

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre
Physiologie und Pathophysiologie (im
Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle
Medizin, WBex) der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Ein Cytochrom P450 2C8/9-abhängig gebildeter
EDHF hyperpolarisiert Thrombozyten und hemmt
deren Adhäsion an Endothelzellen**

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

**vorgelegt von
Tobias Riexinger
aus Heidelberg
2008**

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

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Ulrich Pohl
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Wolfgang Siess
- Mitberichterstatter : Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm
Prof. Dr. Laurenz Wurzinger
- Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter : PD. Dr. med. F. A. Krötz
- Dekan : Prof. Dr. med. D. Reinhardt
- Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2008

Meinen geliebten Eltern
sowie meinem Großvater

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Krötz F, **Riexinger T**, Keller M, Sohn HY, Pohl U. A Cytochrome P450 2C8/9-derived EDHF inhibits platelet adhesion to endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) Mar;24 (3):595-600
- **Riexinger T**, Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Ein Cyp2C8/9-abhängiger EDHF hemmt die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen. *Pfuger's Archiv/ European Journal of Physiology* (2003) (Abstract)
- **Riexinger T**, Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Ein Cyp2C8/9-abhängiger EDHF hemmt die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen. *Z Kardiol* (2003), Band 92, Suppl. 1, V1443 (Abstract)
- Krötz F, **Riexinger T**, Keller M, Sohn HY, Pohl U. 11,12-EETs hyperpolarize human platelets. In: *EDHF (2002)*, Taylor and Francis Publishing, London, UK
- **Riexinger T**, Krötz F, Sohn HY, Keller M, Pohl U. Effect of EDHF and external EETs on the membrane potential and function of human platelets. *J Vasc Res* (2002) (Abstract)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 8 |
| 1.1. | Endothel und Endothelfunktion | 8 |
| 1.2. | Endotheliale Autakoide | 8 |
| 1.3. | Endotheliale Vasokonstriktoren | 9 |
| 1.4. | Endotheliale Vasodilatoren | 10 |
| 1.5. | Entdeckung von EDHF | 11 |
| 1.6. | Einfluss endothelialer Autakoide auf Thrombozytenfunktion | 12 |
| 1.7. | Bedeutung des thrombozytären Membranpotentials | 13 |
| 1.7.1. | Thrombozytäre Kalium-Kanäle | 13 |
| 1.8. | Charakterisierung von EDHF | 14 |
| 1.8.1. | Epoxyeicosatriensäuren (EETs) | 14 |
| 1.8.2. | Kaliumionen (K ⁺) | 16 |
| 1.8.3. | Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | 17 |
| 1.8.4. | Connexine / Gap junctions | 17 |
| 2. | FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG | 18 |
| 3. | MATERIAL UND METHODIK | 20 |
| 3.1. | Zellkultur | 20 |
| 3.1.1. | Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) | 20 |
| 3.1.2. | Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen | 21 |
| 3.1.3. | Kultivierung von EA.hy926 Zellen | 21 |
| 3.1.4. | Isolation von humanen Thrombozyten | 22 |
| 3.2. | Durchflußzytometrie | 24 |
| 3.2.1. | Thrombozytäres Membranpotential | 24 |
| 3.2.2. | Thrombozytäre Adhäsionsmolekülexpression | 26 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3. | Molekularbiologische Methoden | 27 |
| 3.3.1. | Isolierung von RNA aus Endothelzellen | 27 |
| 3.3.2. | Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion | 28 |
| 3.3.3. | Restriktionsenzymverdau | 29 |
| 3.3.4. | Gelelektrophorese | 30 |
| 3.3.5. | Stabile Transfektion von Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9) in EA.hy926-Zellen (EA.hy-CYP2C9-Zellen) | 30 |
| 3.4. | Proteinchemische Methoden | 32 |
| 3.4.1. | Proteinisolation aus EA.hy926-Zellen | 32 |
| 3.4.2. | Proteinbestimmung (nach Biuret) | 32 |
| 3.4.3. | SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese | 33 |
| 3.4.4. | Western - Blotting für CYP2C9 | 34 |
| 3.4.5. | Färbung von Proteinen | 34 |
| 3.5. | Immunologische Methoden | 35 |
| 3.5.1. | Immunoprint für CYP2C9 | 35 |
| 3.6. | Sonstige Assays | 36 |
| 3.6.1. | Bioassay für EDHF | 36 |
| 3.6.2. | In vitro Assay zur Messung der Thrombozyten-Endothel-Adhäsion | 38 |
| 3.7. | Statistische Analysen | 41 |
| | | |
| 4. | ERGEBNISSE | 42 |
| | | |
| 4.1. | Thrombozytäres Membranpotential | 42 |
| 4.1.1 | Ruhemembranpotential | 42 |
| 4.1.2 | Effekt von „EDHF“ auf das thrombozytäre Membranpotential | 45 |
| 4.1.3 | Beteiligte Ionenkanäle | 47 |
| 4.1.4 | PCR und Restriktionsenzymverdau von CYP2C8/9 | 49 |
| 4.1.5 | Effekt von EETs auf das thrombozytäre Membranpotential | 50 |
| 4.2. | Einfluss auf thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen | 54 |
| 4.2.1. | von EDHF | 55 |
| 4.2.2. | von EETs | 59 |
| 4.3. | Einfluss von EDHF und EETs auf thrombozytäre Adhäsions- molekülexpression | 60 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.1. | von EDHF | 60 |
| 4.3.2. | von EETs | 61 |
| 4.4. | Verhalten der CYP2C9 überexprimierenden Zellen | 65 |
| 4.4.1. | Nachweis des CYP2C9-Proteins in überexprimierenden Zellen | 65 |
| 4.4.2. | Freisetzung eines hyperpolarisierenden Faktors | 66 |
| 4.4.3. | Einfluss des freigesetzten Faktors auf thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen | 68 |
| 4.4.4. | EET-Analyse der EA.hy-CYP2C9 Überstände | 70 |
| 5. | DISKUSSION | 72 |
| 5.1. | EDHF als endotheliales Autakoid | 72 |
| 5.2. | Effekt von EDHF sowie EETs auf das thrombozytäre Membranpotential | 75 |
| 5.3. | Effekt von EDHF sowie EETs auf die Thrombozytenfunktion | 78 |
| 5.4. | Sind die funktionellen EDHF / EET-Effekte auf Thrombozyten vom Membranpotential abhängig? | 82 |
| 5.5. | Identität von EDHF - Sind EDHF und EET identisch? | 84 |
| 5.6. | Mögliche pathophysiologische Konsequenzen | 86 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 89 |
| 7. | ANHANG | 91 |
| 7.1. | Abkürzungsverzeichnis | 91 |
| 7.2. | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 93 |
| 7.3. | Literaturverzeichnis | 95 |
| 7.4. | Danksagung | 110 |
| 7.5. | Publikationen Tobias Riexinger | 111 |
| 7.6. | Curriculum Vitae | 112 |

1. Einleitung

1.1. Endothel und Endothelfunktion

Das Gefäßendothel, welches als einzellige Schicht das gesamte Gefäßsystem an seiner luminalen Seite auskleidet, wurde lange Zeit als einfache Barriere verstanden, d.h. als permeable Grenzmembran zwischen Intra- und Extravasaalraum.

Heute gilt es als eigenständiges, metabolisch hochaktives und gleichzeitig größtes Organ des menschlichen Körpers. Es bedeckt bei einem 70 kg schweren Mann eine Fläche von etwa 6 Tennisplätzen (ca. 350 m²) und ist mit einer Masse von bis zu 1800 g schwerer als die Leber (125).

Dieses hochspezialisierte Zellsystem reguliert neben dem Austausch gelöster Stoffe zwischen Blut und Extrazellulärraum auch den Gefäßtonus durch Modulation des Kontraktionszustandes der darunter liegenden glatten Gefäßmuskulatur und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutflusses (17; 18; 123; 153). Weiterhin moduliert das Endothel auch die Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation (9; 38; 62; 124). Darüber hinaus unterstützt das Endothel immunologische Prozesse und reguliert die Gefäßwandreparatur und das vaskuläre Zellwachstum (1; 7; 118).

1.2. Endotheliale Autakoide

Durch Stimulation mit Bradykinin, Acetylcholin, Noradrenalin (letztere wirken auch als Neurotransmitter) oder Erhöhung der Wandschubspannung setzt das Endothel eine Reihe vasoaktiver Stoffe frei. Zusammengefasst werden diese unter der Bezeichnung „Autakoide“ (abgeleitet aus dem griechischen αὐτός ἄκος = „selbst Heilmittel“),

da sie vorwiegend autokrin und parakrin wirken also ihrerseits das Endothel, die glatte Muskulatur sowie Blutbestandteile beeinflussen (19; 30; 61; 150).

Die endotheliale Freisetzung dieser Faktoren wird unter physiologischen Bedingungen in einem empfindlich regulierten Gleichgewicht gehalten. Bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose, kann es zu einem Ungleichgewicht der Freisetzung verschiedener Autakoide kommen (3; 8; 130).

Eine wichtige Einteilung der vom Endothel freigesetzten Mediatoren erfolgt hinsichtlich ihrer gefäßtonusmodulierenden Wirkung in vasodilatatorische sowie vasokonstriktorische Substanzen.

1.3. Endotheliale Vasokonstriktoren

Beispiele für Vasokonstriktoren sind die instabilen Cyclooxygenaseprodukte Prostaglandin F_2 , H_2 und Thromboxan A_2 , die aus Arachidonsäure gebildet werden, sowie das Peptid Endothelin-1, einem der potentesten Vasokonstriktoren (128; 157). Letzteres führt nach einer kurzen Vasodilatation zu einer lang anhaltenden Vasokonstriktion. Weiterhin wirkt Endothelin-1 in der glatten Gefäßmuskulatur im Gegensatz zu NO und PGI_2 , die beide das Zellwachstum inhibieren, proliferationsfördernd (17).

1.4. Endotheliale Vasodilatoren

Unter physiologischen Bedingungen galten bisher „EDRF“ („endothelium derived relaxing factor“ = Endothel abhängiger relaxierender Faktor), der als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden konnte, und Prostazyklin (PGI_2) als die wichtigsten kurzlebigen vasodilatatorischen Autakoide (54; 58; 114; 121; 136; 141).

NO wird aus L-Arginin gebildet, wobei nach Abspaltung Citrullin verbleibt. Diese Reaktion wird im Endothel durch die membrangebundene endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert (100; 104). Neben Calcium-unabhängigen Signalwegen wie Phosphorylierung der Synthase (34), durch Shear Stress (sog. Wandschubspannung) und gesteigerte zelluläre Tyrosinphosphorylierung (5) führt vorrangig die Erhöhung der intrazellulären endothelialen Calciumkonzentration durch diverse Stimuli zu einer Aktivierung der eNOS mit gesteigerter NO-Produktion. Die wichtigsten Stimuli sind Acetylcholin (Ach), Bradykinin (BK) und Shear Stress (18; 113).

