Analogon, wie zum Beispiel SQ22536, ein stimulierender Effekt auf die Thrombozyten nur nach vorheriger Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität mit PGI<sub>2</sub> gemessen [33]. Außerdem werden durch die Hemmung der Adenylatzyklase weder die Signale des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, noch des  $\alpha$ 2A-Adrenozeptors ersetzt [18, 83, 97]. Andererseits induziert die über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor aktivierte PI-3-K die Aktivierung von Rap 1B [54], Akt [46], ERK2 (Fälker, Lange, Presek, unveröffentlichte Daten) und auch die Sekretion dichter Granula [17], die Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa [44] und auch die Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten [92]. Somit wird die Hemmung der Adenylatzyklase als ein Mechanismus betrachtet, der zwar nicht direkt in die Thrombozytenaktivierung involviert ist, aber durchaus notwendig ist, den aggregationshemmenden Effekten von Mediatoren, die die cAMP-Konzentration anheben, entgegen zu wirken.

In Thrombin stimulierten Thrombozyten, die zuvor mit PGI<sub>2</sub>, oder Iloprost, beides Mediatoren, deren Rezeptoren an ein auf die Adenylatzyklase stimulatorisch wirkendes G-Protein, G<sub>s</sub>, gekoppelt sind, vorbehandelt wurden, ist ein verändertes Phosphorylierungsmuster an Tyrosinresten, größtenteils unidentifizierter Proteine von 39 kDa und größer, zu verzeichnen [77, 82, 88]. Dies trifft auch für Forskolin zu, das direkt die katalytische Untereinheit der Adenylatzyklase aktiviert. Wir haben ähnliche Beobachtungen in dem uns interessierenden Molmassenbereich machen können. Nach Erhöhung der cAMP-Konzentration mit PGI<sub>2</sub> waren verminderte Phosphorylierungen von p27 und p31 nach Thrombinstimulation zu verzeichnen; nach Vorinkubation mit Forskolin waren diese Phosphorylierungen komplett gehemmt (Abbildung 16A). Auf der anderen Seite hatte SQ22536, ein direkter Adenylatzyklase-Inhibitor, in Konzentrationen, für die die maximale Hemmung der Forskolin induzierten Adenylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden konnte [18], keinen erkennbaren Effekt auf die Phosphorylierung von p31, lediglich einen diskreten Effekt auf p27 und einen verstärkenden Effekt auf die Thrombinantwort. Ebenso konnte auch der hemmende Effekt von AR-C69931MX

auf die Thrombin induzierten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 mit SQ22536 aufgehoben werden (Abbildung 16B). Dagegen konnten weder Wortmannin, noch LY294002, zwei spezifische, aber chemische unterschiedliche PI-3-K-Inhibitoren, die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 oder p31 beeinflussen (Abbildung 16A). Folglich konnte damit keine Isoform-Identität eruiert werden.

Mit unseren Daten konnte gezeigt werden, dass die mit Thrombin induzierten, P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor medierten schnellen und vorübergehenden Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 von der Hemmung der Adenylatzyklase über die  $\alpha$ -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins G<sub>i</sub>, nicht aber von der Aktivierung der PI-3-K über die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit abhängig sind.

#### **4.7 Beteiligte Protein-Tyrosinkinasen und -phosphatasen**

Die Arbeit hat sich nicht mit der Identifizierung der Proteintyrosinkinasen (PTK) und -phosphatasen beschäftigt. In Thrombozyten sind die PTK der src-Familie im Vergleich zu anderen Geweben mit 0,2-0,4% Anteil an der Gesamtproteinmenge in der höchsten Konzentration nachweisbar [29]. Die Tyrosinkinasen der src-Familie gehören, wie auch alle anderen an den hier zu diskutierenden Phosphorylierungen beteiligten Kinasen zur Gruppe der primär nicht Rezeptor-gekoppelten („nonreceptor PTKs“) Proteintyrosinkinasen.

