

**Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber**

**Die Rolle von Prostaglandin E₂ bei der
Plättchenthrombusbildung induziert durch
humane atherosklerotische Plaques**

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

**vorgelegt von
Lisa Janina Kiechle
geb. Schober**

**aus
Amberg
2016**

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Klauss
Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Entstehung atherosklerotischer Läsionen	1
1.2 Arterielle Thrombusbildung	2
1.3 Prostaglandin E ₂	4
2 Fragestellung	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Materialien	8
3.2 Methoden	10
3.2.1 Blutabnahme	10
3.2.2 Präparation von humanem plättchenreichem Plasma	11
3.2.3 Präparation von humanen atherosklerotischen Plaquehomogenaten	11
3.2.4 Impedanzaggregometrie	12
3.2.5 Messung der Aggregation im Aggregometer	12
3.2.6 Messung der ATP-Sekretion	13
3.2.7 Analyse der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion und Thrombus- bildung unter arteriellen Flussbedingungen	13
3.2.8 Quantifizierung des Gehalts von PGE ₂ in humanen atherosklerotischen Plaques	15
3.2.9 Statistische Auswertung	15
4 Ergebnisse	16
4.1 Wirkung des EP ₃ -Agonisten Sulprostone und von PGE ₂ auf die Thrombozy- tenfunktion	16
4.2 Wirkung von PGE ₂ in humanen atherosklerotischen Plaques auf die Throm- bozytenfunktion	19
4.2.1 Effekte der EP ₃ -Antagonisten AE5-599 und AE3-240	19
4.2.1.1 Die EP ₃ -Antagonisten AE5-599 und AE3-240 hemmen die Potenzierung der Thrombozytenaggregation durch Sulprostone	19
4.2.1.2 Die EP ₃ -Antagonisten AE5-599 und AE3-240 hemmen nicht die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion	20

4.2.1.3 Wirkungen der EP ₃ -Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenadhäsion und Plättchenthrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen	23
4.2.2 Wirkung des EP ₄ -Antagonisten AE3-208	23
4.2.2.1 Der EP ₄ -Antagonist AE3-208 bewirkt eine Potenzierung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation durch PGE ₂	23
4.2.2.2 Der EP ₄ -Antagonist AE3-208 beeinflusst nicht die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaggregation	26
4.3 Quantifizierung des Gehalts von PGE ₂ in humanen atherosklerotischen Plaques	26
5 Diskussion	28
6 Zusammenfassung	33
7 Literaturverzeichnis	34
Anhang	39
Abkürzungen	40
Publikationsverzeichnis	42
Danksagung	43
Eidesstattliche Versicherung	44

1 Einleitung

Die Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Thrombusbildung auf der Grundlage einer atherosklerotischen Plaqueruptur ist ein hochkomplexer Prozess und in seinen molekularen und zellulären Einzelheiten bisher noch unzureichend verstanden. Thrombozyten spielen sowohl in der Aufrechterhaltung der Hämostase als auch in der Atherothrombose eine zentrale Rolle. Als wichtigste Strategie zur Prophylaxe von arteriellen thrombotischen Ereignissen haben sich antithrombozytäre Substanzen, wie Acetylsalicylsäure (Aspirin), P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Clopidogrel) oder GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Abciximab) etabliert. Die Hauptnebenwirkung dieser Medikamente ist eine Verlängerung der Blutungszeit und den damit verbundenen, möglicherweise lebensbedrohlichen Komplikationen, da sie die Thrombozytenfunktion unter pathophysiologischen als auch unter physiologischen Bedingungen beeinflussen (Pollack and Hollander 2008). Die Entwicklung neuer anti-thrombozytärer Substanzen, die spezifisch die durch atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaktivierung hemmen und dadurch die Atherothrombose reduzieren, ohne in die Hämostase einzugreifen, könnte zu Medikamenten führen, die kein Blutungsrisiko aufweisen.

1.1 Entstehung atherosklerotischer Läsionen

Kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen sind die häufigsten Krankheits- und Todesursachen in den Industriestaaten und werden in Zukunft auch in weniger entwickelten Ländern zu eminenten Gesundheitsproblemen führen (Roth *et al.* 2015). Die chronische ischämische Herzkrankheit ist seit Jahren führende Todesursache in Deutschland, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt auf Rang zwei, der Schlaganfall steht an achter Stelle der aktuellen Publikation des Statistischen Bundesamtes Deutschland (Statistisches Bundesamt 2013). Bedeutendste Grundlage dieser Erkrankungen ist die Atherosklerose, eine progressive, systemische Erkrankung arterieller Gefäße, welcher im Wesentlichen chronische inflammatorische Reaktionen der Gefäßwand zugrunde liegen (Libby 2002; Hansson 2005; Libby *et al.* 2011; Weber and Noels 2011).

Risikofaktoren der Atherosklerose sind u.a. Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Disposition, Alter, Geschlecht,

Adipositas, Homocysteinämie oder Infektionen mit bestimmten Mikroorganismen (z.B. mit *Chlamydia pneumoniae* oder Herpesviren) (Ross 1999). Turbulente, nicht laminare Strömung des Blutes an Gefäßverzweigungen und -abgängen fördern die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen an diesen Stellen des arteriellen Gefäßsystems (Prädispositionsstellen) (Nakashima *et al.* 1998; Gimbrone 1999). Durch einen oder mehrere dieser Risikofaktoren kommt es zu einer Dysfunktion des Endothels mit vermehrter Durchlässigkeit für Plasmaproteine, und LDL akkumuliert aufgrund spezifischer Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix im Subendothel (Skalen *et al.* 2002; Hansson 2005). Monozyten wandern ein, differenzieren zu Makrophagen und werden durch Internalisierung der LDL-Partikel zu sogenannten Schaumzellen. Durch Amplifikation des Entzündungsprozesses sowie durch Ansammlung und Apoptose der Schaumzellen entwickelt sich aus der frühen atherosklerotischen Läsion (*fatty streak*) der atherosklerotische Plaque (Hansson 2005; Libby *et al.* 2011; Weber and Noels 2011). Dieser ist gekennzeichnet durch einen lipidreichen, nekrotischen Kern, bedeckt von einer fibrösen Kappe, welche von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix gebildet wird (Libby *et al.* 2011).

Im Inneren des atherosklerotischen Plaques wurden verschiedene prothrombogene Substanzen beschrieben: morphologisch heterogene Kollagen Typ I- und III- Strukturen, *tissue factor*, vWF, Fibronectin, Laminin, Thrombin, Fibrinogen und Fibrin, oxidiertes LDL und Lysophosphatidsäure (van Zanten *et al.* 1994; Toschi *et al.* 1997; Badimon *et al.* 1999; Siess *et al.* 1999; Ruggeri 2002; Rother *et al.* 2003; Penz *et al.* 2005; Reininger *et al.* 2010). In fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose können sekundäre Veränderungen innerhalb des Plaques wie Kalzifikationen, Ulzerationen, oder Einblutungen aus neugebildeten fragilen Mikrogefäßen zu komplexeren Läsionen führen (Lusis 2000).

1.2 Arterielle Thrombusbildung

Bei der Atherothrombose sind Thrombozyten Hauptbestandteil des gefäßverschließenden Thrombus. Sie können aber auch zur Entstehung und Progression des atherosklerotischen Plaques beitragen (Massberg *et al.* 2002; Ruggeri 2002). Die atherosklerotische Dysfunktion des Endothels erleichtert die Adhäsion der Plättchen, die durch Ausschüttung mitogener Faktoren (z.B. *platelet derived growth factor*, PDGF) zur Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, und durch Frei-

setzung entzündlicher Mediatoren (Chemokine) zur Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten, und dadurch zur Progression des atherosklerotischen Plaques beitragen können (Ruggeri 2002; Weber and Noels 2011).

Akute thrombotische Ereignisse auf dem Boden atherosklerotischer Läsionen sind meistens Folge der Ruptur vulnerabler Plaques und hängen wahrscheinlich wesentlich von der Zusammensetzung des Plaques ab. Vulnerable Plaques haben eine dünne fibröse Kappe und eine hohe Anzahl an inflammatorischen Zellen (Lusis 2000; Lafont 2003). Aktivierte Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren und sezernieren Enzyme, wie z.B. Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs), welche die extrazelluläre Matrix der fibrösen Kappe abbauen und so zur Instabilität des Plaques beitragen (Galis *et al.* 1994; Libby 2002). Das Aufbrechen der fibrösen Kappe führt dazu, dass die thrombogenen Substanzen im Inneren der atherosklerotischen Läsion mit zirkulierendem Blut in Kontakt kommen und zur Bildung eines plättchen- und fibrinreichen „weißen“ Thrombus führen. (Davies and Thomas 1984; Mohler 2007). Außer der Plaqueruptur können auch Endothelerosionen extrazelluläre Matrixstrukturen stabiler Plaques freilegen, welche die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung stimulieren (Virmani *et al.* 2000; Lafont 2003). Als die beiden wichtigsten prothrombogenen Komponenten atherosklerotischer Plaques wurden Kollagen Typ I- und III-Strukturen sowie der *tissue factor* identifiziert (van Zanten *et al.* 1994; Toschi *et al.* 1997; Badimon *et al.* 1999; Penz *et al.* 2005). Kollagene Typ I und III führen über eine Aktivierung des thrombozytären Glykoprotein (GP) VI-Rezeptors zur Plättchenadhäsion und -aggregation (van Zanten *et al.* 1994; Penz *et al.* 2005). *Tissue factor* ist vor allem im lipidreichen Kern vulnerabler atherosklerotischer Läsionen lokalisiert und initiiert über eine Aktivierung der extrinsischen Koagulationskaskade die Bildung von Thrombin mit nachfolgender Fibrinpolymerisation und Thrombozytenaktivierung (Toschi *et al.* 1997; Badimon *et al.* 1999). Die Plaque-induzierte Thrombusbildung kann in zwei konsekutive Phasen eingeteilt werden: In der ersten Phase kommt es zur GP VI-vermittelten Plättchenadhäsion und -aggregation an Plaque-Kollagenstrukturen. In der zweiten Phase kommt es via Plaque-*tissue factor* zur Bildung von Thrombin, Gerinnungsaktivierung und Fibrinbildung (Reininger *et al.* 2010). Die akute arterielle Thrombusbildung kann abhängig von der Größe des Thrombus (verschließender vs. nicht verschließender Thrombus) und Lokalisation (Koronar-, Karotis- oder Zerebralarterien) unterschiedliche klinische Erscheinungsformen bieten.

Klinische Manifestationen der koronaren Herzkrankheit als Ausdruck der Koronarinsuffizienz reichen von Angina Pectoris bis hin zum akuten Myokardinfarkt. Zerebrale Ischämien können durch Ruptur von Karotisplaques mit nachfolgender Embolisation des gebildeten Thrombus in die Zerebralarterien entstehen, und manifestieren sich klinisch als transiente ischämische Attacke oder ischämischer Schlaganfall.

1.3 Prostaglandin E₂

Es existieren eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Molekülen, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen, u.a. die Eikosanoide Prostaglandin I₂ (Prostacyclin), Prostaglandin D₂, und Thromboxan A₂, das Stickstoffmonoxid, und das Adenosin, deren Wirkungsweisen zum Teil gut erforscht sind. Die Rolle von Prostaglandin E₂ (PGE₂) auf die Thrombozytenfunktion und die Plättchenthrombusbildung ist im Gegensatz dazu bisher nur unzureichend verstanden (Friedman *et al.* 2015).

Prostaglandin E₂, ein Gewebshormon, ist ein bedeutender Entzündungsmediator, welcher zur Gruppe der Eikosanoide gehört. PGE₂ hat zudem weitere vielfältige physiologische Funktionen, u.a. erhöht es die Gefäßpermeabilität, wirkt vasodilatierend, sensibilisiert nozizeptive Nervenendigungen, spielt eine Rolle bei der Immunregulation, wirkt kontrahierend auf glatte Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes, hemmt die Magensäureproduktion und ist verantwortlich für den postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus Botalli (Simmons *et al.* 2004).

Im Rahmen der chronisch-entzündlichen Reaktion, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt, wird PGE₂ hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen gebildet. Durch Aktivierung der Phospholipase A₂ wird Arachidonsäure aus deren Membranphospholipiden freigesetzt, und durch die Enzyme Cyclooxygenase 2 (COX-2) und *microsomal prostaglandin E synthase 1* (m-PGES-1) in PGE₂ umgewandelt (Matsumoto *et al.* 1997; Brock *et al.* 1999). Beide Enzyme zeigen in Makrophagen eine erhöhte Aktivität nach proinflammatorischer Stimulation (Murakami *et al.* 2000) und wurden in atherosklerotischen Läsionen identifiziert (Cipollone *et al.* 2001).