NO diffundiert als lösliches Gas sowohl in Richtung Gefäßlumen als auch in Richtung glatte Gefäßmuskelzellen, wo es die lösliche Guanylat-Zyklase aktiviert, welche durch Synthese des second messengers cGMP u.a. zur Senkung der intrazellulären freien Calcium-Konzentration in den Gefäßmuskelzellen beiträgt. Durch Kontraktionshemmung wird so eine Gefäßdilataion bewirkt (140). Weiterhin ist auch ein Calcium-unabhängiger Wirkmechanismus der NO-assoziierten Gefäßrelaxation beschrieben, bei dem der kontraktile Apparat desensitiviert wird (151).

Die Hemmung der NO-Bildung, beispielsweise durch nicht metabolisierbare L-Arginin Analoga (N_ω -Nitro-L-Arginin: L-NA), führt zu einer Blockade der endothelvermittelten Vasodilatation mit Verringerung des Blutflusses und Erhöhung des Blutdrucks (28). Wird das eNOS-Gen über Knock-out-Mutationen in Mäusen ausgeschaltet, führt das ebenfalls zu einer Erhöhung des Blutdrucks (69).

Stimulus für die Synthese eines weiteren kurzlebigen und sehr potenten Vasodilators, des Prostazyklins (PGI_2), in Endothelzellen ist ebenfalls

eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. PGI_2 wird aus Arachidonsäure synthetisiert, welche aus Phospholipiden der Zellmembran über die Calcium-abhängige Phospholipase A_2 freigesetzt wird (67). Das ist der die Synthese limitierende Schritt. Aus Arachidonsäure wird durch Cyclooxygenase über Prostaglandin (H und I) Prostacyclin synthetisiert. PGI_2 bindet an glatten Gefäßmuskelzellen an einen spezifischen Membranrezeptor (145), was über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration über unterschiedliche Zielproteine bzw. durch Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzelle mit Vasodilatation einhergeht. Außerdem steigert PGI_2 die NO-Freisetzung (142).

1.5. Entdeckung von EDHF

Vor einigen Jahren konnte man einen weiteren Endothel abhängigen Faktor nachweisen, der eine Gefäßerweiterung bewirkt, ähnlich wie NO und Prostazyklin, von beiden aber unabhängig ist. Da er als Antwort auf diverse Stimuli eine Vasodilatation mittels Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen bewirkt, wird er als „endothelium-derived hyperpolarizing factor“, kurz und im weiteren Verlauf dieser Arbeit „EDHF“ bezeichnet (26; 30).

Die molekulare Identität dieses EDHF wird nach wie vor kontrovers diskutiert, wie im Weiteren ausgeführt werden wird. EDHF führt durch Öffnung von Calcium-aktivierbaren Kalium-Kanälen (K_{Ca} -Kanäle) zu einer Hyperpolarisierung glatter Gefäßmuskelzellen. Dadurch nehmen die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle und die zytosolische Calciumkonzentration ab. Das bewirkt eine Hemmung der Kontraktion der Gefäßmuskulatur und somit Relaxation. Im Bereich der Mikrozirkulation zeigt sich immer deutlicher, dass EDHF eine wichtige Rolle als Vasodilatator spielt. Daten hierfür liegen vor allem für die Mikrozirkulation wie z.B. Mesenterial- oder Skelettmuskelarteriolen sowie die Cremaster-Zirkulation des Hamsters, aber auch für die pulmonale

Zirkulation des Schweines und grössere Arteriolen und kleinere Arterien vor (10; 66; 120; 163). Unter bestimmten Umständen kann er sogar in pathophysiologisch veränderten Gefäßen, wo die Produktion von NO und Prostazyklin abgeschwächt und damit die Gefahr thrombotischer Ereignisse erhöht ist (111), die Rolle des funktionell wichtigsten Vasodilatators übernehmen (73; 146).

1.6. Einfluss endothelialer Autakoide auf Thrombozytenfunktion

Arterielle Verschlüsse spielen bei der Pathophysiologie vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie z.B. der des Herzinfarktes, eine entscheidende Rolle (55). Dabei ist die Aktivierung (Adhäsion und Aggregation) von Thrombozyten an der Wand pathologisch vorgeschädigter Gefäße der Hauptgrund für den plötzlichen thrombotischen Verschluss mit folgendem Infarkt (55; 74). Auch bei der Entstehung der Atherosklerose selbst spielt die Aktivierung von Thrombozyten eine wichtige Rolle (92).

Durch die Produktion von Adenosin und Autakoiden übt das Gefäßendothel erheblichen Einfluss auf die thrombozytäre, Aggregation und Adhäsion aus (6). Die beiden vom Endothel produzierten relaxierenden Autakoide, Stickoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂), hemmen auch die thrombozytäre Aggregation (12; 86), obwohl sie durch ihren Einfluss auf die Gefäßmotorik charakterisiert wurden („relaxing factors“). Heute weiß man, dass sowohl NO als auch Prostazyklin bedeutende Schutzfaktoren gegen das Entstehen arterieller Thrombosen sind (70; 100; 119).

Auch endotheliale Depolarisation und die daraus resultierende endotheliale Superoxid-Freisetzung kann Thrombozyten beeinflussen (77-79). Zu Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise, dass auch ein EDHF von isolierten Gefäßen ins Lumen freigesetzt werden kann (2; 46). Weiterhin gab es Daten, welche die endotheliale Freisetzung eines EDHF aus kultivierten Endothelzellen beschrieben (44; 47; 133).

Es war jedoch bei Beginn der experimentellen Arbeiten dieser Doktorarbeit nicht bekannt, ob auch der zuletzt entdeckte, vom Endothel produzierte, NO- und Prostazyklin-unabhängige vasodilatierende Faktor EDHF die Thrombozytenaktivität hemmen bzw. ob er überhaupt einen Einfluss auf Blutbestandteile haben kann.

1.7. Bedeutung des thrombozytären Membranpotentials

Das normale Ruhemembranpotential des menschlichen Thrombozyten liegt bei ca. -50 - -60 mV (53; 87; 158). Es gibt Hinweise, dass Änderungen des thrombozytären Membranpotentials die Funktion von Thrombozyten beeinflussen können (52; 117). Die Aufrechterhaltung und exakte aktive Konstanthaltung des Membranpotentials ist für die thrombozytäre Funktionalität von großer Bedeutung. Änderungen des Membranpotentials können thrombozytäre Reaktionen modulieren (72).

1.7.1. Thrombozytäre Kalium-Kanäle

Thrombozyten exprimieren mehrere Typen von Kalium-Kanälen. In großer Anzahl sind spannungsabhängig- („voltage“-) aktivierbare (K_V -Kanäle) Kalium-Kanäle vorhanden (89). Weiterhin werden in geringerer Anzahl Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) exprimiert (29; 88). Diese unterteilt man entsprechend ihrer Leitfähigkeit in drei Subtypen, Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle mit großer (BK_{Ca} =big), mittlerer (IK_{Ca} =intermediate) und geringer (SK_{Ca} =small) Leitfähigkeit. Während IK_{Ca} und BK_{Ca} -Kanäle auf Thrombozyten mit elektrophysiologischen Methoden nachgewiesen werden konnten (88), wurden SK_{Ca} -Kanäle bisher nicht identifiziert (43).

1.8. Charakterisierung von EDHF

EDHF ist nach heutigem Kenntnisstand wahrscheinlich kein singulärer Faktor, sondern eher ein Sammelname für Faktoren die in verschiedenen Gefäßgebieten, Spezies oder je nach Stimulation unterschiedlich sind, aber alle über eine Hyperpolarisation ihre Wirkung entfalten. Bisherige Befunde sprechen in der Tat für die Existenz mehrerer EDHFs (16; 20; 23; 127). Mögliche Identitäten von EDHF werden im Folgenden ausgeführt:

1.8.1. Epoxyeicosatriensäuren (EETs)

In den meisten tierexperimentell untersuchten Gefäßgebieten und bei nahezu allen Untersuchungen menschlicher Gefäße scheint EDHF ein EET zu sein, ein Produkt der Arachidonsäure, welche aus Phospholipiden der Zellmembran gebildet wird.

Die ersten Hinweise, dass EETs für EDHF-Effekte bei Säugern verantwortlich sein können, wurden 1994 an Schweine-Koronararterien gezeigt (65). Hierbei bewirkte extern zugegebenes 11,12-EET eine Dilatation. Campbell et al. konnten anschließend 1996 ähnliche Effekte an Rinder-Koronararterien zeigen, wobei alle EET-Isoformen (5,6- 8,9- 11,12- 14,15-EET) in gleicher Weise glatte Schweinekoronarmuskelzellen hyperpolarisierten und relaxierten (21). Dieser Effekt war über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt. Es folgten Daten über Cytochrom P450 Oxidase abhängige Gefäßdilatationen an Hunde-Koronararterien (159) und an menschlichen Koronararterien (99).

In der Mikrozirkulation des Hamsters und in Schweine-Koronararterien wurde das CYP450 Monooxygenase Isoenzym CYP2C als eine mit beteiligte EDHF-Quelle identifiziert (11; 31; 46). Weiterhin konnte sowohl in klinischen Daten (2) als auch in mehreren Bioassays (31; 44; 50) und nicht zuletzt durch direkte Zellkultur-Messungen gezeigt werden, dass

auch EETs selbst vom Endothel in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (131).

Ein Großteil der Effekte wurde membranpotentialabhängig über K_{Ca} -Kanäle vermittelt. In vielen Gefäßbetten konnte die EDHF Bildung/Freisetzung durch eine Kombination aus Apamin und Charybdotoxin (durch Blockade von SK_{Ca} und IK_{Ca}) verhindert werden (16). Es sind jedoch auch membranpotential-unabhängige Effekte für EETs beschrieben (98).

Abbildung 1 zeigt eine Auswahl an Produkten der Arachidonsäure mit den an der Synthese beteiligten Enzymen. Derzeit liegen viele Daten über die von einer Isoform der Cytochrom P450-Monooxygenase gebildeten Epoxyeicosatriensäuren (EETs) und ihre EDHF-artigen Wirkungen vor (2; 21; 25; 44; 46; 116; 147).