Auch die Proteintyrosinphosphatasen (PTP) werden in transmembranäre PTP und primär nicht Rezeptor-gekoppelte PTP eingeteilt. In Thrombozyten konnten bisher nur „non-receptor“-PTP nachgewiesen werden, und zwar drei verschiedene Subspezies: PTP-1B, SHP-1 und SHP-2 [41]. Nach Aktivierung mit verschiedenen Agonisten werden zahlreiche Proteine in drei zeitlichen Wellen phosphoryliert. Folglich werden verschiedene PTK in diesen zeitlichen Abständen aktiviert. Während der frühen Phase der Thrombozytenaktivierung und Formänderung („shape change“) wird zum Beispiel syk relativ schnell aktiviert [41, 76]. In der initialen Aggregationsphase ist ein Anstieg der Aktivität von src-, fyn-, und yes-Kinase zu verzeichnen [53]. Die Aktivitätssteigerung von FAK (focal adhesion kinase) findet hingegen signifikant später als die von syk und src statt.

Neuere Daten weisen darauf hin, dass der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor, nicht aber der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor auf Thrombozyten die Aktivierung von src-Kinase nach ADP-Stimulation aktiviert [32]. In dieser



Studie konnte gezeigt werden, dass nach Vorinkubation der Thrombozyten mit  $A_2P_2P$  und anschließender Stimulation mit ADP die Autophosphorylierung von Tyr416 an src verhindert wird. Die Phosphorylierung an Tyr416 von src korreliert mit der Aktivität. AR-C69931MX hatte keinen Effekt auf die src-Aktivität. Dies passt gut zu der Hypothese, dass src über einen Gq-abhängigen Weg durch Aktivierung der PKC aktiviert wird.[53].

Pharmakologische Inhibitoren können hier helfen, unter den involvierten Kinasen zu unterscheiden. Das Problem hierbei jedoch ist, dass die meisten, wenn nicht gar alle kommerziell erwerbbaren Inhibitoren außer ihrer spezifischen Zielkinase, noch mindestens eine weitere, oder sogar mehrere Proteinkinasen beeinflussen [5].

#### **4.8 Problematik der Identifizierung von an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen**

Sehr viele Studien sind bereits mittels Massenspektrometrie durchgeführt worden, um die während der Thrombozytenaktivierung an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine zu identifizieren [56, 58, 59]. In der sehr systematisch aufgebauten Studie von Marcus et al. von 2003 wurden insgesamt 50 tyrosinphosphorylierte Proteine nach Thrombinstimulation identifiziert [59]. Von diesen 50 Proteinen änderte sich bei 15 die Phosphorylierung an Tyrosinresten nicht nach Thrombinstimulation, bei 29 nahmen die Phosphorylierungen zu, und bei 6 Proteinen, die in ruhenden Plättchen nicht an Tyrosinresten phosphoryliert waren, konnten nach 60 sekundiger Stimulation Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Wenn wir diese Ergebnisse mit den Unsrigen vergleichen, so kommt kein Protein als möglicher Kandidat in Frage, außer für p31, das eventuell LASP-1 (29,8 kDa), elfin (31,3 kDa), oder einem „hypothetischen Protein FLJ12750“ (31,3 kDa) entsprechen könnte [59]. Allerdings wurden für LASP-1 und elfin auch schon Molmassen von 40 und 36 kDa berichtet [9, 47]. Das „hypothetische Protein FLJ12750“ hat zu 78 % Homologien zu dem Adapter-Protein DOKL, das zu der DOK-Familie (62 kDa Proteine) gehört [11].

Diese widersprüchlichen Ergebnisse, die die Unterschiede zwischen den spektrometrisch exakt bestimmten Molmassen und den apparenten Molmassen mittels Gelelektrophorese bestimmen,

verdeutlichen anschaulich die Schwierigkeiten bei der Molmassen vergleichenden Identifizierung an Tyrosinresten phosphorylierter Proteine [58].