Seine mannigfaltigen Wirkungen entfaltet PGE₂ durch Bindung an vier unterschiedliche G-Protein gekoppelte heptahelikale Membranrezeptoren: EP₁, EP₂, EP₃ und EP₄ (siehe **Abb. 1**) (Narumiya *et al.* 1999; Breyer *et al.* 2001; Sugimoto and Narumiya 2007; Friedman *et al.* 2015). EP-Rezeptoren finden sich in unterschiedlicher Verteilung in verschiedensten Geweben (Coleman *et al.* 1994). Menschliche Thrombozyten enthalten mRNA verschiedener EP-Rezeptoren: EP₂, EP₄ und mehrere Isoformen des EP₃-Rezeptors (Paul *et al.* 1998). Es wurden sechs Isoformen des EP₃-Rezeptors identifiziert, die durch alternatives Splicing entstehen und zum Teil über unterschiedliche *second messenger* wirken (Schmid *et al.* 1995; Friedman *et al.* 2015). In vorhergehenden Studien wurde eine Aktivierung des EP₃-Rezeptors als Ursache der proaggregatorischen Effekte von PGE₂ auf menschliche und murine Thrombozyten identifiziert. Durch die Kopplung an G_i bewirkt EP₃ auf Thrombozyten eine Hemmung der Adenylatcyclase was zu einer Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Dadurch wird die Aktivierungsschwelle der Thrombozyten vermindert (Fabre *et al.* 2001; Ma *et al.* 2001; Gross *et al.* 2007; Heptinstall *et al.* 2008; Iyu *et al.* 2010). Die Rezeptoren EP₂ und EP₄ vermitteln eine inhibitorische

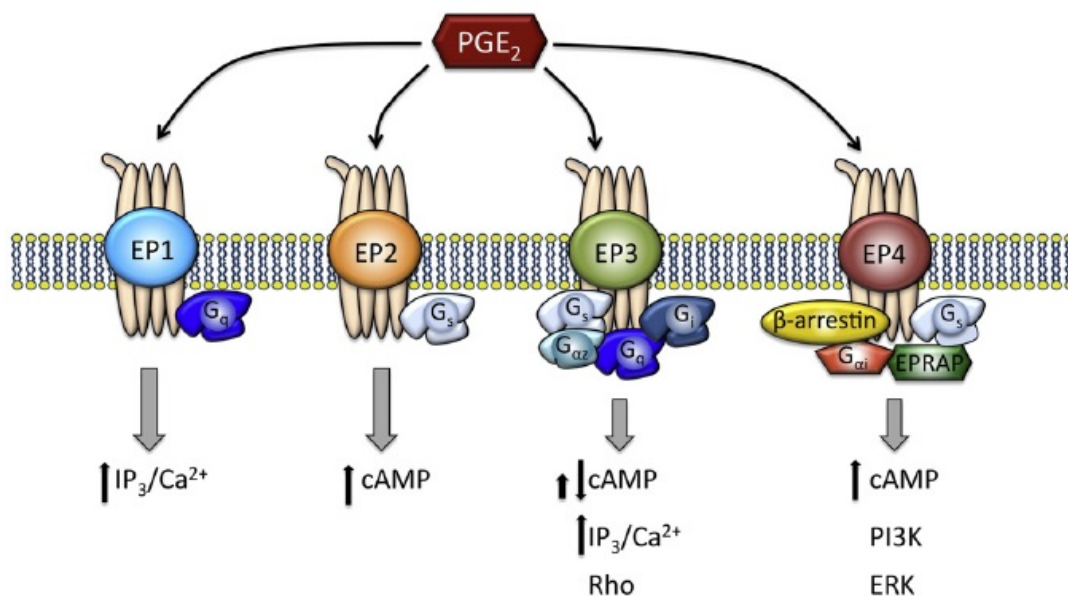


Abb. 1: EP-Rezeptoren und ihre Signalwege. G: heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein, IP₃: Inositoltrisphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, ERK: *Extracellular-signal Regulated Kinase*. Originalabbildung aus Friedman *et al.* 2015.

Wirkung auf die Thrombozyten (Iyu *et al.* 2010; Kuriyama *et al.* 2010; Philipose *et al.* 2010; Smith *et al.* 2010), wobei menschliche Thrombozyten deutlich mehr EP₄-mRNA als EP₂-mRNA enthalten (Paul *et al.* 1998). Beide Rezeptoren führen (wie auch der IP-Rezeptor für Prostacyclin) via Kopplung zu G_s und anschließender Stimulation der Adenylatcyclase zu einer Steigerung der zytosolischen cAMP-Konzentration und bewirken dadurch eine Hemmung der Plättchen (Narumiya *et al.* 1999; Breyer *et al.* 2001; Sugimoto and Narumiya 2007).

Die Gesamtwirkung von PGE₂ auf die menschliche Thrombozytenfunktion wäre somit das Ergebnis einer Balance zwischen proaggregatorischen (via EP₃) und inhibierenden Effekten (v.a. via EP₄). Eine Hemmung von EP₃ bzw. Aktivierung von EP₄ könnte einen neuen Ansatz in der antithrombozytären Therapie darstellen.

Gross *et al.* stellten die Schlüsselrolle von PGE₂ und EP₃ in der Atherothrombose heraus. Mithilfe von EP₃-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch inflammatorische Zellen in murinen atherosklerotischen Plaques gebildetes PGE₂ eine potenzierende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation ausübt und diese potenzierende Wirkung durch den EP₃-Rezeptor vermittelt wird. Die pathophysiologische Relevanz dieser Ergebnisse zeigte sich in einem Modell, in dem die Ruptur muriner atherosklerotischer Plaques durch intraluminale Drahtverletzung induziert wurde: Es wurde eine deutlich verminderte Thrombusbildung in den EP₃^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *wild typ*-Mäusen beobachtet. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass nach Plaqueruptur freigesetztes PGE₂ bei der Atherothrombose via Stimulation von thrombozytärem EP₃ beteiligt ist (Gross *et al.* 2007). Eine Blockade des potenzierenden EP₃-Rezeptors (z.B. mit dem oral verfügbaren EP₃-Rezeptor-Antagonisten DG-041) könnte daher einen vielversprechenden spezifischen Ansatz in der antithrombotischen Therapie ohne die Nebenwirkungen eines erhöhten Blutungsrisikos darstellen (Heptinstall *et al.* 2008; Singh *et al.* 2010).

2 Fragestellung

Prinzipiell könnte PGE₂ in atherosklerotischen Plaques entweder Thrombozyten aktivieren (über die Aktivierung des EP₃-Rezeptors) oder inhibieren (über Aktivierung der EP₂- und EP₄-Rezeptoren). Die Wirkung von PGE₂ dürfte dabei abhängig von der Zahl und den Affinitäten dieser EP-Rezeptoren auf Thrombozyten und der Menge an PGE₂ sein, welche in atherosklerotischen Läsionen vorhanden ist. Die Expression (Rezeptorenzahl pro Thrombozyt) und Affinitäten der unterschiedlichen thrombozytären EP-Rezeptoren für PGE₂, sowie der Gehalt von PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques sind nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden folgende Fragen behandelt: Welchen Einfluss hat PGE₂ auf die Thrombozytenfunktion im Blut? Welche physiologischen und pathophysiologischen Funktionen haben EP₃- und EP₄-Rezeptoren auf Plättchen? Wie hoch ist die Menge von PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques? Kann PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques die Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur eventuell beeinflussen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Chemikalien

Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ADP	Biopool, Wicklow, Ireland
Albumin, bovin, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citrat, Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citrat, Trinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagenreagens	Horm, Nycomed Pharma, Unterschleissheim
Luziferin/Luziferase-Reagenz	Chrono-Lume, Chronolog, Endingen
Mepacrin (Quinacrindihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ONO-AE3-208	EP ₄ -Rezeptor-Antagonist, ONO Pharmaceuticals, Osaka, Japan
ONO-AE3-240	EP ₃ -Rezeptor-Antagonist, ONO Pharmaceuticals, Osaka, Japan
ONO-AE5-599	EP ₃ -Rezeptor-Antagonist, ONO Pharmaceuticals, Osaka, Japan
Prostaglandin E ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Refludan	rekombinantes Hirudin (Lepirudin), Pharmion Ltd., Marburg
Sulprostone	EP ₃ -Rezeptor-Agonist, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
U46619	PGH ₂ -Analogon, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

Puffer und Lösungen

Albumin-PBS-Lösung	0,1% oder 0,3% Albumin (fettsäurefrei) gelöst in PBS-Puffer
--------------------	---

Citratlösung	3,13% Trinatriumcitratdihydratlösung (finale Citratkonzentration im Blut: 0,313%)
HEPES-Puffer	10 mM HEPES gelöst in H ₂ O
Hirudin-Aspirin-Lösung	10 mM ASS, 2000 U/ml rekombinan- tes Hirudin gelöst in HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O, 138 mM NaCl, 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 (finale Konzentrationen im Blut: 200 U/ml Hi- rudin; 1 mM ASS)
Hirudinlösung	2000 U/ml rekombinantes Hirudin ge- löst in 0,9% NaCl-Lösung (finale Hiru- dinkonzentration im Blut: 200 U/ml)
Homogenisierungspuffer	150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
PBS-Puffer	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O

Monoklonale Antikörper und IgG Isotypkontrollen:

PE-gebundenes anti-CD41a (HIP8)	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gebundenes anti-CD62P (AK-4)	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gebundenes PAC1	BD Biosciences, Heidelberg
PE-gebundenes Mäuse IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gebundenes Mäuse IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-gebundenes Mäuse IgM	BD Biosciences, Heidelberg

Spezifischer Enzym-Immunoassay

PGE ₂ Enzyme Immunoassay Kit	Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA
---	---

Geräte:

Aggregometer	2-Kanal-LABOR-Aggregometer, Fresenius AG, Bad Homburg Lumi-Aggregometer „ <i>Platelet Ionized Calcium Aggregometer (PICA)</i> “, Chronolog, Havertown, PA
Flusskammern und Pumpe	T-BIO-FLUX 200, Fluxion, San Francisco, CA, USA
Impedanzaggregometer	Multiplate („ <i>multiple platelet function analyzer</i> “), Dynabyte Medical, München
Mikroskop	Nikon TE2000E-PFS, Tokyo, Japan
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Videokamera	CCD Kamera, CoolSNAP HQ2, Tuscon AZ, USA
Vortexer	REAX top, Heidolph, Kehlheim
Zentrifugen	Biofuge pico, Omnifuge 2.0 RS und Megafuge 1.0 RS, Heraeus Sepatech, Osterode
Zwei-Kanal-Linien-Schreiber	Servogor 102, Hinkel Elektronik, Pirmasens-Winzeln

3.2 Methoden

3.2.1 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte bei gesunden Probanden, die jeweils über die möglichen Risiken aufgeklärt wurden und entsprechend dem Protokoll von Helsinki ihr Einverständnis erklärten. Die Probanden verneinten eine Medikamenteneinnahme innerhalb der letzten 2 Wochen. Es erfolgte die Entnahme von peripher-venösem Blut aus der *Vena cubitalis* mittels einer 19-G-Butterflykanüle und einer Polypropylenspritze, in die zuvor je nach Versuchsansatz unterschiedliche Antikoagulantien vorgelegt wurden (Hirudinblut: 1/10 Volumen Hirudinlösung, finale Hirudinkonzentration im Blut: 200 U/ml bzw. 13 µg/ml; Citratblut: 1/10 Volumen Citratlösung, finale Citratkonzentra-

tion im Blut: 0,313%; Hirudin-ASS-Blut: 1/10 Volumen Hirudinlösung plus 10 mM ASS, finale Konzentrationen im Blut: 200 U/ml Hirudin, 1 mM ASS). Um Verunreinigungen des abgenommenen Blutes mit Gewebsthromboplastin und daraus gebildetem Thrombin zu minimieren, wurden die ersten 3 ml Blut in einer separaten Spritze abgenommen und verworfen. Alle Messungen wurden innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten bis 3 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt.

3.2.2 Präparation von humanem plättchenreichem Plasma

Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) wurde das antikoagulierte Blut für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 160 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das PRP vorsichtig aus dem Überstand abgenommen. Die Blutplättchenzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alle Messungen wurden innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten bis 3 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt.