Schematische Darstellung der Arachidonsäure-Produkte

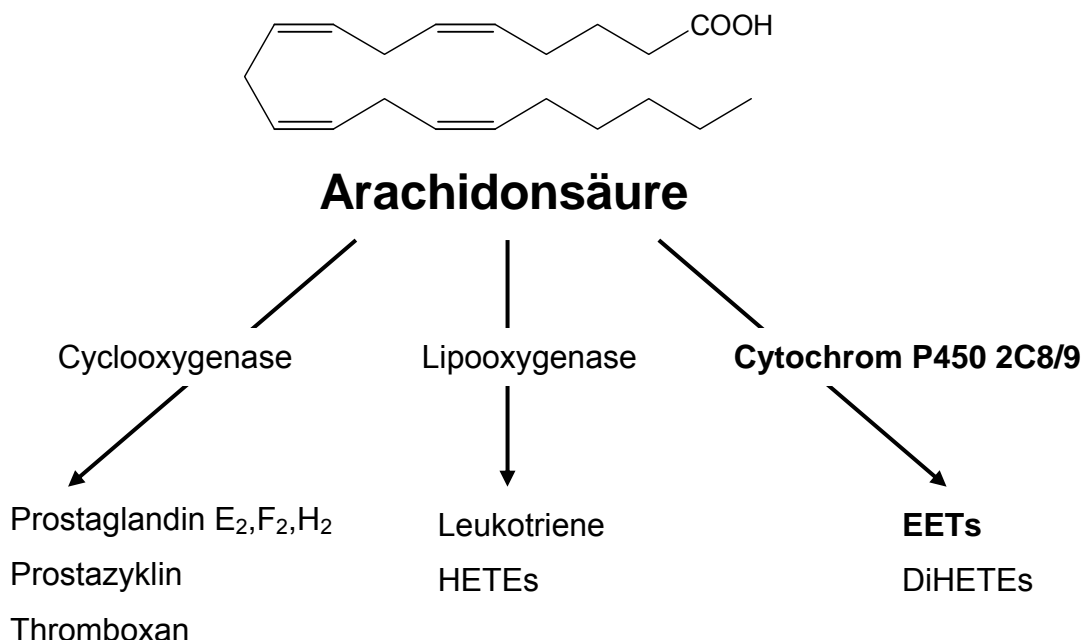


Abbildung 1: Schematische Darstellung der aus Arachidonsäure (Strukturformel) gebildeten Produkte mit den jeweils beteiligten Enzymen.

1.8.2. Kaliumionen (K^+)

Daten der Gruppe von A Weston legen nahe, dass Änderungen der extrazellulären Kalium-Konzentration für die EDHF-Wirkung verantwortlich sind. Diese These stützt sich darauf, dass Kalium-Ionen nach Stimulation oder Shear Stress aus dem Endothel ausströmen und durch Änderung der Kalium-Konzentration im myoendothelialen Raum die angrenzenden glatten Gefäßmuskelzellen direkt beeinflussen. Der intra- und extrazelluläre Kaliumspiegel wird physiologisch in engen Grenzen gehalten. Hierfür gibt es viele Regelmechanismen wie zum Beispiel die aktive Natrium / Kalium-ATPase (Na/Ka-ATPase), die zwei extrazelluläre Kalium-Ionen gegen drei intrazelluläre Natrium-Ionen austauscht.

Edwards et al. konnten an der Mikrozirkulation der Ratte zeigen, dass eine leicht erhöhte Kalium-Konzentration im myoendothelialen Raum die Na/Ka-ATPase aktiviert und letztlich eine Hyperpolarisation mit Relaxation glatter Gefäßmuskulatur auslöst. Die Hauptthese - transiente Anstiege extrazellulärer Kaliumionen erzeugen EDHF-artige Effekte - beruht auf der Beobachtung, dass dieses Phänomen bei erhöhter Kalium-Konzentration auch noch ohne Endothel auslösbar war bzw. bei Hemmung der Na/Ka-ATPase nicht mehr funktionierte (39; 138).

Zwar kann eine Modulation des EDHF-Effektes durch Änderungen der Kalium-Konzentration mit dieser Theorie teilweise erklärt werden, jedoch sprechen einige Daten gegen eine EDHF-Wirkung die allein auf Änderung der extrazellulären Kalium-Konzentration zurück zu führen wäre. Auch wenn eine gewisse Gefäßrelaxation allein durch Kaliumapplikation reproduziert werden konnte, so zeigte sich in der Mikrozirkulation der Ratte, an Schweine-Carotiden, an Meerschweinchen-Coronarien und in humaner subkutaner Mikrozirkulation ein von der Aktivität der Na/Ka-ATPase unabhängiger EDHF-Effekt, der nach Zerstörung oder Ablösung des Endothels nicht mehr nachweisbar war (27; 36; 126).

Durch Kaliumionen allein sind die Effekte nicht komplett erklärbar. EDHF scheint somit in vielen Gefäßgebieten eine andere Identität zu haben.

1.8.3. Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Im Jahr 2000 wurden von Matoba et al. erstmals Befunde vorgelegt, dass Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als EDHF wirken kann (96). Dies stützte sich insbesondere auf die Tatsache, dass vasodilatatorische Effekte durch ACh-Stimulation mit der Wasserstoffperoxid spaltenden Katalase gehemmt werden konnten (143). Weiterhin wurde dieser Effekt durch Membrandepolarisation gehemmt. Welche Kaliumkanal-Subtypen durch Wasserstoffperoxid beeinflusst werden können, ist bisher nicht bekannt (63; 80). Als eine der Hauptquellen von H₂O₂ werden Oxidasen, insbesondere eine entkoppelte NO-Synthase, teilweise in Kooperation mit einer Superoxid Dismutase, diskutiert. Dies widerspricht allerdings der EDHF-Definition, wonach dieser als NO- und Prostazyklin unabhängiger, vasodilatierender Faktor beschrieben ist der seine Wirkung auch unter Hemmung der NO-Synthase entfalten kann (95).

1.8.4. Connexine / Gap junctions

Befunde an isolierten Gefäßen führten zu der Hypothese, dass EDHF möglicherweise gar kein (extrazellulärer) Faktor ist, sondern nur durch eine endotheliale Hyperpolarisation zu Stande kommt welche über Gap junctions auf glatte Muskelzellen übertragen wird. Sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen sind in der Mikrozirkulation via Gap junctions miteinander gekoppelt und können so prinzipiell miteinander kommunizieren (84). In einigen Gefäßen konnte nach pharmakologischer Blockade der Gap junctions eine deutlich verminderte „EDHF“ induzierte Vasodilatation beobachtet werden (35; 161). Zwar spielen Gap junctions innerhalb des Zell-Synzytiums eine zentrale Rolle und sie können EDHF-Effekte durch Fortleitung von Membranpotentialänderungen oder diversen Botenstoffen sicherlich verstärken, jedoch scheint eine alleinige Erklärung der EDHF-Effekte durch Gap junctions nicht ausreichend zu sein, insbesondere dann, wenn eine Freisetzung des Faktors vorhanden ist (40; 41).

2. Fragestellung

Wir stellten die Hypothese auf, dass EDHF, der ähnlich wie NO und Prostazyklin eine Gefäßerweiterung bewirkt, wie die genannten Endothelfaktoren auch die Funktion von Blutplättchen beeinflussen könnte.

Bei Beginn der experimentellen Arbeiten war jedoch nicht bekannt, ob dieser zuletzt entdeckte, vom Endothel produzierte NO- und Prostazyklin-unabhängige vasodilatierende Faktor EDHF, auch Thrombozytenaktivität hemmen kann bzw. ob er überhaupt einen Einfluss auf Blutbestandteile haben kann.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

- Kann EDHF an menschlichen Endothelzellen das Membranpotential von Thrombozyten im Sinne einer Hyperpolarisation beeinflussen, wie er dies bei glatten Gefäßmuskelzellen tut?
- Kann EDHF funktionelle Eigenschaften von Thrombozyten, wie z.B. Aktivität, Aggregation oder Adhäsion, beeinflussen?
- Sind die Effekte vom Membranpotential abhängig?

Es gab bereits Hinweise, dass EDHF möglicherweise Eigenschaften hat, die er mit Epoxyeicosatriensäuren (EETs) teilt, und dass er aus isolierten Gefäßen und kultivierten Endothelzellen freigesetzt werden kann. Wir haben daher versucht, weitere Hinweise über die mögliche Identität dieses EDHF zu gewinnen. Daher wurden die folgenden Fragen gestellt:

- Ist EDHF ein Produkt der Arachidonsäure und vermittelt er seine Wirkung über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle?
- Was ist die Wirkung von Epoxyeicosatriensäuren (EETs), die häufig als EDHF beschrieben sind, auf Thrombozyten?
- Sind die Wirkungen von EDHF und EETs identisch?
- Was könnten pathophysiologische Konsequenzen aus EDHF-Mangel sein?

3. Material und Methodik:

3.1. Zellkultur

3.1.1. Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

| | |
|------------------|---|
| PBS ⁻ | Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ : 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ |
| Dispase | Dispase II, Konzentration 2.4 U/ml in PBS ⁻ |
| HUVEC Medium | Medium 199 mit 20 % Kälberserum und 20 % endothelial cell growth medium, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin |

Humane Umbilikalvenenendothelzellen (human umbilical venous endothelial cells - HUVEC) wurden aus frischen Umbilikalvenen einer Länge von ca. 10 - 15 cm unter sterilen Bedingungen isoliert. Hierfür wurden beide Venenenden kanüliert und die Umbilikalvene mit sterilem PBS⁻ durchspült. Im nächsten Schritt wurden die Venen 30 Minuten bei 37°C intraluminal mit Dispase inkubiert, wobei die Kanülenenden mit einem 3-Wege-Hahn dicht verschlossen wurden. Die so enzymatisch abgelösten Endothelzellen wurden durch Spülung mit Medium 199 (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (50 ml) in ein Plastik-Laborröhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 500 g, Raumtemperatur) konnte das Pellet in 10 ml HUVEC Medium resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) überführt werden.

3.1.2. Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)

| | |
|------------------|---------------------------------|
| PBS ⁻ | s. 3.1.1. |
| Trypsin / | 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA |
| EDTA Lösung | |
| HUVEC Medium | s.3.1.1. |

HUVEC wurden in Zellkulturschalen mit HUVEC Medium bei 37°C im Inkubator in einem Wasserdampf gesättigten Luftgemisch mit 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde nach jeweils zwei Tagen gewechselt. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums erfolgte die Subkultivierung. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, anschließend 2-4 Minuten mit Trypsin Lösung bei 37°C inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die so abgelösten Zellen wurden mit HUVEC Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf weitere Zellkulturschalen verteilt. Verwendet wurden ausschließlich Zellen der Passagen 1 bis 3.

3.1.3. Kultivierung von EA.hy926 Zellen

| | |
|------------------|--|
| PBS ⁻ | s. 3.1.1. |
| Trypsin / | s. 3.1.2. |
| EDTA Lösung | |
| EA.hy926 Medium | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit hohem Glukoseanteil (4500 mg/L) und 20% (w/v) Kälberserum und 1% (w/v) Penicillin / Streptomycin |

EA.hy926 - Zellen leiten sich von einer Hybridzelllinie ab, welche einige Eigenschaften von Endothelzellen, aber auch Eigenschaften eines epithelialen Tumors aufweist. Die Zellen wachsen deutlich schneller als HUVEC und lassen sich beliebig oft subkultivieren. Sie wurden in 10 cm Zellkulturschalen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) mit EA.hy926

Medium bei 37°C im Inkubator bei einem mit Wasserdampf gesättigten Luftgemisch mit 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde nach jeweils zwei Tagen gewechselt. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums erfolgte die Subkultivierung. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, anschließend 2-4 Minuten mit Trypsin Lösung bei 37°C inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die so abgelösten Zellen wurden mit EA.hy926 Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 bis 1:8 auf weitere Zellkulturschalen verteilt.