#### **4.9 Zusammenfassung und Schlussfolgerung**

In unseren Studien konnten weitere, wichtige Einblicke in die Signaltransduktionsmechanismen der membranständigen, insbesondere der ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>, gebracht werden. Verschiedene Mechanismen der Phosphorylierung bestimmter Proteine an Tyrosinresten wurden beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 von den Signalen des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, nicht aber von denen des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors abhängig sind. Auch sind diese Phosphorylierungen unabhängig von einem einwärtsgerichteten Glykoprotein IIb/IIIa-Signal. Des Weiteren wurden Aggregationsmessungen mit verschiedenen Thrombozyten-Agonisten und spezifischen Rezeptor-Antagonisten vorgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor einen deutlich größeren Einfluss auf die mit Thrombin induzierte Aggregation hat, als der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor. Der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor hingegen hat bei der Kollagen-induzierten Aggregation einen bedeutenden Einfluss, nicht aber bei der mit Thrombin induzierten Aggregation.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass zwar die Adenylatzyklase, nicht aber die Phosphoinositol-3-Kinase in die Mechanismen der Signaltransduktion, die zu den Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 führen, involviert sind.

Detaillierte Studien mit in Zukunft eventuell spezifischeren Inhibitoren und Aktivatoren der einzelnen involvierten Enzyme könnten die Mechanismen innerhalb der verschiedenen Signaltransduktionskaskaden noch verständlicher machen.

## Literaturverzeichnis

1. **Abbracchio M P, Boeynaems J M, Barnard E A, Boyer J L, Kennedy C, Miras-Portugal M T, King B F, Gachet C, Jacobson K A, Weisman G A, Burnstock G:** Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 52-55
2. **Arderiu G, Diaz-Ricart M, Domenech P, Escolar G, Ordinas A, Pujol-Moix N:** Phosphotyrosine proteins in platelets from patients with storage pool disease: direct relation between granule defects and defective signal transduction. *Haematologica* 87 (2002) 629-636
3. **Arita H, Nakano T, Hanasaki K:** Thromboxane A<sub>2</sub>: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res* 28 (1989) 273-301
4. **Atkinson B T, Stafford M J, Pears C J, Watson S P:** Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *Eur J Biochem* 268 (2001) 5242-5248
5. **Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P:** The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371 (2003) 199-204
6. **Baurand A, Eckly A, Bari N, Leon C, Hechler B, Cazenave J P, Gachet C:** Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y<sub>1</sub> and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* 84 (2000) 484-491
7. **Cairns J A, Theroux P, Lewis H D, Jr., Ezekowitz M, Meade T W:** Antithrombotic agents in coronary artery disease. *Chest* 119 (2001) 228-252
8. **CAPRIE-Steering-Committee:** A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348 (1996) 1329-1339
9. **Chew C S, Parente J A, Jr., Zhou C, Baranco E, Chen X:** Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell. *Am J Physiol* 275 (1998) C56-67
10. **Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems J M:** Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal* 12 (2000) 351-360
11. **Cong F, Yuan B, Goff S P:** Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 8314-8325
12. **Contreres J O, Dupuy E, Job B, Habib A, Bryckaert M, Rosa J P, Simoneau G, Herbert J M, Savi P, Levy-Toledano S:** Effect of clopidogrel administration to healthy volunteers on platelet phosphorylation events triggered by ADP. *Br J Haematol* 120 (2003) 633-642