3.2.3 Präparation von humanen atherosklerotischen Plauehomogenaten

Atherosklerotisches Plauematerial wurde gefäßchirurgisch mittels Thrombendarteriektomie von Patienten, die an einer Karotisstenose litten, entnommen. Das Einverständnis der Patienten und die Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München lagen vor der Durchführung des Eingriffs vor. Bei der Operation wurde darauf geachtet, dass weder Media noch Adventitia oder gesunde Intima zusammen mit dem Plauematerial aus der Gefäßwand entfernt wurde, die Struktur des gewonnenen Plauematerials blieb somit *en bloc* erhalten. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach Entnahme noch im Operationssaal mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden nach vorsichtigem Auftauen auf Eis die lipidreichen Regionen mithilfe eines Skalpell exzidiert, das gewonnene Plauematerial abgewogen, zerkleinert und mithilfe eines Glaspotters und eines zylindrischen Glaspistills in Homogenisierungspuffer (4°C) homogenisiert. Die Plauekonzentration wurde auf 100 mg Feuchtgewicht/ml eingestellt. Für fast alle Experimente wurden Plauepools benutzt, um eventuell unterschiedliche PGE₂-Gehalte der atherosklerotischen Plaues der verschiedenen Patienten auszugleichen. Hierfür wurden Plauehomogenatsuspensionen von 5-7 Patienten in einem Plauepool vereint. Die Plauesuspensionen wurden in 500 µl-Portionen aliquotiert

und bei -80°C gelagert. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen des Plauegewebes sowie der Plauehomogenate wurden vermieden. Einige Experimente wurden mit frischem Plauematerial durchgeföhrt. Hierbei wurde das Plauegewebe direkt nach der gefäßchirurgischen Entnahme weiterverarbeitet und die Versuche bei kontinuierlicher Lagerung der Plauehomogenate bei 4°C innerhalb der folgenden 2 Stunden durchgeföhrt.

3.2.4 Impedanzaggregometrie

Zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut wurde die Multiple-Analyse (MEA, *multiple electrode aggregometry*) eingesetzt (Toth *et al.* 2006). Diese Methode misst die Erhöhung des elektrischen Widerstandes (Impedanz) die entsteht, wenn aktivierte Thrombozyten an der Oberfläche zweier voneinander unabhängiger Elektrodenpaare (Kathode und Anode) in einer Testküvette adhären und aggregieren. Zur Analyse wurde $300\ \mu\text{l}$ Hirudin- oder Citrat-antikoaguliertes Blut 1:1 mit NaCl 0,9% vermischt und bei 37°C mittels eines magnetischen Rührstabes geröhrt (800 rpm) und für 3 Minuten mit oder ohne Hemmsubstanzen vorinkubiert. Anschließend wurden verschiedene Thrombozytenagonisten (ADP, Sulprostone, U46619, Kollagen, atherosklerotisches Plauematerial) zugegeben und die Erhöhung der elektrischen Impedanz kontinuierlich über 5 Minuten gemessen. Die Mittelwerte der 2 unabhängigen Messungen in jeder einzelnen Messeinheit werden als *aggregation units* (AU) angegeben und die *area under the curve* (AUC) bestimmt, die ein Maß für die Aggregation bezogen auf die Zeit (AU*min) darstellt.

3.2.5 Messung der Aggregation im Aggregometer

Mithilfe eines 2-Kanal-LABOR-Aggregometers sowie eines Lumi-Aggregometers wurde der thrombozytäre Gestaltwandel (*shape change*) und die unmittelbar darauffolgende Thrombozytenaggregation im PRP bestimmt. Es handelt sich um eine Methode, die die Lichttransmission von geröhrttem PRP misst. Nach Zugabe eines Thrombozytenagonisten kommt es zur Sphärisierung der initial diskoiden Blutplättchen und dadurch zu einer Minderung der Lichttransmission und zur Abnahme der Oszillationen. Durch Aggregation der Blutplättchen nimmt die Anzahl der korpuskulären Bestandteile der Suspension ab und die Lichttransmission zu. Einweg-Aggregationsküvetten wurden mit $400\ \mu\text{l}$ PRP befüllt und nach einer dreiminütigen Vorinkubation bei 37°C mit oder ohne entsprechende Hemmsubstanzen in den

Strahlengang der Aggregometer überführt. Unter kontinuierlichem Rühren (1000 rpm) erfolgte die Zugabe verschiedener Thrombozytenstimuli und die Sphärisierung bzw. die Aggregation der Plättchen wurde mittels eines 2-Kanal-Linien-Schreibers fortlaufend aufgezeichnet. Die Quantifizierung des *shape change* oder der Aggregation erfolgte durch das Ausmessen der Abweichung der Lichttransmission von der Basallinie in mm. Die maximale Zunahme der Lichttransmission bei Stimulation mit Kollagen (0,5 µg/ml) wurde als 100% Aggregation definiert und die weiteren Messwerte dazu in Relation gesetzt.

3.2.6 Messung der ATP-Sekretion

Die Messung der ATP-Sekretion während der Thrombozytenaktivierung wurde in einem Lumi-Aggregometer (*Platelet Ionized Calcium Aggregometer*, PICA) bestimmt. Hierfür wurden Blutproben 1:1 mit NaCl 0,9% vermischt (400 µl) und für 3 Minuten mit oder ohne Hemmsubstanzen unter kontinuierlichem Rühren (1000 rpm) in der Messküvette vorinkubiert. Nach der Zugabe von Luziferin-Luziferase-Reagenz (50 µl von 17,6 U/ml) und Plaquehomogenat als Thrombozytenagonist wurde die Lumineszenz mit dem Lumi-Aggregometer gemessen.

3.2.7 Analyse der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Die Experimente unter arteriellen Flussbedingungen wurden mithilfe des T-BIO-FLUX 200 Systems (Fluxion, San Francisco, CA, USA) und Mikrofluid-Versuchsplatten für hohe Scherraten (*High Shear Plates*, 48 wells, bis zu 200 dyne/cm²) (**Abb. 2**) durchgeführt. Die Kanäle (*channels*) wurden hierfür mit 20 µl Plaquehomogenat (5 mg Feuchtwicht/ml in 0,1% Albumin-PBS-Lösung) ausgehend vom *outlet well* befüllt, sodass die Oberfläche des jeweiligen Sichtfensters (1050 µm x 370 µm x 70 µm) mit atheromatösem Plaquematerial beschichtet war. Es wurde streng darauf geachtet, dass nur das Sichtfenster und keinesfalls der *inlet channel* mit Plaquematerial in Berührung kam. Die mit Plaque beschichteten Versuchsplatten wurden für ca. 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die *High Shear Plates* auf den Objektisch eines aufrechten Mikroskops (Nikon TE2000E-PFS, Tokyo, Japan) montiert und vor Beginn eines jeden Experiments mit Albumin-PBS-Lösung (0,3%) für 10 Minuten mit einer Scherrate von 500 s⁻¹ perfundiert. Danach wurde der

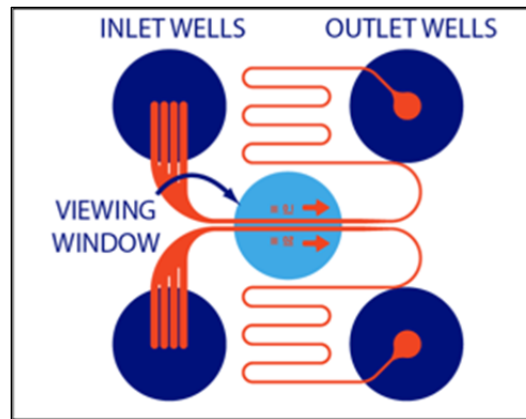


Abb. 2: Schematischer Aufbau der High Shear BioFlux Plates (Fluxion Biosciences).

inlet well mit antikoaguliertem Blut (Hirudin oder Hirudin-ASS) befüllt, und das Blut mit einer Scherrate von 1500 s^{-1} für bis zu 10 Minuten perfundiert. Unmittelbar vor Beginn der Perfusion wurde dem antikoagulierten Blut der Fluoreszenzfarbstoff Me-pacrin ($10 \mu\text{M}$) zugesetzt, sodass die Thrombozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm mithilfe eines $40 \times$ Objektivs visualisiert werden konnten. Das Hirudin-antikoagulierte Blut wurde mit dem EP_3 -Antagonisten AE5-599 (300 oder 600 nM) oder NaCl 0,9% (Kontrolle) versetzt und für 2 Minuten bei 37°C vor den Experimenten inkubiert. Für die Experimente mit Acetylsalicylsäure wurde das Hirudinblut bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt. Alle Flussexperimente wurden bei 37°C durchgeführt. Die Visualisierung der Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung an das exponierte Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen erfolgte mithilfe von Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit. Mit dem EP_3 -Antagonisten AE5-599 versetztes Blut und Kontrollblut wurden simultan in zwei parallelen Flusskammern beobachtet und die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen aufgezeichnet (CCD-Videokamera, CoolSNAP HQ2, Tuscon AZ, USA). Zur quantitativen Auswertung der adhärenenten und aggregierten Thrombozyten wurde jeweils ein Feld von $237\,900 \mu\text{m}^2$ (lokalisiert im mittleren Teil des Sichtfensters) 5 Minuten nach Beginn der Perfusion gespeichert und *off-stage* analysiert. Die Fläche der an das Plaquematerial adhärenenten und aggregierten Thrombozyten wurde anhand der Auswertung der Fluoreszenzbilder mithilfe der Software *NIS-element 3.1* (Nikon) ermittelt.

3.2.8 Quantifizierung des Gehalts von PGE₂ in humanen atherosklerotischen Plaques

Für die Bestimmung des Gehalts von PGE₂ in humanen atherosklerotischen Plaques wurde das Plaquematerial extrahiert. Hierfür wurden 0,5 ml des Plauehomogenats (10 mg Feuchtgewicht/ml in 150 mM NaCl und 20 mM HEPES Puffer, pH 7,4) oder 0,5 ml Pufferlösung (150 mM NaCl, 20 mM HEPES Puffer, pH 7,4; Kontrolle) mit 1 N-HCl auf einen pH von 3,5 angesäuert, auf eine C₁₈-Umkehrphasen-Kartusche gebracht und die Prostaglandinfraktion mittels Essigsäureethylester (10 ml) eluiert. In einigen Messungen wurde den Plauehomogenaten bzw. den Kontrollen (Pufferlösung) definierte Mengen von Prostaglandin E₂ zugesetzt, um die *recovery* zu messen. Die Quantifizierung von Prostaglandin E₂ erfolgte mithilfe eines spezifischen Enzym-Immunoassays (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Dieser Assay verwendet einen monoklonalen Anti-PGE₂-Antikörper, der an alkalische Phosphatase kovalent gebundenes PGE₂ bindet, welches mit in der Messprobe oder Standardlösung vorhandenem PGE₂ konkurriert (Tijssen 1985; Chard 1990). Um die Spezifität der Messergebnisse zu verifizieren, erfolgte in einigen Proben mittels Zugabe von 0,1 N-NaOH eine Konversion des in der Prostaglandin-Fraktion enthaltenen PGE₂ zu PGB₂ (Siess 1976).

3.2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) aus n Experimenten mit Blut von unterschiedlichen Spendern angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels *student's t-test* oder *signed rank test* ermittelt. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$ war.

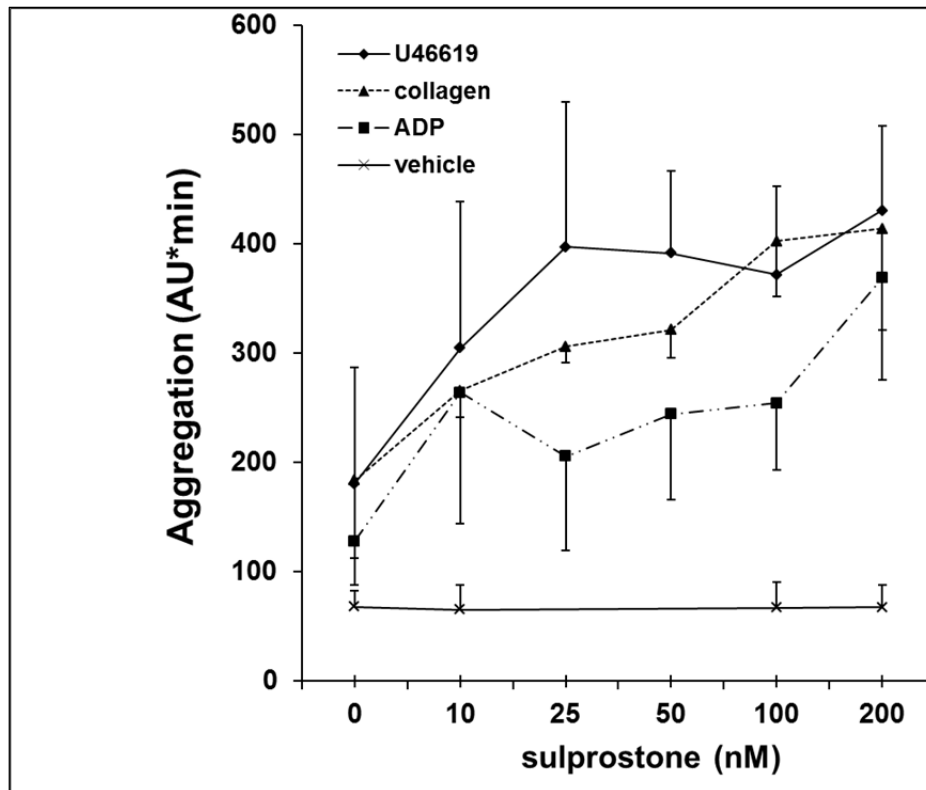
4 Ergebnisse

4.1 Wirkung des EP₃-Agonisten Sulprostone und von PGE₂ auf die Thrombozytenfunktion

Die Wirkungen des EP₃-Agonisten Sulprostone und von PGE₂ auf die Thrombozytenaggregation in mit Hirudin oder Citrat antikoaguliertem humanen Blut wurden mithilfe der Impedanzaggregometrie (MEA, *multiple electrode aggregometry*) (Toth *et al.* 2006) verglichen. Es wurde zunächst die Dosis-Wirkungs-Kurve von Sulprostone in Kombination mit verschiedenen physiologisch und pathophysiologisch relevanten Thrombozytenstimuli ermittelt (**Abb. 3A**). Sulprostone allein hatte keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation. Es zeigte jedoch zusammen mit niedrigen Konzentrationen des Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonisten U46619 (0,15-0,2 µM), Kollagen (0,2 µg/ml) und ADP (0,5 µM) eine Potenzierung der Plättchenaggregation. Statistisch signifikant waren die Kombinationen von U46619 mit Sulprostone (25 nM, 50 nM, 100 nM: $p < 0,05$; 200 nM: $p < 0,01$) und von Kollagen mit Sulprostone (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM: $p < 0,05$) im Vergleich zu U46619 und Kollagen allein. Der synergistische Effekt von Sulprostone mit ADP war weniger ausgeprägt, verglichen mit den beiden vorherigen Agonisten. Ein statistisch signifikantes Ergebnis ließ sich hier nur mit den höheren Konzentrationen von Sulprostone erzielen (50 nM, 100 nM: $p < 0,05$; 200 nM: $p < 0,01$). Die Wirkung von Sulprostone war somit abhängig von der Konzentration: Die niedrigste effektive Konzentration betrug 25 nM.