3.1.4. Isolation von humanen Thrombozyten

| | |
|---|--|
| Thrombozyten- Resuspensions- puffer | Aqua destillata mit 138 mM Natrium-Chlorid, 2,7 mM Kalium Chlorid, 12 mM Natrium Hydrogen Carbonat, 400 µM Di-Natrium Phosphat, 1 mM Magnesium Chlorid, 5 mM D-Glucose und 5 mM HEPES. Der pH-Wert wurde auf 7,35 eingestellt. |
|---|--|

Von gesunden Spendern, die sich freiwillig zur Blutentnahme bereit erklärt und mindestens zehn Tage keine Medikamente eingenommen hatten, wurde venöses Blut entnommen. Alle Spender wurden über die wissenschaftliche Verwendung ihres Blutes informiert und erklärten sich damit einverstanden.

Das Blut wurde mit 3,13% (w/v) Natrium-Citrat Lösung antikoaguliert und auf Kunststoff-Zentrifugen-Röhrchen (Fa. Quadrolab, Meckenheim) verteilt. Dann wurde das Vollblut 15 Minuten mit 150 g zentrifugiert. Dadurch trennten sich in den Röhrchen drei Phasen: unten die roten Erythrozyten (ca. die Hälfte der Röhrchen), die mittlere dünne Phase, in denen sich die Leukozyten befanden (Buffy Coat) und die obere Hälfte mit dem klaren, leicht gelblichem Plasma (Thrombozyten-Reiches Plasma - platelet rich plasma (PRP)).

Dieser Überstand wurde abgenommen und 5 Minuten mit 1 ng/ml (w/v) Prostazyklin (Iloprost, Schering, Berlin) inkubiert, um eine Voraktivierung

der Thrombozyten zu verhindern. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig auf weitere Kunststoff-Zentrifugen-Röhrchen verteilt und 10 Minuten mit 600 g zentrifugiert. Die Thrombozyten waren als weißlicher Niederschlag (Pellet) am Boden der Röhrchen sichtbar. Der Überstand (Thrombozyten-Armes Plasma - platelet poor plasma (PPP)) wurde verworfen und die Thrombozyten in Calcium-freien Thrombozyten-Resuspensionspuffer vorsichtig resuspendiert.

Die gewaschenen Thrombozyten wurden innerhalb von maximal zwei Stunden für Experimente verwendet. Sie wurden mit Hilfe einer Zählkammer für Widerstands-Partikel gezählt (Coulter Counter Z2, Fa. Beckman Coulter, Krefeld). Diese war so eingestellt, dass sie Partikel zählte, welche einen Durchmesser von 1,8 - 3,5 μM hatten. Hierfür wurden 5 μl der zu zählenden Thrombozyten mit 20 ml azidfreier stabilisierter Elektrolytlösung (Isoton II, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) verdünnt und in Plastik - Küvetten gefüllt. Die Zählkammer wurde dreimal mit Isoton II - Lösung gespült, anschließend wurde zur Bestimmung des Leerwertes zunächst Isoton II - Lösung gemessen, um dann die verdünnten Thrombozyten zu messen. Abschließend wurde das Gerät noch dreimal gespült. Abzug des Leerwertes und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ergab die Konzentration der Thrombozyten pro μl Lösung.

3.2. Durchflußzytometrie

Die Methode der Durchflußzytometrie ermöglicht die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen einer Zelle. Hierbei werden suspendierte Zellen von einer Kapillare angesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Innerhalb einer Minute ist es möglich, mehrere tausend Zellen zu erfassen. Nach Anregung emittieren die Zellen Streulicht und bei gebundenen Antikörpern auch Fluoreszenz, woraus sich verschiedene Eigenschaften der Zellen ableiten lassen können. Die Absorptionswellenlänge des Durchflußzytometers wurde bei kontinuierlichem Anregungsspektrum in unseren Versuchen auf $\lambda_{\text{Emission}}=530 \text{ nM}$ festgelegt.

3.2.1. Thrombozytäres Membranpotential

Bis- [1,3-dibutylbarbituric acid] trimethineoxonol (DiBAC₄(3), Bis-oxonol) (Fa. Molecular Probes, OR, U.S.A.) wurde zum Nachweis von Änderungen des transmembranären elektrischen Potentials benutzt, die der Farbstoff durch Veränderungen der Fluoreszenzintensität anzeigt. DiBAC₄(3) enthält delokalisierte negative Ladungen und gelangt per Diffusion durch die Plasmamembran der Zelle (155). Dort bindet Bis-oxonol an hydrophobe Bestandteile von Proteinen und Membranen, was einen Anstieg der Fluoreszenzintensität bewirkt. Das Eindringen des Farbstoffs in die Zellen erfolgt umso leichter je depolarisierter die Zellen sind. Das bewirkt einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Erfolgt hingegen eine Hyperpolarisation, so wird der Farbstoff von den Zellen abgestoßen, wodurch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität erfolgt, da ungebundener Farbstoff keine wesentliche Fluoreszenz zeigt (Abb. 2). Da also die Fluoreszenzintensität direkt von der Menge an intrazellulär gebundenem Farbstoff, und damit von der potentialabhängigen Menge an aufgenommenen Farbstoff abhängt, kann sie als Maß für das Membranpotential verwendet werden (14; 15). Eine Zelltoxizität von Bis-oxonol ist nicht beschrieben.

Prinzip Membranpotential-sensitiver Farbstoffe

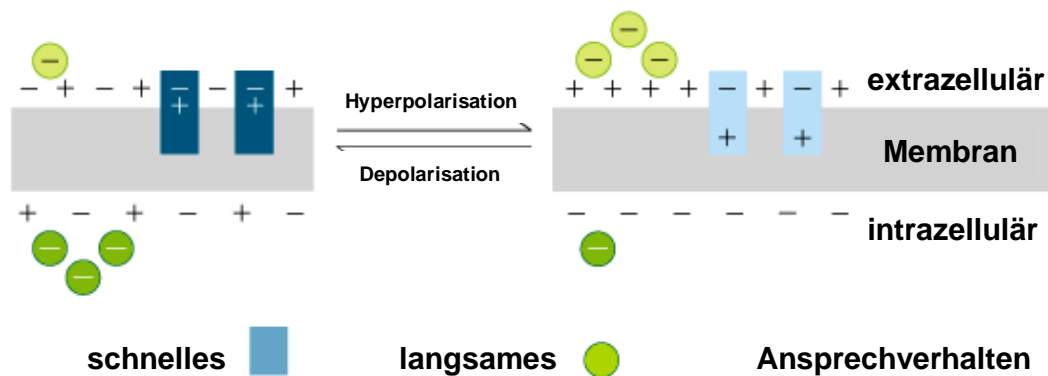


Abbildung 2: Diese Abbildung zeigt schematisch das Prinzip Membranpotential-sensitiver Farbstoffe (z.B.: Bis-[1,3-dibutylbarbituric acid] trimethineoxonol (Bis-oxonol) - ein langsam ansprechender Farbstoff).

Gewaschene Thrombozyten, welche in Thrombozyten-Resuspensionspuffer gelöst und auf 200.000/ μ l verdünnt waren (beschrieben unter 3.1.4.), wurden in Plastik-Laborröhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) 30 Minuten mit 500 nM Bis-oxonol bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Das führte zu einem stabilen Fluoreszenzsignal. Nach der Behandlung mit den verschiedenen Versuchs-Reagenzien wurde die Fluoreszenzänderung nach 10 Minuten mit einem FACScan Durchflußzytometer (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm CellQuestTM (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet.

Unter Verwendung der Valinomycin-Null-Punkt Methode (51; 117) konnten wir gemessene Fluoreszenzwerte in Membranpotentialwerte (in mV) umrechnen. Hierfür resuspendierten wir einen Teil der Thrombozyten nach dem zweiten Zentrifugationsschritt (vgl. 3.1.4.) in Resuspensionspuffern mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen. Statt 2,7 mM (w/v) Kalium enthielten sie 0,1, 10, 20, 30, 60 und 90 mM (je w/v) Kalium. Die Osmolarität der Puffer wurde durch geringere Konzentrationen von Natrium-Ionen ausgeglichen und anschließend der pH-Wert bei Raumtemperatur, normalem Resuspensionspuffer entsprechend, auf 7,35 eingestellt. Die weitere Eichung und Umrechnung der Fluoreszenzwerte in mV ist unter 4.1.1. beschrieben.

3.2.2. Thrombozytäre Adhäsionsmolekülexpression

Formalin-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 10 % Formaldehyd + Aqua dest. 1:1 gemischt mit PBS⁻

Humanes thrombozytenreiches Plasma (PRP) wurde in 1,5 ml Eppendorf Caps (Fa. Eppendorf, Hamburg) mit „EDHF“-Überständen (s. Methodik Absatz 3.6.1.), EETs und ggf. zusätzlich mit Kalium-Kanal Blockern behandelt (s. Ergebnisteil). Anschließend wurde das PRP mit jeweils 20 µM ADP (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) stimuliert. Bei jedem Versuch wurde als Kontrolle unstimuliertes PRP gemessen. Jeweils 300 µl des PRP wurden nach Behandlung und Stimulation in neue Eppendorf Caps überführt, in denen sich jeweils 1 ml 5 prozentige (v/v) Formalin-Lösung befand. Dadurch wurden die Thrombozyten fixiert.

Diese Eppendorf Caps wurden mit einer Tischzentrifuge 7 Minuten bei 3.600 rpm zentrifugiert, um die Thrombozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet in 200 µl Cellwash (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert. Davon wurden jeweils 24 µl mit einer Eppendorf Pipette in neue Caps überführt und mit jeweils 3 µl Antikörper gegen CD41 (FITC), sowie 3 µl Antikörper gegen CD62P (FITC) (beide Fa. Serotec, Oxford, Großbritannien), für 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen, wurde in jeden Cap 500 µl Cellwash (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) zugegeben und die Thrombozyten durch weitere Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge 7 Minuten bei 3.600 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet in 600 µl Cellwash (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität von jeweils zehntausend Thrombozyten wurde anschließend mit einem FACScan Durchflußzytometer (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen, wie zuvor beschrieben (76). Die Daten wurden mit dem Programm CellQuestTM (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet. Diese Fluoreszenzintensität wurde in Prozent im Vergleich zu jeweils mit untersuchten unstimulierten Kontroll-Thrombozyten ausgedrückt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Isolierung von RNA aus Endothelzellen

| | |
|------------------------|---|
| PBS ⁺ | Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 0,7 mM CaCl ₂ , 0,25 mM MgCl ₂ |
| Trizol Reagenz | Life Technologies, Karlsruhe |
| Chloroform | H ₂ O gesättigt |
| DEPC- H ₂ O | 1 ml/L Diethylpyrocarbonat (DEPC) für mind. 2 h ge- rührtes, anschließend autoklaviertes H ₂ O |

Von konfluenten HUVEC Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend 1 ml Trizol Reagenz zugegeben. Das Zellysat wurde in Reaktionsgefäße überführt und die Proben wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten, um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu vervollständigen. Dann wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben, die Ansätze gut durchmischt und 20 Minuten bei 4°C mit 15000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und somit von den Proteinen und der DNA getrennt, die sich in der Interphase befanden. Zur Ausfällung der RNA wurden 600 µl Isopropanol zugegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (15000 g, bei 4°C) wurde das Pellet mit 70% (v/v) EtOH gewaschen, erneut für 15 Minuten (4°C) zentrifugiert, das Pellet getrocknet und dann in 20 µl DEPC H₂O aufgelöst. Der RNA-Gehalt wurde anschließend photometrisch gemessen (bei 260nm, SpectraFluor, Fa. Tecan, Crailsheim) und auf jeweils 1 µg/µl eingestellt. Zur Kontrolle wurde die RNA in einem 1% Standard Agarose-RNA-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid markiert und die Helligkeit digital photographisch festgehalten.