13. **Cosemans J M, Munnix I C, Wetzker R, Heller R, Jackson S P, Heemskerk J W:** Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood* 108 (2006) 3045-3052
14. **Coughlin S R:** How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 11023-11027
15. **Coughlin S R:** Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 82 (1999) 353-356
16. **Dangelmaier C, Jin J, Daniel J L, Smith J B, Kunapuli S P:** The P2Y1 receptor mediates ADP-induced p38 kinase-activating factor generation in human platelets. *Eur J Biochem* 267 (2000) 2283-2289
17. **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* 85 (2001) 341-348
18. **Daniel J L, Dangelmaier C, Jin J, Kim Y B, Kunapuli S P:** Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* 82 (1999) 1322-1326
19. **Diaz-Ricart M, Fuste B, Estebanell E, Tonda R, Lozano M, Escolar G, Jamieson G, Ordinas A:** Efficient tyrosine phosphorylation of proteins after activation of platelets with thrombin depends on intact glycoprotein Ib. *Platelets* 16 (2005) 453-461
20. **Dorsam R T, Kunapuli S P:** Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113 (2004) 340-345
21. **Falker K, Lange D, Presek P:** ADP secretion and subsequent P2Y12 receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets. *Thromb Haemost* 92 (2004) 114-123
22. **Fälker K:** Activation and regulation of the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) in human platelets. Inauguraldissertation Fachbereich 09 Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Gießen (2005)
23. **Ferrell J E, Jr., Martin G S:** Platelet tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by thrombin. *Mol Cell Biol* 8 (1988) 3603-3610
24. **Ferrell J E, Jr., Martin G S:** Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 2234-2238
25. **Gachet C, Cazenave J P, Ohlmann P, Bouloux C, Defreyn G, Driot F, Maffrand J P:** The thienopyridine ticlopidine selectively prevents the inhibitory effects of ADP but not of adrenaline on cAMP levels raised by stimulation of the adenylate cyclase of human platelets by PGE1. *Biochem Pharmacol* 40 (1990) 2683-2687

26. **Gachet C:** ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86 (2001) 222-232
27. **Gachet C:** Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46 (2006) 277-300
28. **Gawaz M:** Das Blutplättchen. (1999), Thieme-Verlag, Stuttgart-New York
29. **Golden A, Nemeth S P, Brugge J S:** Blood platelets express high levels of the pp60c-src-specific tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 852-856
30. **Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C:** A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 66 (1991) 734-736
31. **Habib A, FitzGerald G A, Macclouf J:** Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 274 (1999) 2645-2651
32. **Hardy A R, Jones M L, Mundell S J, Poole A W:** Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* 104 (2004) 1745-1752
33. **Haslam R J, Davidson M M, Desjardins J V:** Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochem J* 176 (1978) 83-95
34. **Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave J P, Gachet C:** The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol* 103 (1998) 858-866
35. **Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave J P, Gachet C:** The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 92 (1998) 152-159
36. **Hechler B, Lenain N, Marchese P, Vial C, Heim V, Freund M, Cazenave J P, Cattaneo M, Ruggeri Z M, Evans R, Gachet C:** A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med* 198 (2003) 661-667
37. **Hechler B, Cattaneo M, Gachet C:** The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* 31 (2005) 150-161
38. **Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S:** Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 97 (1996) 949-956
39. **Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G:** Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *Faseb J* 15 (2001) 2019-2021

40. **Hollopeter G, Jantzen H M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang R B, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley P B:** Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409 (2001) 202-207
41. **Jackson S P, Schoenwaelder S M, Yuan Y, Salem H H, Cooray P:** Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost* 76 (1996) 640-650
42. **Jackson S P, Schoenwaelder 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, Smith G D, Shepherd P R, Daniele N, Kulkarni S, Abbott B, Saylik D, Jones C, Lu L, Giuliano S, Hughan S C, Angus J A, Robertson A D, Salem H H:** PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* 11 (2005) 507-514
43. **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* 108 (2001) 477-483
44. **Kauffmanstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave J P, Nieswandt B, Gachet C:** The P2Y(12) receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 505 (2001) 281-290
45. **Khakh B S, Burnstock G, Kennedy C, King B F, North R A, Seguela P, Voigt M, Humphrey P P:** International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53 (2001) 107-118
46. **Kim S, Jin J, Kunapuli S P:** Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways. *J Biol Chem* 279 (2004) 4186-4195
47. **Kotaka M, Lau Y M, Cheung K K, Lee S M, Li H Y, Chan W Y, Fung K P, Lee C Y, Wai M M, Tsui S K:** Elfin is expressed during early heart development. *J Cell Biochem* 83 (2001) 463-472
48. **Kunapuli S P, Dorsam R T, Kim S, Quinton T M:** Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol* 3 (2003) 175-180
49. **Laemmli U K:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
50. **Lanza F, Beretz A, Stierle A, Hanau D, Kubina M, Cazenave J P:** Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol* 255 (1988) H1276-1288
51. **Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave J P, Gachet C:** Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 104 (1999) 1731-1737