Im nächsten Versuchsansatz wurde der Effekt von PGE₂ auf die Thrombozytenaggregation in Kombination mit den gleichen Agonisten untersucht. In vorhergehenden Studien wurde ein biphasischer Effekt von PGE₂ auf Thrombozyten in PRP gefunden: Niedrige PGE₂-Konzentrationen bewirkten eine verstärkte Aggregation, während höhere PGE₂-Konzentrationen die Plättchenaggregation hemmten (Salzman *et al.* 1972; Gray and Heptinstall 1985; Fabre *et al.* 2001). In Experimenten mit PRP (mit Hirudin oder Citrat antikoaguliert) bestätigte sich, dass PGE₂ (0,1-1 µM) einen potenzierenden Effekt auf die Kollagen-induzierte Plättchensekretion und -aggregation aufwies (**Tab. 1**) und die ADP-induzierte reversible Aggregation in eine irreversible Antwort verwandelte.

A



B

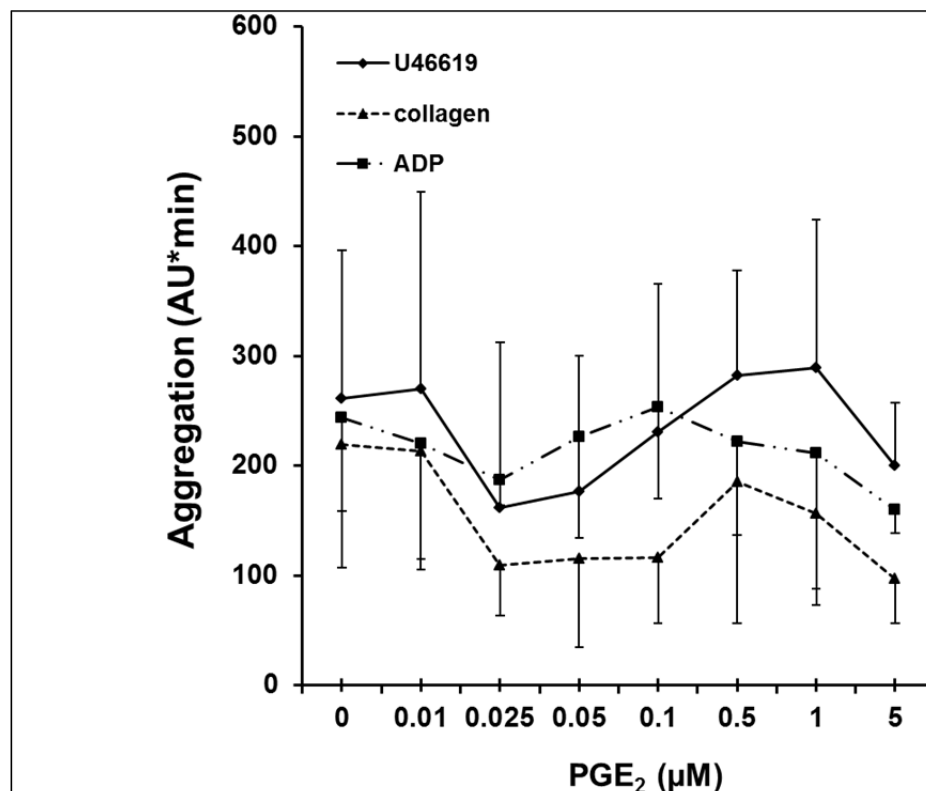


Abb. 3: Effekt von steigenden Konzentrationen des EP₃-Agonisten Sulprostone (A) und von PGE₂ (B) auf die durch U46619, Kollagen und ADP induzierte Thrombozytenaggregation in Hirudinblut. Die Messwerte sind Mittelwerte ± SD ($n = 3-8$ mit unterschiedlichen Blutspendern).

Tab. 1: Effekt von PGE₂ auf die durch Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation in PRP.

PGE ₂ (µM)	0	0,1	0,5	1
Aggregation (% der Kollagenkontrolle)	100	148 ± 5	162 ± 36	136 ± 4

Citrat- oder Hirudin-antikoaguliertes PRP wurde für 3 Minuten bei 37°C mit PGE₂ (0,1–1 µM) oder NaCl 0,9% vorinkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde mit Kollagen (0,5 µg/ml) stimuliert und nach 3 Minuten die Abweichung der Lichttransmission von der Basallinie in mm gemessen. Die Kollagen-induzierte Zunahme der Lichttransmission wurde als 100% Aggregation definiert und die weiteren Messwerte dazu in Relation gesetzt. Die Messwerte sind Mittelwerte ± SD (*n* = 3 mit unterschiedlichen Blutspendern).

Die Versuche zur Wirkung von PGE₂ auf die Thrombozytenaggregation im Blut wurden in einem sehr weiten Konzentrationsbereich (10 nM–5 µM) durchgeführt. In mit Hirudin antikoaguliertem Blut zeigte PGE₂ keinen Synergismus mit U46619 (0,1–0,2 µM), ADP (0,4–1 µM) oder Kollagen (0,1–0,25 µg/ml) (**Abb. 3B**); es wirkte eher hemmend (nicht signifikant). PGE₂ allein hatte keinen Effekt auf die Plättchenaggregation.

Experimente mit Citratblut lieferten ähnliche Ergebnisse (**Tab. 2**). Auch in mit Citrat-antikoaguliertem Blut zeigte PGE₂ keinen potenzierenden Effekt auf die durch ADP (1 µM) und U46619 (0,1–0,2 µM) induzierte Thrombozytenaggregation, es bewirkte eher eine Hemmung.

Tab. 2: Effekt von PGE₂ auf die durch ADP und U46619 induzierte Thrombozytenaggregation in Citratblut.

PGE ₂ (µM)	0	0,1	0,5	1
ADP (AU*min)	172 ± 25	161 ± 25	140 ± 19	159 ± 50
U46619 (AU*min)	168 ± 44	133 ± 40	130 ± 32	118 ± 31

Die Messwerte sind Mittelwerte ± SD (*n* = 3–4 mit unterschiedlichen Blutspendern).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass PGE₂ in mit Citrat oder Hirudin antikoaguliertem humanem Blut, im Gegensatz zu einem selektiven EP₃-Agonisten, keinen potenzierenden Effekt auf submaximal stimulierte Thrombozyten ausübt.

4.2 Wirkung von PGE₂ in humanen atherosklerotischen Plaques auf die Thrombozytenfunktion

4.2.1 Effekte der EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240

4.2.1.1 Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 hemmen die Potenzierung der Thrombozytenaggregation durch Sulprostone

Im Folgenden wurde der inhibitorische Effekt der EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die Potenzierung der U46619-induzierten Thrombozytenaggregation durch Sulprostone untersucht (**Abb. 4**). Der Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonist U46619 wurde als Stimulus ausgewählt, weil hier Sulprostone die deutlichste Potenzierung der Aggregation zeigte (**Abb. 3A**).

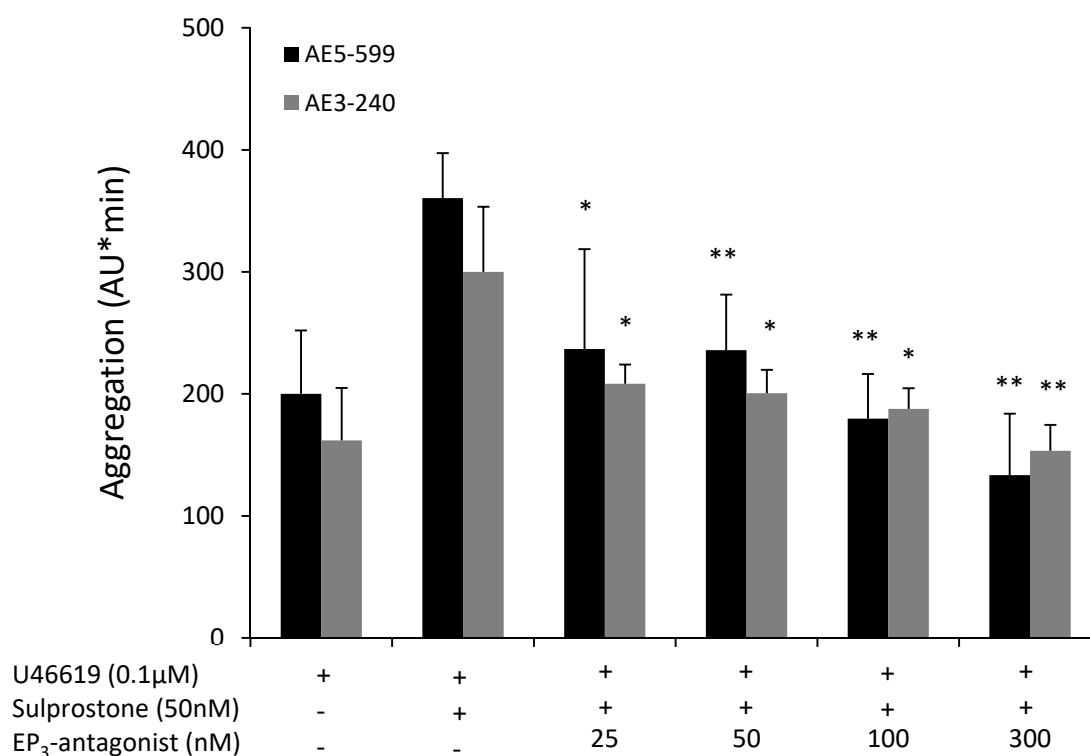


Abb. 4: Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 inhibieren den synergistischen Effekt von Sulprostone auf die U46619-induzierte Thrombozytenaggregation in humanem Blut. Die Blutproben wurden mit AE5-599 (schwarz) oder AE3-240 (grau) versetzt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Plättchenaggregation wurde durch U46619 (0,1 µM) allein oder in Kombination mit Sulprostone (50 nM) induziert. (*n* = 3-5). * *p* < 0,05; ***p* < 0,01 vs. U46619 + Sulprostone.

Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger hemmender Effekt der beiden EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die durch Sulprostone hervorgerufene Potenzierung der U46619-induzierten Plättchenaggregation, der für alle getesteten Konzentrationen der EP₃-Antagonisten (25-300 nM) signifikant war.

4.2.1.2 Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 hemmen nicht die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion

In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung der EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion induziert durch humanes atherosklerotisches Plaquematerial untersucht (**Abb. 5**). Es wurde die Hypothese geprüft, ob das im Plaque enthaltene PGE₂ über den EP₃-Rezeptor potenzierend auf die durch Plaque-Kollagene induzierte Thrombozytenaggregation und -sekretion (Penz *et al.* 2005) wirken könnte. Durch eine Blockierung dieses Rezeptors mithilfe der spezifischen EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 sollte dann eine geringere und/oder verzögerte Aggregation und Sekretion der Plättchen zu beobachten sein. Diese Hypothese bestätigte sich in den Versuchen jedoch nicht: Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240, eingesetzt in maximalen Konzentrationen (300 nM und 600 nM), bewirkten keine Verminderung der durch atherosklerotische Plaquehomogenate induzierten Thrombozytenaggregation (**Abb. 5A, B**). Um die Möglichkeit eines eventuell unterschiedlichen PGE₂ Gehalts in den atherosklerotischen Plaques der verschiedenen Patienten auszuschließen, wurden gepoolte Plaques benutzt (3 verschiedene Präparationen), die jeweils Plaquematerial von 5-7 verschiedenen Patienten enthielten.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung der beiden EP₃-Antagonisten auf die Sekretion von ATP aus den dichten Granula nach Thrombozytenaktivierung mit atherosklerotischen Plaquehomogenaten untersucht. (**Abb. 5C**). Es zeigte sich auch hier keine Reduktion der Sekretion nach Präinkubation des Blutes mit den beiden EP₃-Antagonisten.