3.3.2. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die Cytochrom P450 CYP2C8/9 mRNA Expression wurde mit Hilfe der Standard - kalibrierten kompetitiven reversen Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) (rt-PCR Kit der Fa. Roche, Mannheim) bestimmt.

| | |
|------------------------|--|
| rt - PCR kit | Roche, Mannheim |
| Primer (5' → 3') | für CYP2C8/9 sense: aga caa cga gca cca ctc tg für CYP2C8/9 antisense: cct tgg gga tga ggt agt tt beide von MWG Biotech, Ebersberg |
| DNA Sequenzierung | Thermocycler (Fa. Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) |
| DEPC- H ₂ O | s. 3.3.1. |

Die rt-PCR ermöglicht es, eine sehr geringe Menge Gesamt-RNA mit Hilfe der RNA Polymerase in cDNA zu übersetzen und durch Zugabe von spezifischen Primern beliebige DNA Fragmente zu amplifizieren.

Hierfür wird der Reaktionsansatz mit einem Thermocycler 25-35 Zyklen erwärmt und abgekühlt. Das hitzebeständige Enzym Taq-Polymerase verdoppelt bei jedem Zyklus das gewünschte DNA Fragment exponentiell. Wir haben mit dieser one-step PCR extrahierte HUVEC-RNA in cDNA umgewandelt und das humane CYP2C8/9 spezifische cDNA Fragment der Länge 336 Basenpaare vervielfältigt. Hierfür verwendeten wir einen Thermocycler der Firma Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim). Die dazu angesetzte Mixtur bestand aus folgenden Teilen:

15,75 µl DEPC- H₂O, 5 µl rt-PCR Puffer mit Magnesium, 1,25 µl (100mM) DTT-Lösung, 0,5 µl (10 mM) dNTP-Mix (beinhaltet die zur Replikation eines einfachen DNA-Stranges benötigten Nukleoside Adenosin, Tyrosin, Cytosin und Guanin, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl unseres Primer-Mix (sense und antisense, beide 10 µM), 1µl unserer vorher extrahierten und auf 1 µg pro µl eingestellten RNA und 0,5 µl der gekühlt gehaltenen Taq-Polymerase. Es wurde möglichst steril und ständig auf Eis gearbeitet.

Diese Ansätze (Endvolumen 25 µl) wurden im Thermocycler zunächst 30 Minuten auf 55°C erwärmt, um die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umzuwandeln. Anschließend wurde die DNA 5 Minuten bei 95°C denaturiert, dann in 35 sich wiederholenden Zyklen von jeweils 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 56°C (Primer-Anlagerung) und 2 Minuten bei 72°C amplifiziert. Hierbei bindet jeweils der Primer für CYP2C8/9 in Syntheserichtung (5'→3' auf dem zu bildenden Strang) sowie in gegenläufiger Richtung auf dem Komplementärstrang. Abschließend folgte einmalige Inkubation für 4 Minuten bei 74°C und dann wurden die PCR-Produkte auf 4°C gehalten.

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Standard Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid markiert und die Helligkeit digital photographisch festgehalten, durch Restriktionsenzymverdau (s.3.3.3.) weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3. Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme spalten ein DNA-Fragment an spezifischer Basenabfolge. Mit der Methode des Restriktionsenzymverdaus spalteten wir die ursprünglich 336 bp langen Segmente in zwei kleinere Abschnitte (205 und 131 bp). Wir verwendeten hierzu das Restriktionsenzym Bcl1 (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Dafür bereiteten wir pro Probe einen Ansatz aus 2 µl aqua dest, 2 µl Puffer H (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot), 10 µl des jeweiligen PCR-Produkts und 1 µl des Restriktionsenzym. Dieser Ansatz wurde eine Stunde bei 55°C inkubiert und anschließend auf ein Standard Agarose Gel aufgetragen (s.3.3.4.) oder bei -20°C gelagert.

3.3.4. Gelelektrophorese

TBE-Puffer Tris-Borat-EDTA Pufferlösungen (TBE-Puffer, Fa. Gibco BRL, Life Technologies, Berlin)

DEPC- H₂O s. 3.3.1.

Es standen Gelkammern in verschiedenen Größen zur Verfügung. Wir gossen zweiprozentige Agarosegele, die aus 50 ml TBE-Puffer mit 1 g Agarose und 1 Promille Ethidiumbromid als Farbstoff bestanden. Sie wurden verrührt, kurz aufgeköcht und zügig in entsprechend dichte Formen gegossen. Darin befand sich ein Kamm, der nach Aushärtung entfernt, 12 Taschen zum Einfüllen von Proben freigab. Der Gelkasten wurde mit einprozentiger TBE-Pufferlösung und 2 Promill Ethidiumbromid gefüllt.

Die linke Tasche wurde jeweils mit einer Markerlösung beschickt, daneben wurden einzeln die zu untersuchenden DNA / RNA Proben eingefüllt. Jeder Ansatz hatte ein Endvolumen von 12 µl, davon waren 2 µl 6x Laufarbstoff, 1 µl DNA / RNA und der Rest DEPC- H₂O.

Bei konstant 50 mA Stromstärke lief das Gel ca. 120 min und konnte dann mit ultraviolettem Licht digital abfotografiert und ausgewertet werden.

3.3.5. Stabile Transfektion von Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9) in EA.hy926-Zellen (EA.hy-CYP2C9-Zellen)

EA.hy926 Medium s. 3.1.3.

FuGENE™ kompletter Fugene Transfections-Kit (Fa. Roche, Mannheim)

Um eine stabile CYP2C9 überexprimierende Zelllinie zu generieren, verwendeten wir Zellen der Endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 (s.3.1.3.). Für die Transfektion wurden ausschließlich Zellen verwendet, die nur 50%

konfluent waren. Das pcDNA3.1 Plasmid, in welches die CYP2C9 cDNA sowie eine Resistenz gegen das Antibiotikum F408 (Geneticin) kloniert wurde, wurde mit FuGENE™ im Verhältnis 1:3 gemischt. Es wurden 30 Minuten abgewartet, um die Komplexbildung in dem von Serum freien DMEM-Medium zu begünstigen. Pro 10 cm Zellkulturschale wurde 30 µg cDNA in einem Gesamtvolumen von 4 ml eingesetzt. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium gewechselt und serumhaltiges EA.hy926 Medium verwendet. Die Kontrollzellen wurden gleich behandelt, jedoch ohne cDNA.

Nach weiteren vier Tagen Kultivierung wurde bei allen Zellen das Medium durch ein das Antibiotikum Geneticin (0,2 µg/ml) enthaltende EA.hy926 Medium ersetzt. Diese minimale Hemmkonzentration von 0,2 µg/ml Geneticin hatten wir vorher durch Erstellen einer Konzentrationsreihe getestet. Nach sieben Tagen, bei täglichem Mediumwechsel, überlebte keine EA.hy926 Zelle, welche nicht die Resistenz in ihr Genom eingebaut hatte. Die nach sieben Tagen lebenden Zellen wurden abgelöst und auf 96-Loch-Zellkulturschalen gesplittet, um verschiedene Klone zu trennen. Die unter den anhaltenden Geneticin-Bedingungen gewachsenen Klone wurden abgelöst und weiterkultiviert. Diese stabile Zelllinie wurde zur nach CYP2C9 Proteinanalyse (s.3.4.1.) zur Generierung von Überständen (s.3.5.1.) verwendet.

3.4. Proteinchemische Methoden

3.4.1. Proteinisolation aus EA.hy926-Zellen

| | |
|------------------|--|
| PBS ⁻ | s. 3.1.1. |
| Lysispuffer | 20mM monobasisches Kaliumphosphat pH 7.0 100mM NaF, 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1mM PMSF, 2mM Na ₃ VO ₄ ,1 mM EDTA, 2µg / ml Leupeptin, 2µg / ml Pepstatin, 1% Triton |

Konfluente EA.hy926-Zellen (Zellkulturschalendurchmesser 10 cm) wurden 2 mal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, mit 100 µl Lysispuffer behandelt und mit Hilfe eines Zellscrapers abgelöst. Die Zellsuspension wurde zusätzlich mittels viermaligen Ziehens durch eine 29 gauge Nadel mechanisch homogenisiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 10000 g wurde der Überstand abgenommen und damit eine Proteinbestimmung durchgeführt (s.3.4.2.).

3.4.2. Proteinbestimmung

Methode nach Biuret

| | |
|------------------------|---|
| Protein Test-Reagenz A | KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland |
| Protein Test-Reagenz B | 4% CuSO ₄ * H ₂ O in bidest. Wasser |
| BSA Lösung | 1 mg / ml |

690 - 700 µl H₂O, 200 µl Protein Test-Reagenz A + B und bis zu 10 µl Zellysat wurden in eine Küvette gegeben und die Extinktion bei 550 nm photometrisch bestimmt. Anhand einer parallel erstellten linearen Eichreihe mit 1 - 15 µg BSA / 900 µl Lösung konnte der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

3.4.3. SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Methode nach Laemmli 1970, verändert

| | |
|----------------------------------|--|
| Acrylamid Lösung | 40% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) Bisacrylamid |
| SDS | 10% (w/v) |
| APS | 10% (w/v) Ammoniumpersulfat |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid |
| Elektrophoresepuffer | 25 mM Tris HCl pH 8.5, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS |
| 4x Trenngelpuffer | 1,5 M Tris HCl pH 8,8 |
| 4x Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris HCl pH 6,8 |
| 2x Probenpuffer (reduzierend) | 0,125 M Tris HCl pH 6,8 , 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glyzerin, 0,02% Bromphenolblau (w/v), 200 mM Mercaptoethanol |

Die Auftrennung der Proteine erfolgte für den anti-CYP2C9 Western-Blot in einem 10 %-igen Polyacrylamid - Trenngel unter denaturierenden Bedingungen. Zur Herstellung des Trenngels wurden für das 10 %-ige Gel 7,5 ml Acrylamidlösung, 10,9 ml H₂O und 6,25 ml Trenngelpuffer gut gemischt und dann ca. 20 Minuten entgast. Nach Zugabe von 250 µl 10% SDS, 125 µl APS wurde die Lösung erneut gut gemischt. Zuletzt wurde 12,5 µl Tetramethylethylendiamid zum Aushärten (Polymerisieren) zugegeben und der Ansatz zwischen zwei Glasplatten gegeben, die durch 1 mm dicke Spacer getrennt waren. Dieser Ansatz war nach ca. 30 Minuten, unter Überschichtung mit H₂O gesättigtem Isobutanol, polymerisiert. Der Alkohol wurde anschließend durch gründliches Waschen entfernt und ein 4 %-iges Sammelgel, welches unter identischen Bedingungen wie das Trenngel hergestellt worden war, auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Gel wurde ein Probenkamm gesteckt. Die so entstandenen Probenaschen wurden nach dem Auspolymerisieren gründlich mit H₂O ausgespült und anschließend die Proben, die zuvor mit Hilfe des reduzierenden Probenpuffers (Verhältnis 1:1) und 5 Minuten Kochen bei 100°C denaturiert wurden, aufgetragen. Die Elektrophorese

wurde bei einer Stromstärke von 65 mA im Elektrophoresepuffer über 3 Stunden ausgeführt.