52. **Levy-Toledano S, Maclouf J, Rosa J P, Gallet C, Valles G, Nurden P, Nurden A T:** Abnormal tyrosine phosphorylation linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. *Thromb Haemost* 80 (1998) 463-468
53. **Liebenhoff U, Brockmeier D, Presek P:** Substrate affinity of the protein tyrosine kinase pp60c-src is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem J* 295 ( Pt 1) (1993) 41-48
54. **Lova P, Paganini S, Hirsch E, Barberis L, Wymann M, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M:** A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B. *J Biol Chem* 278 (2003) 131-138
55. **Lundblad R L, White G C, 2nd:** The interaction of thrombin with blood platelets. *Platelets* 16 (2005) 373-385
56. **Maguire P B, Wynne K J, Harney D F, O'Donoghue N M, Stephens G, Fitzgerald D J:** Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics* 2 (2002) 642-648
57. **Mahaut-Smith M P, Tolhurst G, Evans R J:** Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets* 15 (2004) 131-144
58. **Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer H E:** Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* 21 (2000) 2622-2636
59. **Marcus K, Moebius J, Meyer H E:** Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 973-993
60. **Martinson E A, Scheible S, Marx-Grunwitz A, Presek P:** Secreted ADP plays a central role in thrombin-induced phospholipase D activation in human platelets. *Thromb Haemost* 80 (1998) 976-981
61. **Miggin S M, Kinsella B T:** Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1425 (1998) 543-559
62. **Minuz P, Fumagalli L, Gaino S, Tommasoli R M, Degan M, Cavallini C, Lecchi A, Cattaneo M, Lechi Santonastaso C, Berton G:** Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation signals downstream of G-protein-coupled receptors for thromboxane A2 in human platelets. *Biochem J* 400 (2006) 127-134
63. **Nakahashi T K, Kambayashi J, Nakamura T, Le S N, Yoshitake M, Tandon N N, Sun B:** Platelets in nonresponders to epinephrine stimulation showed reduced response to ADP. *Thromb Res* 104 (2001) 127-135
64. **Nieswandt B, Schulte V, Zywiec A, Gratacap M P, Offermanns S:** Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 277 (2002) 39493-39498

- 65. **Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert J M, Maffrand J P, Nurden A:** An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest* 95 (1995) 1612-1622
- 66. **Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl T L:** The relative importance of the ADP receptors, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>1</sub>, in thrombin-induced platelet activation. *Thromb Res* 111 (2003) 65-73
- 67. **Offermanns S, Laugwitz K L, Spicher K, Schultz G:** G proteins of the G<sub>12</sub> family are activated via thromboxane A<sub>2</sub> and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 504-508
- 68. **Offermanns S, Toombs C F, Hu Y H, Simon M I:** Defective platelet activation in G $\alpha$ (q)-deficient mice. *Nature* 389 (1997) 183-186
- 69. **Ohlmann P, Laugwitz K L, Nurnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave J P, Gachet C:** The human platelet ADP receptor activates Gi<sub>2</sub> proteins. *Biochem J* 312 (Pt 3) (1995) 775-779
- 70. **Ohlmann P, Eckly A, Freund M, Cazenave J P, Offermanns S, Gachet C:** ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G $\alpha$ haq. *Blood* 96 (2000) 2134-2139
- 71. **Oury C, Toth-Zsamboki E, Thys C, Tytgat J, Vermynen J, Hoylaerts M F:** The ATP-gated P2X<sub>1</sub> ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb Haemost* 86 (2001) 1264-1271
- 72. **Oury C, Toth-Zsamboki E, Vermynen J, Hoylaerts M F:** P2X<sub>1</sub>-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100 (2002) 2499-2505
- 73. **Oury C, Sticker E, Cornelissen H, De Vos R, Vermynen J, Hoylaerts M F:** ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 279 (2004) 26266-26273
- 74. **Paul B Z, Daniel J L, Kunapuli S P:** Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J Biol Chem* 274 (1999) 28293-28300
- 75. **Paul B Z, Jin J, Kunapuli S P:** Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation. Essential role for p21<sup>ac</sup> and  $\alpha$ (2a) receptors. *J Biol Chem* 274 (1999) 29108-29114
- 76. **Presek P, Martinson E A:** Platelet Protein Tyrosin Kinases. In: von Bruchhausen F, Walter U (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1997, S. 263-296