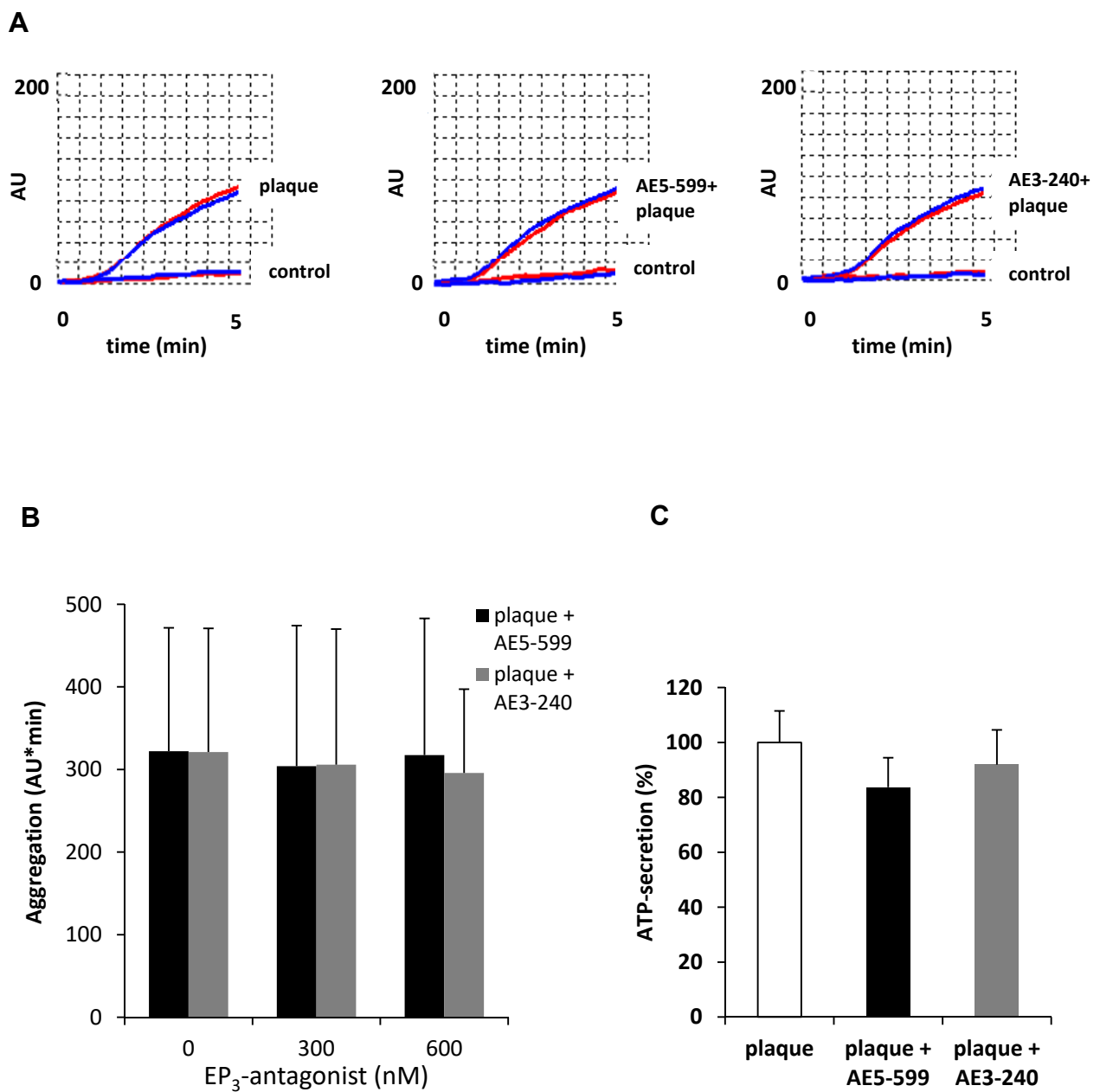


Abb. 5: Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 inhibieren nicht die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion im Blut. Die Blutproben wurden mit 300 nM oder 600 nM AE5-599 (schwarz) oder AE3-240 (grau) versetzt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Thrombozytenaggregation und -sekretion wurde mit atheromatösen Plaqueshomogenaten (0,42 mg/ml bzw. 0,62 mg/ml) stimuliert.

A Repräsentative Aggregationskurven.

B Bardiagramm der Aggregationsversuche ($n = 10$).

C Bardiagramm der Sekretionsversuche ($n = 3$).

Um die Möglichkeit einer Inaktivierung von PGE₂ während des Einfriervorgangs und der Lagerung der Plauehomogenate auszuschließen, wurden weitere Experimente mit frischem Plauematerial durchgeführt (**Abb. 6**). Hierbei wurde das Plauegewebe direkt nach der gefäßchirurgischen Entnahme weiterverarbeitet und die Versuche bei kontinuierlicher Lagerung der Plauehomogenate bei 4°C innerhalb der folgenden 2 Stunden durchgeführt. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der proaggregatorischen Fähigkeit zwischen frischem und zuvor tiefgefrorenem Plauematerial. Auch die Ergebnisse dieser Experimente mit den EP₃-Antagonisten (300 nM und 600 nM) lieferten ähnliche Aussagen: Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 zeigten keinen Effekt auf die durch Plauehomogenat induzierte Thrombozytenaggregation in humanem Blut (**Abb. 6**).

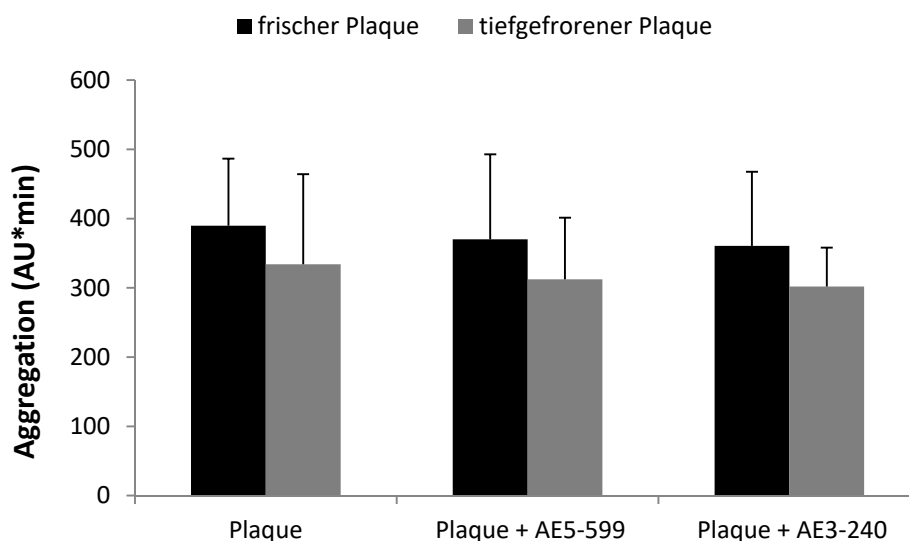


Abb. 6: Kein Effekt der EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die durch frische oder zuvor tiefgefrorene Plauehomogenate induzierte Thrombozytenaggregation. Die mit Hirudin oder Citrat antikoagulierten Blutproben wurden mit 300-600 nM AE5-599 oder AE3-240 bzw. NaCl 0,9% versetzt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Plättchenaggregation wurde durch frische (schwarz) oder zuvor tiefgefrorene (grau) atheromatöse Plauehomogenate (0,42 mg/ml) stimuliert. Die Messwerte sind Mittelwerte ± SD ($n = 3$ mit unterschiedlichen Plaues und Blutspendern).

4.2.1.3 Wirkungen der EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 auf die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenadhäsion und Plättchenthrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

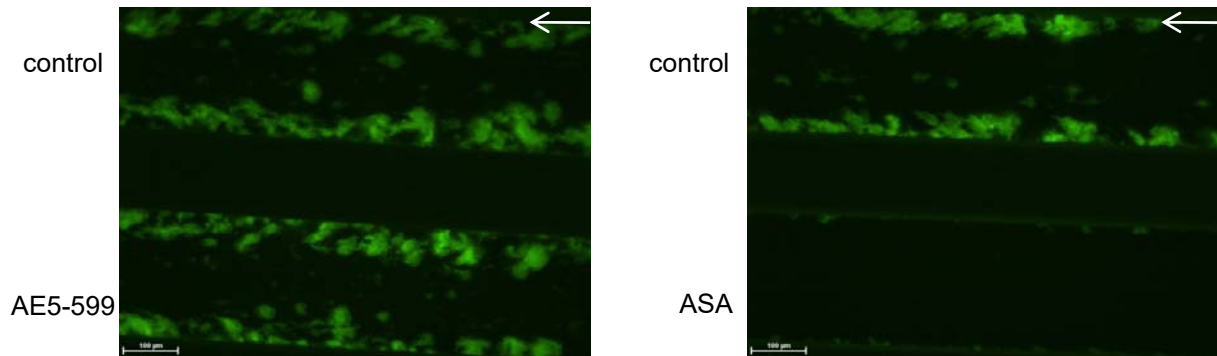
Um der in vivo-Situation nach Ruptur einer atherosklerotischen Läsion möglichst nahe zu kommen, wurde der Effekt der EP₃-Antagonisten auf die Plaque-induzierte Plättchenthrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen untersucht (**Abb. 7**, Video-CD im Anhang). Die Scherrate von 1500 s⁻¹ entspricht der Scherrate in moderat stenosierten Koronararterien (Ruggeri 2002). Die Blutproben wurden durch mit atherosklerotischem Plaquematerial beschichtete Mikrofluid-Kanäle perfundiert und für bis zu 10 Minuten beobachtet. Es konnte eine rasche Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung (grün fluoreszierend) hauptsächlich an den Rändern des jeweiligen Kanals beobachtet werden. Mittels Phasenkontrastmikroskopie vor Beginn der Flussexperimente wurde festgestellt, dass an diesen Stellen das meiste Plaquematerial lokalisiert war. Der EP₃-Antagonist AE5-599 zeigte keinen Effekt auf die Plättchenthrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen. Dagegen hemmte Acetylsalicylsäure effektiv die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung.

4.2.2 Wirkung des EP₄-Antagonisten AE3-208

4.2.2.1 Der EP₄-Antagonist AE3-208 bewirkt eine Potenzierung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation durch PGE₂

Die Rolle des inhibitorischen EP₄-Rezeptors auf Thrombozyten wurde mithilfe des EP₄-Antagonisten AE3-208 untersucht (**Abb. 8**). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Plättchenaggregation durch den EP₄-Antagonisten AE3-208 (1-3 µM), wenn ADP-aktivierte Thrombozyten in Kombination mit PGE₂ (1 µM) stimuliert wurden. (**Abb. 8A**). AE3-208 alleine (ohne PGE₂) hatte keinen Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregation. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass PGE₂ die Thrombozytenaggregation im Blut verstärkt, wenn der hemmende EP₄-Rezeptor blockiert wird.