3.4.4. Western - Blotting für CYP2C9

Transferpuffer 39 mM Glycin, 48 mM Tris HCl pH 8.0, 0,037% (w/v)
 SDS, 10% (v/v) Methanol

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Gel und die Membran wurden hierzu 10 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Zwei Lagen Filterpapier, in Transferpuffer getränkt, wurden glatt und luftblasenfrei auf eine Graphitanode gelegt, darauf die Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Lagen des mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapiers. Bei einer Stromstärke von 0,7 mA/ cm² Gelfläche wurden die Proteine nach Auflegen der Graphitkathode auf die Membran transferiert.

3.4.5. Färbung von Proteinen

Methode nach Sambrook et al. 1989

Ponceau S Lösung 0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure

Zur Detektion der auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine und zur Überprüfung eines gleichmäßigen Proteinauftrages wurde die Membran 5 Minuten mit Ponceau S Lösung inkubiert. Durch Waschen mit H₂O wurde die Hintergrundfärbung entfernt. Anschließend wurden die gefärbten Proteinbanden mit Hilfe einer Kamera aufgenommen.

3.5. Immunologische Methoden

3.5.1. Immunoprint für CYP2C9

nach Herstellerangaben, Boehringer Mannheim, Deutschland

| | |
|--------------------------------------|--|
| PBS ⁻ | s. 3.1.1. |
| Blockierender Puffer | 5% Trockenmilch in PBS |
| Waschpuffer | 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20 (pH 7.5) |
| Luminollösung | 100 mM Tris pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Coumaric acid in H ₂ O |
| H ₂ O ₂ Lösung | 100 mM Tris pH 8,5, 1,5 % H ₂ O ₂ in H ₂ O |

Erstantikörper:

anti - CYP2C9 IgG, rabbit

Zweitantikörper:

anti - IgG rabbit, Peroxidase konjugiert: Santa Cruz (USA)

Der Nachweis von Proteinen, nach Proteintransfer auf die Membranen, erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran auszuschließen, wurden diese unter Schütteln 30 Minuten mit blockierendem Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran blockiert. Danach wurde 4 x 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und die Membran mit dem spezifischen Antikörper (Erstantikörper: anti - CYP2C9) zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten vier weitere Waschschrte mit Waschpuffer je 15 Minuten und die zweistündige Inkubation mit Peroxidase konjugiertem Zweitantikörper (anti - rabbit IgG) bei Raumtemperatur. Abschließend wurde erneut 4 x 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die vom Erstantikörper gebundenen Proteine auf der Membran konnten nun indirekt über den gebundenen Zweit-

antikörper mittels Peroxidasereaktion detektiert werden. Hierfür wurden Luminollösung und H₂O₂ Lösung im Verhältnis 1:1 auf die Membran gegeben und dann die Chemilumineszenzintensität durch Belichtung eines Röntgenfilms registriert. Die Auswertung der Proteinbandenintensität des Röntgenfilms erfolgte densitometrisch (Software: Molecular Analyst, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

3.6. Sonstige Assays

3.6.1. Bioassay für EDHF

PBS⁺ s. 3.3.1.

Thrombozyten- s. 3.1.4.

Resuspensionspuffer

Um zu untersuchen, ob kultivierte venöse Endothelzellen (HUVEC) einen Cytochrom P450 2C8/9-abhängigen Faktor freisetzen, der Thrombozyten beeinflusst, wurde ein Bioassay zur Herstellung von EDHF ausgearbeitet: Wie in Abbildung 4 verdeutlicht, haben wir die aus einer menschlichen Nabelschnur gewonnenen HUVEC unter sich unterscheidenden Bedingungen kultiviert. In das Medium der einen Zellkulturschale gaben wir täglich die bekannten CYP2C8/9 Induktoren Nifedipin (100 nmol/L) (44) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie β -Naphthoflavon (3 μ mol/L) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Zellen der anderen Schale blieben unbehandelt und wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden beide Ansätze auf jeweils drei 10 cm Zellkulturschalen gesplittet und weiter wie oben beschrieben unterschiedlich bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden alle Zellen mit N _{ω} -Nitro-L-Arginin (L-NA, 100 μ mol/L) (Fa. Serva, Feinbiochemika, Heidelberg), zur Blockade der NO-Synthase, und mit Indomethacin (20 μ mol/L) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), zur Blockade der

Cyclooxygenase, 30 Minuten vorbehandelt. Anschließend wurden jeweils zwei der drei Zellschalen mit dem Stimulus Bradykinin (100 nmol/L) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 5 Minuten behandelt. Jeweils eine dieser Schalen wurde vorher zusätzlich 30 Minuten mit dem CYP2C9 Inhibitor Sulfaphenazol (3 μ M) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Der dritte Teil der Zellen wurden als Kontrolle nicht stimuliert oder inhibiert.

Dann wurden alle Zellen möglichst schnell dreimal mit 10 ml vorgewärmten PBS⁺ gewaschen, um die zugegebenen Reagenzien auszuwaschen. Zur Sammlung der Substanzen, die von den unterschiedlich behandelten Endothelzellen freigesetzt wurden, gaben wir zu allen Zellschalen 10 ml vorgewärmten Thrombozyten-Resuspensionspuffer. Der Zellüberstand wurde nach 30 Minuten abgenommen. Anschließend wurde dieser Überstand sofort auf Eis aliquotiert und umgehend bei -20°C bzw. -80°C eingefroren. Er wurde später verwendet, um die Auswirkungen auf Thrombozyten zu untersuchen. Hierfür gaben wir jeweils 100 μ l der Überstände zu den in jeweils 500 μ l Puffer resuspendierten und auf eine Konzentration von 200.000 / μ l eingestellten Thrombozyten. Zu den Kontrollen wurden zum Vergleich ebenfalls 100 μ l Puffer gegeben.

Die HUVEC-Zellen wurden nach der Überstände-Gewinnung teilweise zur RNA-Gewinnung (s. 3.3.1.), die EA.hy926-Zellen teilweise zur Protein Isolierung (s. 3.4.1.) verwendet.

In Abbildung 3 ist der oben beschriebene EDHF-Bioassay zum besseren Verständnis noch einmal schematisch dargestellt.

Der EDHF-Bioassay

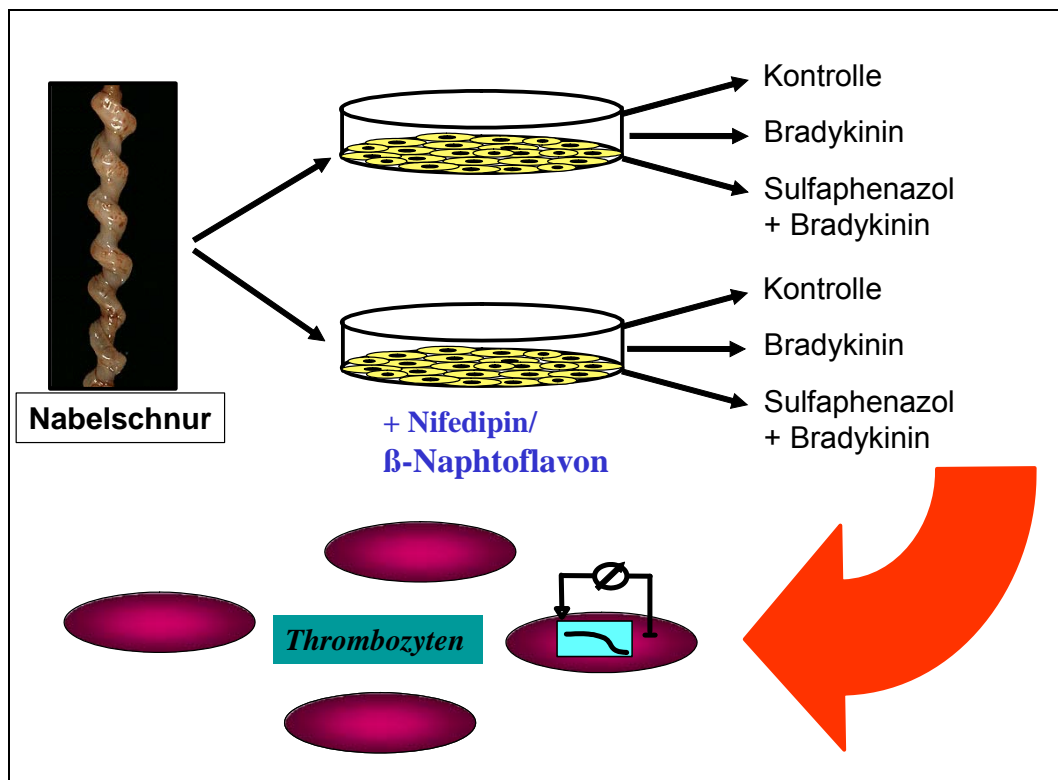


Abbildung 3: Schematische Darstellung des EDHF-Bioassays. Die aus einer Nabelschnur isolierten HUVEC wurden auf 2 Zellkulturschalen kultiviert, wovon einer täglich Nifedipin und β -Naphtoflavin (als CYP Induktoren) zugegeben wurde. Nach unterschiedlicher Behandlung wurden die HUVEC-Überstände gesammelt und mit Bis-oxonol gefärbten Thrombozyten inkubiert. Anschließend wurde das thrombozytäre Membranpotential durchflußzytometrisch gemessen.

3.6.2. In vitro Assay zur Messung der Thrombozyten-Endothel-Adhäsion

Methode nach Verheul 2000, verändert

PBS⁺ s. 3.3.1.

Thrombozyten- s. 3.1.4.

Resuspensionspuffer

Um die Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten an kultivierten Endothelzellen (HUVEC) zu messen, verwendeten wir einen in vitro

Adhäsionsassay, der von Verheul et al. beschrieben wurde (154), mit kleinen Veränderungen.