- 77. **Pumiglia K M, Huang C K, Feinstein M B:** Elevation of cAMP, but not cGMP, inhibits thrombin-stimulated tyrosine phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 171 (1990) 738-745
- 78. **Ralevic V, Burnstock G:** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 (1998) 413-492
- 79. **Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa J P, Bryckaert M:** Costimulation of the Gi-coupled ADP receptor and the Gq-coupled TXA2 receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS Lett* 556 (2004) 227-235
- 80. **Rolin S, Petein M, Tchana-Sato V, Dogne J M, Benoit P, Lambermont B, Ghuysen A, Kolh P, Masereel B:** BM-573, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, prevents pig myocardial infarction induced by coronary thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 306 (2003) 59-65
- 81. **Rosa J P, Artcanuthurry V, Grelac F, Maclouf J, Caen J P, Levy-Toledano S:** Reassessment of protein tyrosine phosphorylation in thrombasthenic platelets: evidence that phosphorylation of cortactin and a 64-kD protein is dependent on thrombin activation and integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3. *Blood* 89 (1997) 4385-4392
- 82. **Ryningen A, Jensen B O, Holmsen H:** Role of autocrine stimulation on the effects of cyclic AMP on protein and lipid phosphorylation in collagen-activated and thrombin-activated platelets. *Eur J Biochem* 260 (1999) 87-96
- 83. **Savi P, Pflieger A M, Herbert J M:** cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7 (1996) 249-252
- 84. **Savi P, Artcanuthurry V, Bornia J, Grelac F, Maclouf J, Levy-Toledano S, Herbert J M:** Effect of clopidogrel treatment on ADP-induced phosphorylations in rat platelets. *Br J Haematol* 97 (1997) 185-191
- 85. **Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert J M:** Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett* 422 (1998) 291-295
- 86. **Savi P, Herbert J M:** Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 31 (2005) 174-183
- 87. **Shaver S R:** P2Y receptors: biological advances and therapeutic opportunities. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4 (2001) 665-670
- 88. **Smith J B, Dangelmaier C, Daniel J L:** Elevation of cAMP in human platelets inhibits thrombin- but not collagen-induced tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 191 (1993) 695-700
- 89. **Steen V M, Holmsen H, Aarbakke G:** The platelet-stimulating effect of adrenaline through  $\alpha$  2-adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true

- stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thromb Haemost* 70 (1993) 506-513
90. **Thomas D W, Mannon R B, Mannon P J, Latour A, Oliver J A, Hoffman M, Smithies O, Koller B H, Coffman T M:** Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A<sub>2</sub>. *J Clin Invest* 102 (1998) 1994-2001
91. **Toth-Zsamboki E, Oury C, Cornelissen H, De Vos R, Vermeylen J, Hoylaerts M F:** P2X<sub>1</sub>-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 278 (2003) 46661-46667
92. **Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, Presek P, Martinson E A, Cazenave J P, Chap H, Gachet C:** A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 94 (1999) 4156-4165
93. **Vial C, Rolf M G, Mahaut-Smith M P, Evans R J:** A study of P2X<sub>1</sub> receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br J Pharmacol* 135 (2002) 363-372
94. **Vu T K, Hung D T, Wheaton V I, Coughlin S R:** Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64 (1991) 1057-1068
95. **Wang L, Ostberg O, Wihlborg A K, Brogren H, Jern S, Erlinge D:** Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets. *J Thromb Haemost* 1 (2003) 330-336
96. **Weber K, Osborn M:** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244 (1969) 4406-4412
97. **Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning D R, Woulfe D, Brass L F:** Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* 277 (2002) 46035-46042