A



B

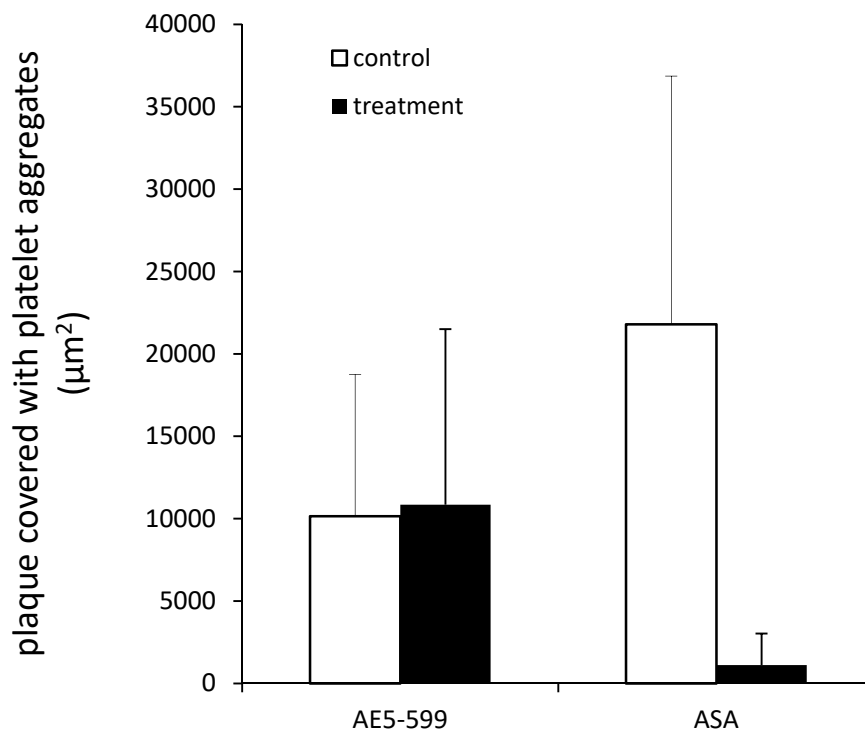
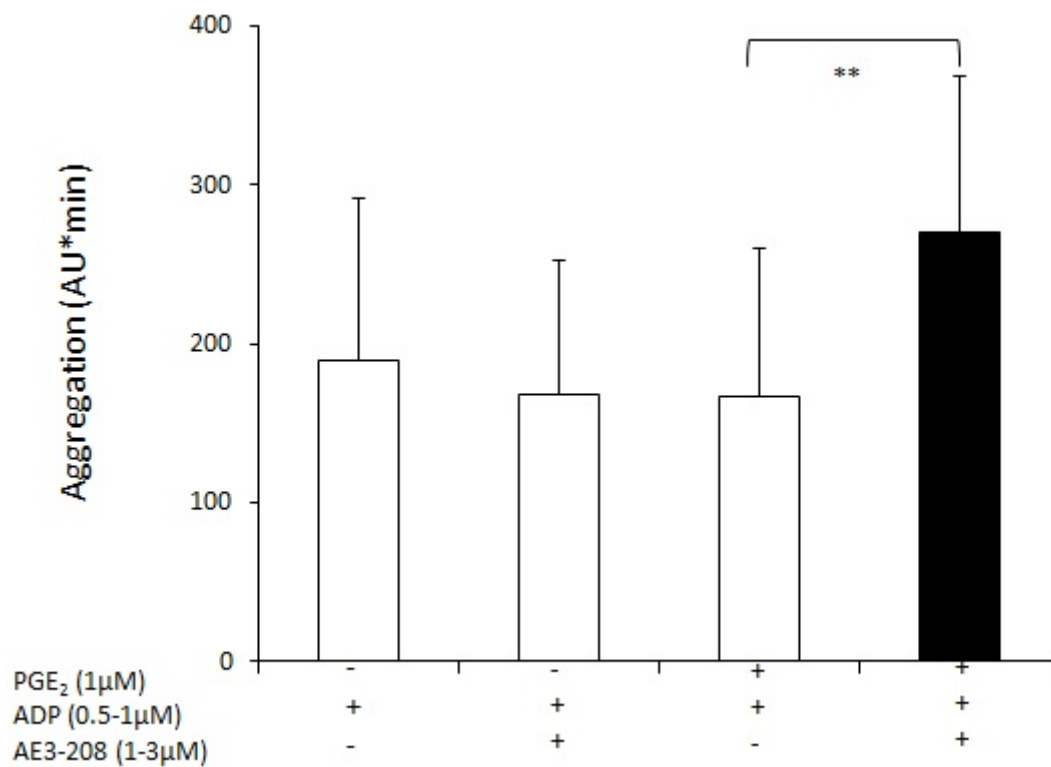


Abb. 7: Der EP₃-Antagonist AE5-599 inhibiert nicht die Plättchenadhäsion und Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen. Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde mit Mepacrin (10 µM) versetzt und mit einer Scherrate von 1500 s⁻¹ für 5 Minuten bei 37°C durch Plaque-beschichtete Mikrofluid-Kanäle perfundiert. Das Blut wurde zuvor mit AE5-599 (300 oder 600 nM) oder NaCl 0,9% für 2 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Für die Experimente mit Acetylsalicylsäure wurde das Blut bereits bei Abnahme zusätzlich mit ASS (ASA 1 mM) versetzt. Die Thrombozyten wurden mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

A Repräsentative Flussbilder 5 Minuten nach Beginn der Perfusion. Längenmaß: 100 µm, der Pfeil markiert die Flussrichtung. **B** Bardiagramm. Die Fläche von mit adhärenen und aggregierten Thrombozyten bedecktem Plaquematerial wurden 5 Minuten nach Beginn der Perfusion ausgewertet. ($n = 3-5$).

A



B

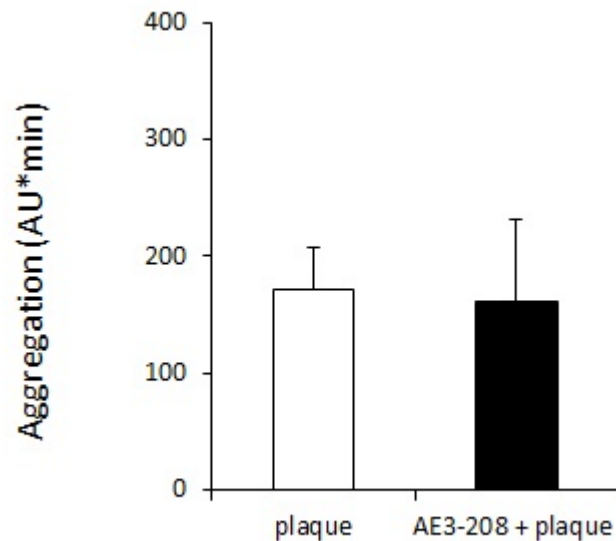


Abb. 8: Der EP₄-Antagonist AE3-208 potenziert die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Kombination mit PGE₂, zeigt jedoch keine Erhöhung der Plaque-induzierten Aggregatbildung. Effekt des EP₄-Antagonisten AE3-208 (1-3 µM) auf die Plättchenaggregation, induziert **A** durch ADP (0,5-1 µM) alleine und in Kombination mit PGE₂ (1 µM) und **B** durch Plaquehomogenat (0,42 mg/ml). *n* = 5, ** *p* < 0,01.

4.2.2.2 Der EP₄-Antagonist AE3-208 beeinflusst nicht die durch humane atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaggregation

In weiteren Experimenten wurde die Rolle von PGE₂ in atherosklerotischen Plaques auf den EP₄-Rezeptor der Thrombozyten untersucht, indem der Effekt des EP₄-Antagonisten AE3-208 (1-3 µM) auf die Plaque-induzierte Plättchenaggregation analysiert wurde (**Abb. 8B**). Die Erwartung, bei Blockade des inhibierenden EP₄-Rezeptors eine verstärkte Plättchenaggregation durch das in den atherosklerotischen Plaques vorhandene PGE₂ zu beobachten, wurde nicht bestätigt. Die Zugabe des EP₄-Antagonisten AE3-208 bewirkte keinen signifikanten Unterschied der Plaque-induzierten Aggregatbildung der Thrombozyten.

4.3 Quantifizierung des Gehalts von PGE₂ in humanen atherosklerotischen Plaques

Daten über den Gehalt von PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques existierten bis dato nicht. Aufgrund der fehlenden Wirkungen der EP₃- und EP₄-Rezeptor-Antagonisten in den vorangegangenen Experimenten auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung wurde vermutet, dass die Menge an PGE₂ in atherosklerotischen Plaques zu gering sei, als dass sie eine Wirkung auf Thrombozyten ausüben könnte. Um die im Plaque möglicherweise sehr gering vorhandene Menge an PGE₂ spezifisch messen zu können, wurde das Plaquematerial nach Ansäuerung über eine C₁₈-Umkehrphasen-Säule aufgetrennt, und die Prostaglandinfraktion eluiert. Anschließend wurde mithilfe eines spezifischen Enzym-Immunoassays ein Gehalt von $15 \pm 2,8$ pg PGE₂/mg Plaquesgewebe detektiert ($n = 5$, Verwendung verschiedener Plaques und Plaque-Pools). Für die MEA-Messungen wurde eine Plaque-Konzentration von 0,42 mg Plaque/ml Blut verwendet, dies entspricht einer finalen (sehr geringen) Konzentration von 18 pM PGE₂. Die Spezifität der geringen PGE₂-Konzentrationen, die in den Plaques gefunden wurde, wurde mittels Konversion von PGE₂ zu PGB₂ verifiziert (Siess 1976). Nach der chemischen Konversion wurde kein PGE₂ gemessen.

In weiteren Experimenten wurde die PGE₂-recovery gemessen, nachdem zuvor definierte Mengen von PGE₂ zu der Pufferlösung und zu dem Plaqueshomogenat hinzu-

gefügt worden waren (**Tab. 3**). Die zugegebenen Mengen von PGE₂ zu Pufferlösung und Plauehomogenat wurden fast unverändert gemessen.

Tab. 3: PGE₂-Messungen nach Zugabe von definierten Mengen von PGE₂ zu Pufferlösung und Plauehomogenat.

Sample	PGE ₂ added (pg/ml)	PGE ₂ measured (pg/ml)
Buffer	-	110
Buffer	250	400
Buffer	500	600
Plaue 5 mg/ml	-	156
Plaue 1,25 mg/ml	62	110
Plaue 2,5 mg/ml	125	180
Plaue 5 mg/ml	250	410

PGE₂ wurde zu 1 ml Pufferlösung (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) oder zu Plauehomogenat in Pufferlösung hinzugefügt. PGE₂ wurde nach Elution von einer C₁₈-Umkehrphasen-Säule mittels eines spezifischen Enzym-Immunoassays quantifiziert. Die Messwerte sind jeweils Mittelwerte von Doppelmessungen desselben Experiments.

In folgenden Versuchen wurde PGE₂ (2000 pg/ml) hinzugefügt, bevor der atherosklerotische Plaue homogenisiert wurde. Auch hier wurde das zugegebene PGE₂ fast unverändert gemessen (1900 pg/ml; 1600 pg/ml). Diese Ergebnisse zeigen, dass PGE₂ in Plauehomogenaten stabil ist und nicht durch den Prozess der Homogenisierung verloren geht oder abgebaut wird.

5 Diskussion

Die durchgeführten Experimente behandeln die Frage, ob PGE₂ in humanen atherosklerotischen Plaques die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur beeinflussen kann. PGE₂ in atherosklerotischen Plaques könnte über eine Aktivierung des stimulierenden Rezeptors (EP₃) oder des hemmenden Rezeptors (EP₄) Thrombozyten entweder aktivieren oder inhibieren.

In vorangegangenen Studien verstärkte der EP₃-Agonist Sulprostone in humanen gewaschenen Thrombozyten, plättchenreichem Plasma (PRP) und Blut die Thrombozytenaggregation, die durch unterschiedliche Thrombozytenagonisten initiiert wurde (Matthews and Jones 1993; Vezza *et al.* 1993; Heptinstall *et al.* 2008). Weitere Studien fanden einen potenzierenden Effekt von PGE₂ in PRP auf die Plättchenaggregation und -sekretion, wenn diese durch Kollagen, ADP oder U46619 stimuliert wurden (Salzman *et al.* 1972; MacIntyre and Gordon 1975; Weiss *et al.* 1976; Gray and Heptinstall 1985; Matthews and Jones 1993; Vezza *et al.* 1993; Heptinstall *et al.* 2008). Allerdings zeigte sich in einigen Experimenten eine hohe Variabilität des potenzierenden Effekts von PGE₂ zwischen den einzelnen Blutspendern (Salzman *et al.* 1972; Gray and Heptinstall 1985; Matthews and Jones 1993; Smith *et al.* 2010).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Gruppen konnte hier gezeigt werden, dass der EP₃-Agonist Sulprostone alleine nicht die Thrombozytenaggregation stimulierte, die geringe bis submaximale Aggregation, die durch andere Plättchenstimuli in niedrigen Konzentrationen induziert wurde, jedoch potenzierte. Dafür wurden physiologisch und pathophysiologisch relevante Stimuli verwendet: der Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonist U46619, Kollagen, und ADP. Die Wirkung von Sulprostone war abhängig von dessen Konzentration: die niedrigste effektive Konzentration betrug 25 nM. Die EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 inhibierten konzentrationsabhängig und spezifisch den synergistischen Effekt von Sulprostone auf die Plättchenaggregation.

Im Gegensatz zu Sulprostone zeigte PGE₂ in Versuchen mit Citrat- oder Hirudinblut in einem sehr weiten Konzentrationsbereich keinen Synergismus mit den verwendeten Stimuli; es wirkte in hohen Konzentrationen eher hemmend (nicht signifikant). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass PGE₂ im menschlichen Citrat- oder

Hirudinblut, im Gegensatz zu dem selektiven EP₃-Agonisten Sulprostone, keinen potenzierenden Effekt auf submaximal stimulierte Thrombozyten ausübt.