HUVEC der ersten Subpassage wurden über Nacht in 24-Loch Zellkulturschalen in reinem Endothelzell-Wachstumsmedium (Fa. Promo-Cell, Heidelberg) bis zur Konfluenz kultiviert. Am Tag des Experiments wurde humanes PRP mit 5 μM (w/v) des membrangängigen Fluoreszenz-Farbstoffes Calcein-AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 30 Minuten bei Dunkelheit und 37°C inkubiert. Kurz vor Zentrifugation des PRP wurde 10 ng/ml Prostazyklin (w/v) (Iloprost, Schering, Berlin) zugegeben. Nach Zentrifugation wurden die markierten Thrombozyten so in Resuspensionspuffer aufgenommen, dass eine Konzentration von 400.000/ μl resultierte (ausführlich beschrieben unter 3.1.4.). Anschließend wurden die Thrombozyten mit verschiedenen Reagenzien und Überständen behandelt (s. Ergebnisteil).

Die in den 24-Loch Zellkulturschalen konfluenten HUVEC wurden mit PBS⁺ gewaschen, dann wurde pro Loch 200 μl neues Medium zugegeben. Anschließend wurde die endgültige Thrombozytenmenge, 200 Millionen pro Loch (absolut), zugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Teil der Thrombozyten immer mit 0,2 $\mu\text{g/L}$ Abciximab (Reopro, Centocor B.V., Leiden, Niederlande) behandelt. Es handelt sich hierbei um das Fab-Fragment eines chimären monoklonalen Antikörpers, der gegen den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor von Thrombozyten gerichtet ist. Um die Hintergrund-Fluoreszenz als Leerwert subtrahieren zu können, wurde in jeweils mindestens zwei Löcher mit konfluenten Endothelzellen anstelle von Thrombozyten nur ihr Resuspensionspuffer zugegeben und der Leerwert gemessen. Die Thrombozytenadhäsion an kultivierten Endothelzellen wurde mittels Zentrifugation für zehn Minuten bei 600 g induziert. Nach dem ungebremsten Auslaufen der Zentrifuge wurden die 24 Loch Zellschalen mit den adhärenen Thrombozyten 15 Minuten bei Dunkelheit und 37°C inkubiert.

Vor Messung wurden die HUVEC mit jeweils 500 μl / Loch angewärmtem PBS⁺ mit einer Multipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) viermal gleichförmig gewaschen, um alle nicht adhärenen Thrombozyten zu entfernen. Es wurde darauf geachtet, dass der HUVEC-Zellrasen nicht beschädigt

wurde. Um das zu kontrollieren, wurde vor Fluoreszenz-Messung jedes Loch mittels Lichtmikroskop inspiziert. Es wurden nur die Löcher ausgewertet, bei denen der Zellrasen vollständig intakt war.

Die Fluoreszenz der adhärennten Thrombozyten wurde mittels eines 24-Loch Platten Fluoreszenz-Messers (SpectraFluor, Fa. Tecan, Crailsheim) gemessen. Angeregt wurde mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Anregung}} = 488 \text{ nm}$, gemessen bei $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 4). Jedes Loch wurde von dem Gerät mehrfach an verschiedenen Stellen gemessen und der Wert gemittelt. Nach Subtraktion des Leerwertes (s.o.) wurden die erhaltenen Fluoreszenzwerte in Prozent von Kontrolle umgerechnet.

Fluoreszenzspektra von Calcein-AM

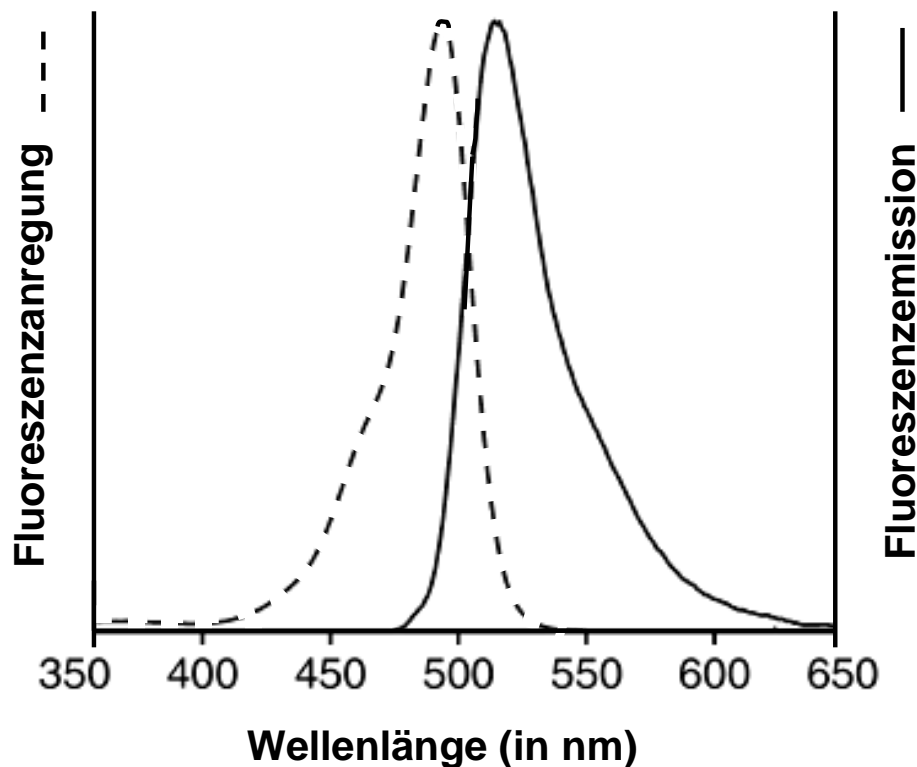


Abbildung 4: *Spektra für Anregung und Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein-AM.*

3.7. Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwerte +/- SEM und als Prozent von Kontrollwerten dargestellt. Die Resultate wurden mit dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte bzw. gepaarte Werte verglichen. Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, so wurde hierfür der ANOVA Test verwendet.

Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 Prozent lag ($p < 0.05$).

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma-Plot für Windows (Version 7.0) in Form von Balken - oder Liniendiagrammen sowie von PowerPoint (Version 2000).

4. Ergebnisse

4.1. Thrombozytäres Membranpotential

4.1.1. Ruhemembranpotential

In unbehandelten Thrombozyten nahm bei physiologischer extrazellulärer Kaliumkonzentration von 5 mmol/L das DiBAC₄(3) Fluoreszenzsignal nach Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin (Fa. Calbiochem, San Diego, U.S.A.) stetig ab und erreichte nach ca. 5 Minuten wieder ein „steady state“. Bei Valinomycinkonzentrationen von >2 µM nahmen die Fluoreszenzwerte nicht weiter ab (n=15).

Resuspendierte und mit DiBAC₄(3) markierte Thrombozyten wurden bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen jeweils 5 Minuten mit 2 µM Valinomycin inkubiert und anschließend die Fluoreszenzwerte im Durchflußzytometer gemessen. Abbildung 5 zeigt repräsentative Ergebnisse der Fluoreszenzmessung bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. In Abb. 6 wurden die Mittelwerte der gemessenen Werte in einer Eichgeraden aufgetragen (n = 10).

Durchflußzytometrie der Eichreihe

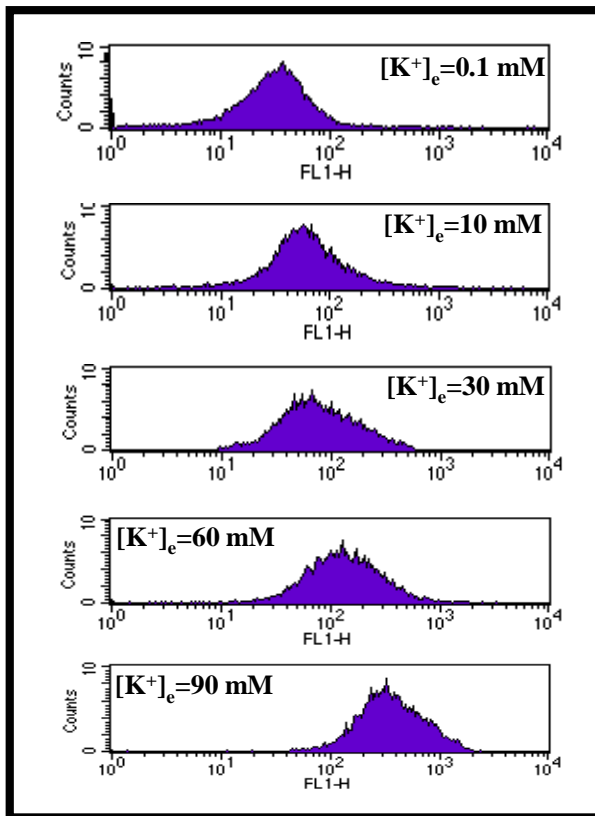


Abbildung 5: Durchflußzytometrische Messungen der Eichreihe. Thrombozyten wurden bei Anwesenheit von Valinomycin ($2 \mu\text{M}$ nach 5 min Inkubation) in 10, 20, 30, 60 und 90 mM Kalium-haltigen Puffer resuspendiert (Bilder von oben nach unten). Dies resultierte in einer Zunahme der Fluoreszenzwerte, was Depolarisation bedeutet.