## Thesen

1. Nach Aktivierung humaner Thrombozyten mit Thrombin werden, neben einer Reihe weiterer, Proteine mit apparenten Molmassen von 27 und 31 kDa an Tyrosinresten zeitabhängig phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen sind von den Signalen des P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptors, nicht jedoch des P2Y<sub>1</sub>-ADP-Rezeptors, abhängig.
2. Das Ausmaß der Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 ist von der Konzentration des eingesetzten Thrombins abhängig. Bei höheren Thrombinkonzentrationen ereignen sie sich unabhängig von den Signalen des P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptors. Dieses Phänomen zeigt, dass die sekundäre Aktivierung über die P2Y-ADP-Rezeptoren durch autokrin freigesetztes ADP im Sinne eines Amplifizierungsmechanismus nur bei niedrigen Thrombinkonzentrationen von Bedeutung ist.
3. Da sich dieser Amplifizierungsmechanismus auch bei Stimulation der Thrombozyten mit anderen Agonisten zeigen ließ, wurde dadurch die allgemeine Gültigkeit dieses Prinzips bestätigt.
4. Bei der Untersuchung der Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 wurde gezeigt, dass die Signale des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors bei Aktivierung mit Kollagen von Bedeutung sind, nicht jedoch bei Aktivierung mit Thrombin. Folglich hat die Hemmung der Cyclooxygenase keinen komplett Aggregations-hemmenden Einfluss auf die Thrombozyten.

5. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Verhinderung der Fibrinogenbindung hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31. Diese Phosphorylierungen ereignen sich also unabhängig von den GPIIbIIIa-Signalen.
6. Mit Untersuchungen, bei denen Rezeptoren aktiviert werden, die, analog zu P2Y1 und P2Y12, ebenfalls an die G-Proteinen Gi und das Gq gekoppelt sind, konnte demonstriert werden, dass die Signale, die zur Phosphorylierung an Tyrosinresten von p27 und p31 führen, nicht direkt vom Rezeptor, sondern von den Signalen der entsprechenden G-Proteine abhängig sind.
7. Die Adenylatzyklase, nicht aber die Phosphoinositol-3-Kinase, ist in die Signaltransduktion, die zu den Phosphorylierungen an Tyrosinresten von p27 und p31 führt, involviert.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name	Danica Lange
Adresse	Adam-Kuckhoff-Str. 25 06108 Halle/Saale
Geburtsdatum/ -ort	24. November 1976 in Rinteln

## Schulbildung

1983-1987	Grundschule Bösingfeld, Kreis Lippe
1987-1996	Städtisches Gymnasium Barntrop, Kreis Lippe
04/1996	Abitur

## Studium

10/1996	Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität-Halle/Wittenberg im Fach Humanmedizin
09/1998	Physikum
09/1999	1. Staatsexamen
09/2002	2. Staatsexamen
12/2004	3. Staatsexamen, Approbation

## Promotion

2000-2004	„Regulation der ADP-Rezeptor abhängigen Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in humanen Thrombozyten“ angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
-----------	--

## Berufliche Tätigkeit

03/2005-03/2006	Assistenzärztin an der Klinik für Dermatologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Rahmen eines BG-Drittmittelprojektes
Seit 04/2006	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

# Publikationen

## Originalarbeiten

1. Fälker K, Lange D, Presek P. "ADP secretion and subsequent P2Y<sub>12</sub> receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets". Thromb. Haemost. 2004; 92:114-23
2. Fälker K\*, Lange D\*, Presek P. "P2Y<sub>12</sub> ADP receptor-dependent tyrosine phosphorylation of proteins of 27 and 31 kDa in thrombin-stimulated human platelets". Thromb. Haemost. 2005; 93:880-8 (\*beide Autoren haben gleichermaßen zur Veröffentlichung beigetragen)