In zahlreichen Studien wurde ein biphasischer Effekt von PGE₂ auf Thrombozyten gezeigt: Niedrige PGE₂-Konzentrationen bewirkten über den EP₃-Rezeptor eine verstärkte Aggregation submaximal stimulierter Plättchen, während höhere PGE₂-Konzentrationen die Thrombozytenaggregation über den EP₂- und/oder den EP₄-Rezeptor hemmten (Salzman *et al.* 1972; MacIntyre and Gordon 1975; Matthews and Jones 1993; Vezza *et al.* 1993; Fabre *et al.* 2001; Ma *et al.* 2001; Gross *et al.* 2007; Kuriyama *et al.* 2010). Dieser biphasische Effekt ließ sich an murinen Thrombozyten wiederholt nachweisen (Fabre *et al.* 2001; Ma *et al.* 2001; Gross *et al.* 2007; Kuriyama *et al.* 2010), wohingegen Studien mit menschlichen Plättchen uneinheitliche Ergebnisse lieferten (Salzman *et al.* 1972; Gray and Heptinstall 1985; Matthews and Jones 1993; Smith *et al.* 2010). Die Studien mit menschlichen Thrombozyten wurden mit gewaschenen Thrombozyten oder PRP durchgeführt. Die hier durchgeführten Untersuchungen der Wirkung von PGE₂ auf Thrombozyten im menschlichen antikoagulierten Blut zeigten jedoch keine Potenzierung der Plättchenaggregation bei niedrigen PGE₂ Konzentrationen und eine nur geringe nicht-signifikante Hemmung bei hohen PGE₂ Konzentrationen.

In dem zweiten Teil der Dissertation wurde die Wirkung von PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Es wurde eine geringere und/oder verzögerte Aggregation der Plättchen erwartet, wenn der proaggregatorischen EP₃-Rezeptor mit den spezifischen Antagonisten blockiert wurde. Diese Hypothese bestätigte sich in den Versuchen nicht: Die zwei spezifischen EP₃-Antagonisten AE5-599 und AE3-240 bewirkten keine Verminderung der Thrombozytenaggregation, die durch atherosklerotische Plauehomogenate induziert wurde. Auch die durch Plauehomogenate stimulierte Thrombozytensekretion aus den dichten Granula (Messung der ATP-Sekretion) wurde von den beiden EP₃-Antagonisten nicht beeinflusst.

Die verwendete Methode zur Messung der Thrombozytenaggregation (*MEA, multiple electrode aggregometry*) erfasst die Aggregation der Thrombozyten in gerührtem Blut unter statischen Bedingungen. Diese wird durch die Exponierung des Glykoproteins

IIb/IIIa auf der Plättchenoberfläche und dessen Bindung an Fibrinogen vermittelt. Die Interaktion von *von Willebrand Faktor* mit thrombozytärem Glykoprotein Ib ist in diesem statischen System nicht relevant und wird daher nicht gemessen (Penz *et al.* 2007; Awidi *et al.* 2009), sodass mit diesen Messungen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass PGE₂ in atherosklerotischen Plaques einen Einfluss auf die Plättchenadhäsion und die Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen hat.

Daher wurde in weiteren Experimenten die Situation einer Plaqueruptur simuliert, indem atherosklerotisches Plaquematerial fließendem Blut exponiert wurde. Es wurden Scherraten verwendet, wie sie in mäßig stenosierten Koronararterien vorkommen (1500 s⁻¹) (Ruggeri 2002). Auch hier zeigte sich, in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen, dass die beiden EP₃-Antagonisten die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und -aggregation nicht hemmten, und demzufolge PGE₂ in atherosklerotischen Läsionen keinen stimulierenden Effekt über den EP₃-Rezeptor auf die Plättchenfunktion ausübt. Dagegen war nach Inkubation des Blutes mit Acetylsalicylsäure eine deutliche Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen zu beobachten.

Menschliche Thrombozyten exprimieren neben dem aktivierenden EP₃-Rezeptor auch inhibierende EP₂- und EP₄-Rezeptoren, wobei EP₄ gegenüber EP₂ deutlich überwiegt (Paul *et al.* 1998). Es wurde gezeigt, dass der EP₄-Rezeptor der wichtigste inhibitorische PGE₂-Rezeptor auf menschlichen Thrombozyten ist (Iyu *et al.* 2010; Kuriyama *et al.* 2010; Philipose *et al.* 2010; Smith *et al.* 2010), sodass in folgenden Experimenten die Rolle von EP₄ untersucht wurde. Es fand sich eine signifikante Potenzierung der Plättchenaggregation (gemessen in antikoaguliertem Blut) durch den spezifischen EP₄-Rezeptor-Antagonisten AE3-208 in Kombination mit PGE₂ von ADP-stimulierten Thrombozyten. AE3-208 hatte selbst keinen Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregation. Diese Ergebnisse zeigen, dass hohe Konzentrationen von PGE₂ die Plättchenaggregation im Blut verstärken (wahrscheinlich über die Aktivierung des EP₃-Rezeptors), wenn der hemmende EP₄-Rezeptor blockiert wird. Der EP₄-Rezeptor könnte somit eine wichtige Rolle in der Hämostase spielen, indem er in Anwesenheit ausreichender PGE₂-Spiegel die Plättchenaktivierung vermindert. Selektive EP₄-Rezeptor-Agonisten könnten als neue antithrombozytäre Substanzen die

aktuelle antithrombotische Therapie ergänzen (Kuriyama *et al.* 2010; Philipose *et al.* 2010).

In Experimenten mit atherosklerotischen Plaquehomogenaten zeigte sich jedoch keine Wirkung des EP₄-Rezeptor-Antagonisten. Die Erwartung, bei Blockade des inhibierenden EP₄-Rezeptors eine verstärkte Plättchenaggregation durch das in den atherosklerotischen Plaques vorhandene PGE₂ zu beobachten, wurde nicht bestätigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führen zu der Folgerung, dass PGE₂, im Gegensatz zu dem selektiven EP₃-Agonisten Sulprostone und zu der Situation bei Mäuseplättchen, in einem weiten Konzentrationsbereich keine Wirkung auf menschliche Thrombozyten ausübt. PGE₂ hat in menschlichen atherosklerotischen Läsionen weder über den proaggregatorischen EP₃-Rezeptor, noch über den hemmenden EP₄-Rezeptor einen modulierenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion.

In einer vorangegangenen Studie wurde der Gehalt an PGE₂ in atherosklerotischen Läsionen von Mäusen gemessen (Gross *et al.* 2007). Daten über den Gehalt von PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaques existierten bis dato nicht. Aufgrund der fehlenden Wirkung der EP₃- und EP₄-Rezeptor-Antagonisten auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung wurde vermutet, dass die Menge an PGE₂ in atherosklerotischen Plaques zu gering sei, als dass sie eine Wirkung auf Thrombozyten haben könnte. Um dies zu bestätigen, wurde der Gehalt an PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Plaquehomogenaten mithilfe eines spezifischen Enzym-Immunoassays quantifiziert. Es wurde ein Gehalt von ungefähr 15 pg PGE₂/mg Plaquegewebe gefunden, was bei einer eingesetzten Plaque-Konzentration von 0,42 mg Plaque/ml Blut für die MEA Messungen eine finale Konzentration von 18 pM PGE₂ ergibt. Diese PGE₂-Konzentration ist sicher viel zu gering, um die Thrombozytenfunktion im menschlichen Blut beeinflussen zu können. Ein aufgrund der Plaqueaufarbeitung und -konservierung artifiziell niedriger PGE₂-Gehalt der Plaques ist unwahrscheinlich, da in Kontrollexperimenten das PGE₂, welches vor dem Prozess der Homogenisierung zugegeben wurde, fast unverändert gemessen wurde, und kein Unterschied hinsichtlich der Plättchenaktivierung und des Effektes der EP₃-Antagonisten auf die Thrombozytenaggregation von Homogenaten frisch gewonnener und bei -80°C konservierter Plaques bestand.

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen erhoben an ApoE^{-/-} Mäusen; diese zeigten, dass PGE₂ atherosklerotischer Plaques via EP₃-Aktivierung eine wichtige Rolle in der Atherothrombose spielt (Gross *et al.* 2007). Dieser Widerspruch erklärt sich möglicherweise dadurch, dass in den hier durchgeführten Experimenten menschliche Thrombozyten und menschliches Plaquematerial untersucht wurden. Der Unterschied könnte (a) auf einen unterschiedlichen Gehalt von PGE₂ in menschlichen und murinen atherosklerotischen Plaques zurückzuführen sein, oder (b) durch ein unterschiedliches Verhalten der Plättchen von Mäusen und Menschen, auf PGE₂ zu reagieren, bedingt sein.

Ein Vergleich von den hier erhobenen Messergebnissen mit dem PGE₂-Gehalt der atherosklerotischen Plaques von Mäusen (Gross *et al.* 2007) ist nicht möglich, da in jener Studie der PGE₂ Gehalt pro Aorta und nicht pro mg Plaquesgewebe angegeben wurde. Bezüglich des möglichen Speziesunterschiedes der Thrombozyten zeigen Mäuse-Thrombozyten im Vergleich zu menschlichen Plättchen eine deutlich andere Verteilung der EP-Rezeptoren. So findet sich auf murinen Thrombozyten eine deutlich höhere Expression von EP₃ im Vergleich zu EP₄ (über 200-fach höher) und zu EP₂ (über 1000-fach höher), sodass hier die Effekte von PGE₂ über den EP_{2/4}-Signalweg vernachlässigbar erscheinen (Ma *et al.* 2001). Experimente von *Kuriyama et al.* bestätigen diese Beobachtung, hier zeigte sich eine sehr viel höhere inhibitorische Potenz eines selektiven EP₄-Rezeptor-Agonisten auf menschlichen Thrombozyten im Vergleich zu murinen Plättchen (Kuriyama *et al.* 2010). Insgesamt weisen die Unterschiede auf die Grenzen der Vergleichbarkeit von murinen und humanen Thrombozyten hin und fordern bei der Durchführung weiterer Studien zur Untersuchung der Rolle von PGE₂ auf die Thrombozytenfunktion die Verwendung von menschlichen Plättchen.

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente führen zu der Schlussfolgerung, dass PGE₂ in menschlichen atherosklerotischen Läsionen in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist, welche weder unter statischen Bedingungen, noch unter arteriellen Flussbedingungen eine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf Thrombozyten in humanem Blut ausüben. EP₃-Rezeptor-Antagonisten inhibieren nicht die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung und stellen daher keinen vielversprechenden Ansatz in der antithrombotischen Therapie dar. Unabhängig von diesen Ergebnissen zeigen neuere Studien, dass selektive EP₄-Rezeptor-Agonisten, welche das thrombozytäre cAMP erhöhen, als neue antithrombozytäre Substanzen die aktuelle antithrombotische Therapie ergänzen könnten.

Bei der Durchführung weiterer Studien zur Untersuchung der Rolle von PGE₂ auf die Thrombozytenfunktion ist es von großer Wichtigkeit, die oben aufgeführten grundlegenden Unterschiede zwischen menschlichen und murinen Thrombozyten zu berücksichtigen und in die Interpretation der Ergebnisse miteinzubeziehen.

7 Literaturverzeichnis

- Awidi, A., A. Maqablah, M. Dweik, N. Bsoul and A. Abu-Khader (2009). "Comparison of platelet aggregation using light transmission and multiple electrode aggregometry in Glanzmann thrombasthenia." Platelets **20**(5): 297-301.
- Badimon, J. J., M. Lettino, V. Toschi, V. Fuster, M. Berrozpe, J. H. Chesebro and L. Badimon (1999). "Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions." Circulation **99**(14): 1780-1787.
- Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, S. A. Myers and M. D. Breyer (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 661-690.
- Brock, T. G., R. W. McNish and M. Peters-Golden (1999). "Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2." J Biol Chem **274**(17): 11660-11666.
- Chard, T. (1990). "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, 4th Edition." Elsevier.
- Cipollone, F., C. Prontera, B. Pini, M. Marini, M. Fazio, D. De Cesare, A. Iezzi, S. Uchino, G. Boccoli, V. Saba, F. Chiarelli, F. Cuccurullo and A. Mezzetti (2001). "Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability." Circulation **104**(8): 921-927.
- Coleman, R. A., W. L. Smith and S. Narumiya (1994). "International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes." Pharmacol Rev **46**(2): 205-229.
- Davies, M. J. and A. Thomas (1984). "Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death." N Engl J Med **310**(18): 1137-1140.
- Fabre, J. E., M. Nguyen, K. Athirakul, K. Coggins, J. D. McNeish, S. Austin, L. K. Parise, G. A. FitzGerald, T. M. Coffman and B. H. Koller (2001). "Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation." J Clin Invest **107**(5): 603-610.
- Fluxion Biosciences Inc. "Product Data Sheet." www.fluxionbio.com.
- Friedman, E. A., M. L. Ogletree, E. V. Haddad and O. Boutaud (2015). "Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease." Thromb Res **136**(3): 493-503.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark and P. Libby (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-2503.

- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis." Thromb Haemost **82**(2): 722-726.
- Gray, S. J. and S. Heptinstall (1985). "The effects of PGE₂ and CL 115,347, an antihypertensive PGE₂ analogue, on human blood platelet behaviour and vascular contractility." Eur J Pharmacol **114**(2): 129-137.
- Gross, S., P. Tilly, D. Hentsch, J. L. Vonesch and J. E. Fabre (2007). "Vascular wall-produced prostaglandin E₂ exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP₃ receptors." J Exp Med **204**(2): 311-320.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.
- Heptinstall, S., D. I. Espinosa, P. Manolopoulos, J. R. Glenn, A. E. White, A. Johnson, N. Dovlatova, S. C. Fox, J. A. May, D. Hermann, O. Magnusson, K. Stefansson, D. Hartman and M. Gurney (2008). "DG-041 inhibits the EP₃ prostanoid receptor--a new target for inhibition of platelet function in atherothrombotic disease." Platelets **19**(8): 605-613.
- Iyu, D., J. R. Glenn, A. E. White, A. J. Johnson, S. C. Fox and S. Heptinstall (2010). "The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE₂ on human platelet function." Platelets **21**(5): 329-342.
- Kuriyama, S., H. Kashiwagi, K. Yuhki, F. Kojima, T. Yamada, T. Fujino, A. Hara, K. Takayama, T. Maruyama, A. Yoshida, S. Narumiya and F. Ushikubi (2010). "Selective activation of the prostaglandin E₂ receptor subtype EP₂ or EP₄ leads to inhibition of platelet aggregation." Thromb Haemost **104**(4): 796-803.
- Lafont, A. (2003). "Basic aspects of plaque vulnerability." Heart **89**(10): 1262-1267.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.
- Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-325.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Ma, H., A. Hara, C. Y. Xiao, Y. Okada, O. Takahata, K. Nakaya, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, S. Narumiya and F. Ushikubi (2001). "Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃." Circulation **104**(10): 1176-1180.
- MacIntyre, D. E. and J. L. Gordon (1975). "Calcium-dependent stimulation of platelet aggregation by PGE." Nature **258**(5533): 337-339.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt and M. Gawaz (2002). "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." J Exp Med **196**(7): 887-896.

- Matsumoto, H., H. Naraba, M. Murakami, I. Kudo, K. Yamaki, A. Ueno and S. Oh-ishi (1997). "Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages." Biochem Biophys Res Commun **230**(1): 110-114.
- Matthews, J. S. and R. L. Jones (1993). "Potentiation of aggregation and inhibition of adenylate cyclase in human platelets by prostaglandin E analogues." Br J Pharmacol **108**(2): 363-369.
- Mohler, E. R., 3rd (2007). "Atherothrombosis--wave goodbye to combined anticoagulation and antiplatelet therapy?" N Engl J Med **357**(3): 293-296.
- Murakami, M., H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh and I. Kudo (2000). "Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2." J Biol Chem **275**(42): 32783-32792.
- Nakashima, Y., E. W. Raines, A. S. Plump, J. L. Breslow and R. Ross (1998). "Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 842-851.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto and F. Ushikubi (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." Physiol Rev **79**(4): 1193-1226.
- Paul, B. Z., B. Ashby and S. B. Sheth (1998). "Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells." Br J Haematol **102**(5): 1204-1211.
- Penz, S., A. J. Reininger, R. Brandl, P. Goyal, T. Rabie, I. Bernlochner, E. Rother, C. Goetz, B. Engemann, P. A. Smethurst, W. H. Ouweland, R. Farndale, B. Nieswandt and W. Siess (2005). "Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI." FASEB J **19**(8): 898-909.
- Penz, S. M., A. J. Reininger, O. Toth, H. Deckmyn, R. Brandl and W. Siess (2007). "Glycoprotein Ibalph inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques." Thromb Haemost **97**(3): 435-443.
- Philipose, S., V. Konya, I. Sreckovic, G. Marsche, I. T. Lippe, B. A. Peskar, A. Heinemann and R. Schuligoi (2010). "The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2416-2423.
- Pollack, C. V., Jr. and J. E. Hollander (2008). "Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes: the emergency physician's perspective." J Emerg Med **35**(1): 5-13.

- Reininger, A. J., I. Bernlochner, S. M. Penz, C. Ravanat, P. Smethurst, R. W. Farndale, C. Gachet, R. Brandl and W. Siess (2010). "A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **55**(11): 1147-1158.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Roth, G. A., M. H. Forouzanfar, A. E. Moran, R. Barber, G. Nguyen, V. L. Feigin, M. Naghavi, G. A. Mensah and C. J. Murray (2015). "Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality." N Engl J Med **372**(14): 1333-1341.
- Rother, E., R. Brandl, D. L. Baker, P. Goyal, H. Gebhard, G. Tigyi and W. Siess (2003). "Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques." Circulation **108**(6): 741-747.
- Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.
- Salzman, E. W., P. C. Kensler and L. Levine (1972). "Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in human blood platelets. IV. Regulatory role of cyclic amp in platelet function." Ann N Y Acad Sci **201**: 61-71.
- Schmid, A., K. H. Thierauch, W. D. Schleuning and H. Dinter (1995). "Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2." Eur J Biochem **228**(1): 23-30.
- Siess, W. (1976). "Renale Prostaglandin E (PGE) Synthese: Radioimmunologische und biologische PGE-Analyse im Kaninchen- und Humanurin und Änderung der PGE-Ausscheidung nach Uninephrektomie." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Siess, W., K. J. Zangl, M. Essler, M. Bauer, R. Brandl, C. Corrinth, R. Bittman, G. Tigyi and M. Aepfelbacher (1999). "Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6931-6936.
- Simmons, D. L., R. M. Botting and T. Hla (2004). "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." Pharmacol Rev **56**(3): 387-437.
- Singh, J., W. Zeller, N. Zhou, G. Hategan, R. K. Mishra, A. Polozov, P. Yu, E. Onua, J. Zhang, J. L. Ramirez, G. Sigthorsson, M. Thorsteinnsdottir, A. S. Kiselyov, D. E. Zembower, T. Andresson and M. E. Gurney (2010). "Structure-activity relationship studies leading to the identification of (2E)-3-[I-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-5-fluoro-3-methyl-1H-indol-7-yl]-N-[(4,5-dichloro-2-thienyl)sulfonyl]-2-propenamide (DG-041), a potent and selective prostanoid EP3 receptor antagonist, as a novel antiplatelet agent that does not prolong bleeding." J Med Chem **53**(1): 18-36.

- Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulten, O. Wiklund, T. L. Innerarity and J. Boren (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.
- Smith, J. P., E. V. Haddad, J. D. Downey, R. M. Breyer and O. Boutaud (2010). "PGE2 decreases reactivity of human platelets by activating EP2 and EP4." Thromb Res **126**(1): e23-29.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2013) "Gesundheit - Todesursachen in Deutschland." Fachserie 12 Reihe 14.
- Sugimoto, Y. and S. Narumiya (2007). "Prostaglandin E receptors." J Biol Chem **282**(16): 11613-11617.
- Tijssen, P. (1985). "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays." Elsevier.
- Toschi, V., R. Gallo, M. Lettino, J. T. Fallon, S. D. Gertz, A. Fernandez-Ortiz, J. H. Chesebro, L. Badimon, Y. Nemerson, V. Fuster and J. J. Badimon (1997). "Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques." Circulation **95**(3): 594-599.
- Toth, O., A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy and W. Siess (2006). "Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood." Thromb Haemost **96**(6): 781-788.
- van Zanten, G. H., S. de Graaf, P. J. Slootweg, H. F. Heijnen, T. M. Connolly, P. G. de Groot and J. J. Sixma (1994). "Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries." J Clin Invest **93**(2): 615-632.
- Veza, R., R. Roberti, G. G. Nenci and P. Gresele (1993). "Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C." Blood **82**(9): 2704-2713.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb and S. M. Schwartz (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-1275.
- Weber, C. and H. Noels (2011). "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options." Nat Med **17**(11): 1410-1422.
- Weiss, H. J., A. L. Willis, D. Kuhn and H. Brand (1976). "Prostaglandin E2 potentiation of platelet aggregation induced by LASS endoperoxide: absent in storage pool disease, normal after aspirin ingestion." Br J Haematol **32**(2): 257-272.

Anhang

Inhalt der Video-CD

Echtzeitaufnahmen (komprimierte Versionen) der Flussversuche

AE5-599 hat (im Gegensatz zu ASS) keinen Einfluss auf die Plättchenthrombusbildung induziert durch humane atherosklerotische Plaques unter arteriellen Flussbedingungen

Thrombozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacrin (10 μM) versetzt, so dass sie mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar wurden. Humanes Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde anschließend durch die mit atherosklerotischem Plaquematerial beschichtete Flusskammer perfundiert (Scherrate 1500 s^{-1} , Flussrichtung von rechts nach links) und für eine Dauer von bis zu 10 Minuten beobachtet.

Video 1: obere Kammer: Kontrolle; untere Kammer: mit AE 5-599 (600 nM) versetztes Blut

Video 2: obere Kammer: Kontrolle; untere Kammer: mit ASS (1 mM) versetztes Blut

Es zeigen sich wachsende Thrombozytenaggregate (fluoreszenzmikroskopisch grün) vor allem an den Rändern der Kammer, wo die meisten Plaquestrukturen (wie vor Beginn der Flusseperimente mittels Phasenkontrastmikroskopie gesehen wurde) lokalisiert sind. AE5-599 hat keinen signifikanten Einfluss auf die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation. Im Gegensatz dazu zeigt sich mit ASS eine deutliche Hemmung der Plaque-stimulierten Plättchenadhäsion und Thrombusbildung.

Abkürzungen**A**

AA	<i>arachidonic acid</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ApoE	Apolipoprotein E
ASA	<i>acetylsalicylic acid</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>aggregation unit</i>

C

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase

E

EP	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>

F

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
fig.	<i>figure</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>

G

GP	Glykoprotein
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein

H

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
-------	---

I

IgG	Immunglobulin G
IP	Prostacyclin-Rezeptor
IP ₃	Inositoltrisphosphat

L

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>

M

MEA	<i>Multiple Electrode Aggregometry</i>
min.	<i>minute</i>
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
m-PGES-1	<i>microsomal prostaglandin E synthase 1</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

N

NaCl	Natriumchlorid
------	----------------

P

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRP	plättchenreiches Plasma

R

RGDS	Arg-Gly-Asp-Ser
rpm	<i>revolutions per minute</i>

S

SD	<i>standard deviation</i>
----	---------------------------

T

Tab.	Tabelle
TxA ₂	Thromboxan A ₂

V

vWF	von Willebrand Faktor
-----	-----------------------

Publikationsverzeichnis

L. J. Schober, A. L. Khandoga, S. M. Penz and W. Siess (2010)

"The EP₃-agonist sulprostone, but not prostaglandin E₂ potentiates platelet aggregation in human blood."

Thromb Haemost 103(6): 1268-1269

L. J. Schober, A. L. Khandoga, S. Dwivedi, S. M. Penz, T. Maruyama, R. Brandl and W. Siess (2011).

"The role of PGE₂ in human atherosclerotic plaque on platelet EP₃ and EP₄ receptor activation and platelet function in whole blood."

J Thromb Thrombolysis 32(2): 158-166

L. J. Schober, A. L. Khandoga, S. M. Penz, R. Brandl, W. Siess

"The role of PGE₂ in human atherosclerotic plaque on platelet EP₃ and EP₄ receptors and platelet function in whole blood."

Abstract und Poster Präsentation auf dem 6th International Platelet Symposium in Ma'ale Hachamisha, Israel, Mai 2010

L. J. Schober, A. L. Khandoga, S. M. Penz, R. Brandl, W. Siess

"No relevance of PGE₂ in human atherosclerotic plaque on platelet function in whole blood."

Abstract und Poster Präsentation auf der Nottingham Platelet Conference in Nottingham, England, Juli 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. W. Siess, meinem Doktorvater, danke ich besonders für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die exzellente Betreuung, für die intensive Förderung und Unterstützung der Arbeit und der Publikationen sowie für die Geduld bei den Korrekturen und das in mich gesetzte Vertrauen.

Anna Khandoga, meiner Betreuerin, danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Methodik, für ihre unendliche Geduld, ihre wertvollen und konstruktiven Anregungen, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente sowie für ihre Hilfe und motivierenden Worte bei Vorträgen und Postervorstellungen.

Suman Dwivedi danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. R. Brandl danke ich für die Bereitstellung des atherosklerotischen Plaquematerials.

Kathrin von Oheimb, Barbara Böhlig, Brigitte Zimmer und Diana Wagner danke ich herzlich für ihre technische Assistenz und Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Experimente sowie für die netten Gespräche zwischendurch.

Allen Mitgliedern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und vor allem den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Siess danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Zum Abschluss danke ich meinem Mann und meiner Familie für ihre Unterstützung in Form von guten Tipps und Ratschläge, für ihre Geduld und Motivation sowie für ihren Einsatz als Lektoren dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lisa Kiechle, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von Prostaglandin E₂ bei der Plättchenthrombusbildung induziert durch humane atherosklerotische Plaques

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Lisa Kiechle