## Vorträge

1. Lange D, Fälker K, Presek P; "ADP receptor signalling and protein tyrosin phosphorylation in human platelets" Vortrag XVIth European Platelet Meeting, Rolduc, Niederlande. Abstract publiziert in Platelets 2002; 13 (1).
2. Fälker K, Lange D, Presek P. "P2Y<sub>12</sub> receptor signalling affects ERK2 activation in thrombin-stimulated human platelets." Vortrag XVIII<sup>th</sup> European Platelet Meeting 2003, Romrodt. Abstract publiziert in Platelets 2004, 15(3).
3. Fälker K, Lange D, Presek P. „ERK2-activation through cooperation of G<sub>q</sub> and G<sub>i</sub> signalling in human platelets." Vortrag 10<sup>th</sup> Erfurt Conference on Platelets 2004. Erfurt. Abstract publiziert in Platelets 2004, 15(8).
4. Fälker K, Lange D, Presek P. "Signalling pathways and functional and functional implications mediated by the P2Y<sub>12</sub> receptor upon thrombin-stimulation in human platelets." Vortrag XXI. Bilateralen Symposium Poznan-Halle "COR ET VASA II" 2005, Poznan, Poland. Abstract publiziert in Medical News, Posnan University of Medical Science, Poland, pp 75, suppl. II, 53, 2006

## Poster

1. Fälker K, Lange D, Marx-Grunwitz A, Martinson EA, Presek P. „ADP receptor signalling, phospholipase D regulation and protein tyrosin phosphorylation in human platelets.” Posterpräsentation 7<sup>th</sup> International Dahlem Symposium “Cellular Signal Recognition and Transduction” 2001, Berlin-Dahlem.
2. Lange D, Fälker K, Presek, P. “ADP receptor signalling, protein tyrosine phosphorylation and phospholipase D regulation in human platelets” 6<sup>th</sup> Meeting Signal Transduction Society, November 2002, Weimar.
3. Fälker K, Lange D, Frühauf A, Wolf HH, Presek P. “What is the role of ERK2 MAP kinase in human platelets?” Posterpräsentation XIX<sup>th</sup> European Platelets Meeting 2004, Bad Brückenau. Abstract publiziert in Platelets 2005, 16(5).

# **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation

**Regulation der ADP-Rezeptor abhängigen Phosphorylierung  
von Proteinen an Tyrosinresten in humanen Thrombozyten**

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel  
angefertigt zu haben.

Halle/Saale, im August 2007

Danica Lange



# **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

## **Regulation der ADP-Rezeptor abhängigen Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in humanen Thrombozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)  
erstmalig einreiche.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, im August 2007

Danica Lange

## **D a n k s a g u n g**

Die vorliegende Promotionsarbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Sektion Klinische Pharmakologie, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Zeit von 2000 bis 2004 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Peter Presek, dem ich hier an erster Stelle für seine Unterstützung und Beratung bei der Bearbeitung des Themas danke. Stets war er bereit, mit seinem breiten theoretischen und praktischen Wissen eine ergiebige und der Sache förderliche Diskussion zu führen. Insbesondere die gemeinsame Arbeit im Labor habe ich immer sehr geschätzt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Knut Fälker, ohne dessen fachliche und auch moralische Unterstützung die Arbeit bestimmt nicht entstanden wäre.

Den Mitarbeiterinnen Frau Cornelia Just, Frau Claudia Kielmann und Frau Annelies Hauser danke ich für die hervorragende technische Unterstützung.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Geduld, ihren Zuspruch und ihre Unterstützung, und dass sie, auch wenn sich alles wieder mal etwas hinauszögerte, immer an mich geglaubt und mich zum Fortfahren ermutigt haben.

Zuletzt möchte ich meinem lieben Freund Jörg danken, der mir gerade in den letzten Wochen bei der Fertigstellung eine einzigartige Hilfe war und mich unermüdlich zur Fertigstellung der Arbeit motiviert hat.