Einfluss verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen auf die DiBAC₄(3) - abhängige Fluoreszenz von Thrombozyten

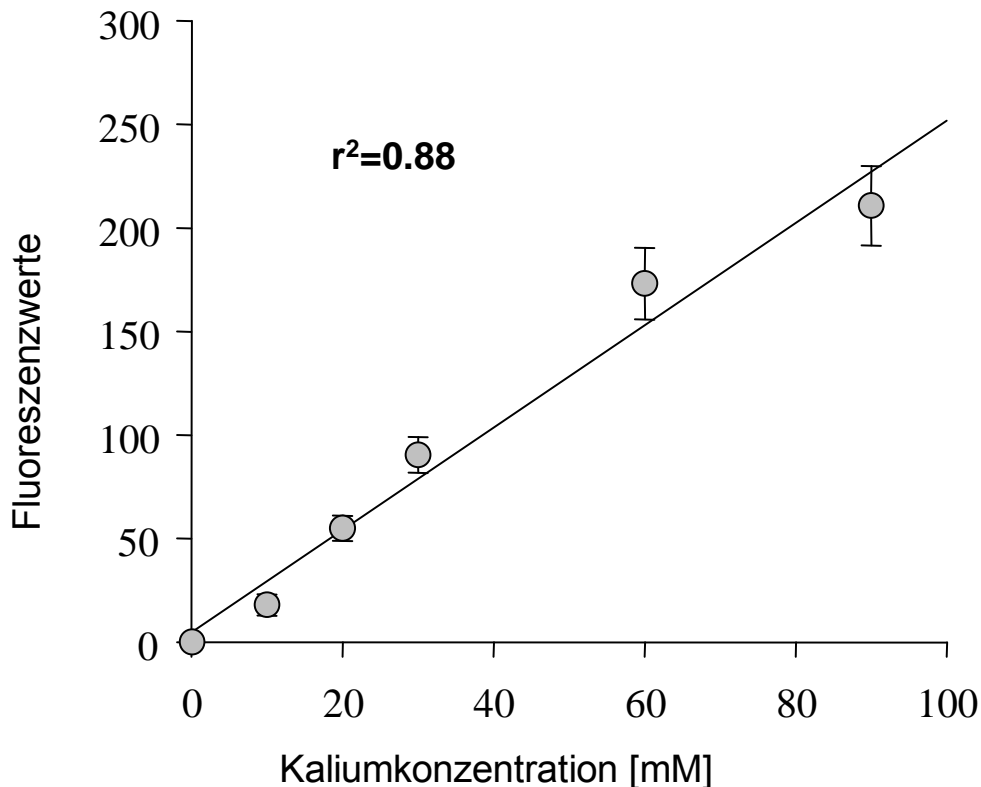


Abbildung 6: Mittlere Eichgerade ($n = 10$) von mit Bis-oxonol markierten und mit Valinomycin ($2 \mu\text{M}$ nach 5 min Inkubation) hyperpolarisierten Thrombozyten, die in Kalium-Puffern verschiedener Konzentrationen resuspendiert sind. Es zeigt sich die annähernd lineare Zunahme der Fluoreszenzwerte (Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,88$), der Depolarisation entsprechend (Mittelwerte: $17,90 \pm 5,19$; $54,91 \pm 6,05$; $90,35 \pm 8,66$; $173,15 \pm 17,28$; $210,75 \pm 19,14$; von jeweils 10 Experimenten).

Obige Eichgerade zeigt eine annähernd lineare Beziehung zwischen thrombozytären Bis-oxonol Fluoreszenzwerten und externen Kaliumkonzentrationen $[\text{K}^+]_e$ im Bereich 0,1-90 mM (Abb. 6). Mit Hilfe dieser Null-Punkt Methode (117) wurde unter der Annahme, dass das Ruhemembranpotential in Gegenwart von Valinomycin nahe dem Kalium-Gleichgewicht liegt, das Ruhemembranpotential anhand der Nernst-Gleichung abgeschätzt.

$$\text{Nernst-Gleichung: } E_{\text{K}^+} = R \cdot T \cdot (F \cdot z_{\text{K}^+})^{-1} \cdot \ln ([\text{K}^+]_e / [\text{K}^+]_i),$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T die Arbeitstemperatur (in Kelvin), F die Faraday-Konstante ($9,65\cdot 10^4 \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}$) und z die jeweilige Ionen-Ladung (1 für K^+) ist. Durch Einsetzen der Werte vereinfachte sich die Gleichung wie folgt:

$$E_{\text{K}^+} = -61 \text{ mV} \cdot \log \left(\frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_e} \right).$$

Für die intrazelluläre Kalium-Konzentration von Thrombozyten $[\text{K}^+]_i$ nahmen wir den in der Literatur beschriebenen Wert von 140 mM an (52; 117). Bei bekannter extrazellulärer Kalium-Konzentration $[\text{K}^+]_e$ konnte so jeweils ein Membranpotential errechnet und eine Eichgerade erstellt werden, die es erlaubte, aus den Fluoreszenzwerten näherungsweise das Membranpotential in mV zu bestimmen.

Unter Verwendung dieser Methode ergab sich als durchschnittliches thrombozytäres Ruhemembranpotential in physiologischem Puffer ($\text{K}^+ = 2,7 \text{ mmol/L}$) ein Wert von $-57,7 \text{ mV} \pm 9,4 \text{ mV}$ ($n = 30$). Dieser Wert entsprach näherungsweise den Werten, die auch von anderen Arbeitsgruppen, zum Teil mit elektrophysiologischen Methoden (single-cell patch-clamp), an Thrombozyten erhoben und publiziert wurden (52; 91).

4.1.2. Effekt von „EDHF“ auf das thrombozytäre Membranpotential

Um nun zu überprüfen, ob menschliche Endothelzellen (HUVEC) einen Faktor freisetzen, der im Stande ist, menschliche Thrombozyten zu beeinflussen, wählten wir den unter 3.5.1. beschriebenen Bioassay.

Im Vergleich zu Kontroll-Puffer ohne Zellkontakt konnten weder die Überstände von Kontrollzellen ($n = 12$) noch die Überstände von Zellen, die mit den bekannten CYP2C Induktoren Nifedipin (100 nmol/L) (44) und β -Naphthoflavon ($3 \text{ } \mu\text{mol/L}$) bis zur Konfluenz gewachsen waren, Thrombozyten signifikant hyperpolarisieren ($n = 19$).

Wurden die bis zur Konfluenz mit Nifedipin und β -Naphthoflavon behandelten Zellen jedoch 5 Minuten vor Gewinnung der Überstände mit Bradykinin (100 nmol/L) (57; 115) stimuliert, hatten die Überstände eine signifikant hyperpolarisierende Wirkung auf Thrombozyten ($n = 22$, $p < 0.05$ Überstände von Kontroll-Zellen) (Abb.7). Bradykinin allein hatte keine hyperpolarisierende Wirkung auf Thrombozyten. Die hyperpolarisierende Wirkung der Überstände konnte durch vorherige Inkubation der HUVEC Zellen mit dem bekannten CYP2C9 Hemmer Sulfaphenazol (30 μ mol/L) trotz anschließender Bradykinin-Stimulation signifikant gehemmt werden. Diese Überstände hatten keine hyperpolarisierende Wirkung mehr auf Thrombozyten ($n = 13$, $p < 0.05$ gegen Bradykinin) (Abb.7).

Hyperpolarisierende Wirkung der EDHF Überstände auf Thrombozyten

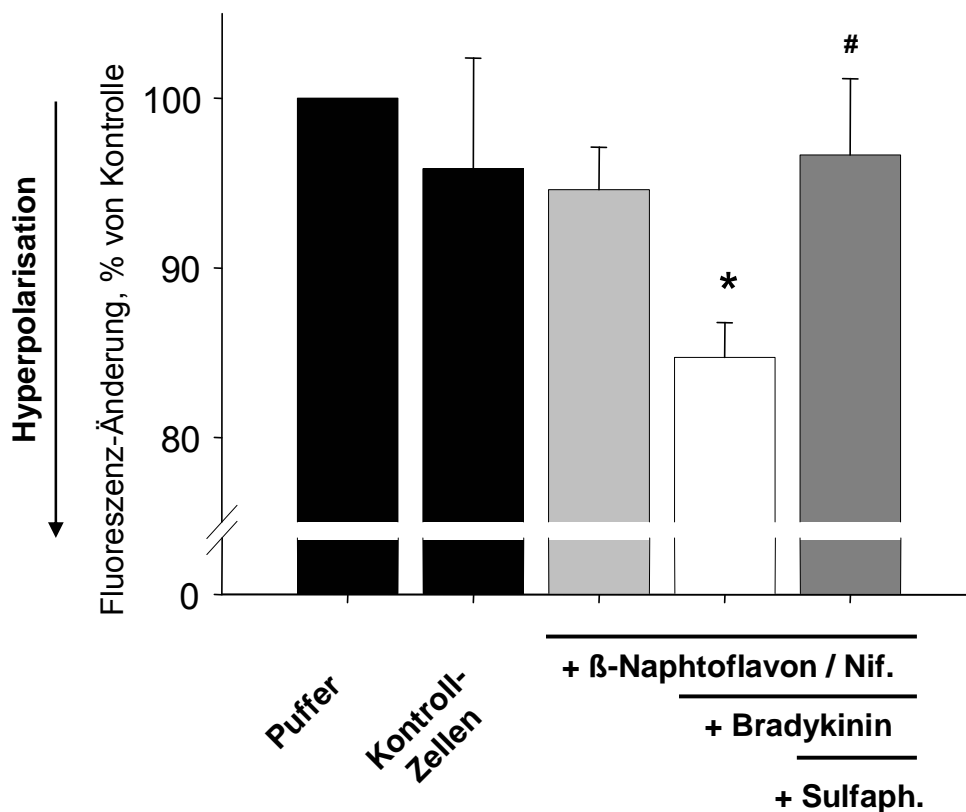


Abbildung 7: Thrombozytäre Membranpotentialmessung nach Inkubation mit verschiedenen HUVEC-Überständen. Die Fluoreszenzwerte sind in % von Kontroll-Puffer angegeben. Es zeigt sich eine thrombozytär hyperpolarisierende Wirkung der HUVEC Überstände, deren Zellen mit Nifedipin und β -Naphthoflavon gewachsen, sowie mit Bradykinin stimuliert wurden ($n=22$, *: $p < 0.05$ gegen Kontrolle). Kein Effekt mehr nach Vorinkubation der HUVEC mit Sulfaphenazol ($n = 13$, #: $p < 0.05$ gegen Bradykinin Hyperpolarisation).

Sämtliche Überstände wurden in Gegenwart des NO-Synthasehemmers L-NA (100 $\mu\text{mol/L}$) und des Cyclooxygenasehemmers Indomethacin, (20 $\mu\text{mol/L}$) gewonnen (vgl. 3.5.1.), weshalb bei diesem Bioassay eine hyperpolarisierende Wirkung von NO und Prostazyklin auf Thrombozyten vernachlässigt werden kann. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass es sich um einen anderen hyperpolarisierenden Faktor („EDHF“) handelt. Wir haben daher die signifikant hyperpolarisierenden Überstände im Folgenden als „EDHF“-haltige Überstände bezeichnet.

4.1.3. Beteiligte Ionenkanäle

Um nun zu überprüfen, ob der von HUVEC freigesetzte Faktor seine hyperpolarisierende Wirkung über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt, haben wir drei K_{Ca} -Hemmstoffe verwendet.

Der Hemmstoff Charybdotoxin (50 nmol/L , $n = 5$, $p < 0.01$) konnte die hyperpolarisierende EDHF-Wirkung komplett aufheben. Allerdings blockiert Charybdotoxin nicht nur K_{Ca} -Kanäle mittlerer (IK_{Ca}) und großer (BK_{Ca}) Leitfähigkeit sondern auch die in Thrombozyten stark exprimierten spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (K_V -Kanäle) und hat daher eine stark depolarisierende Wirkung auf Thrombozyten $-18,2 \pm 2 \text{ mV}$ (50 nmol/L , $n = 7$) (Abb. 8, Tabelle 1).

Iberiotoxin (500 nmol/L), welches ein spezifischer Hemmstoff der BK_{Ca} -Kanäle ist, konnte die thrombozytäre Hyperpolarisation durch EDHF haltige Überstände ebenfalls signifikant hemmen ($n = 5$, $p < 0.05$), wohingegen es allein keinen Effekt auf Thrombozyten hatte (Abb. 8, Tabelle 1).

Apamin (500 nmol/L), ein spezifischer Hemmstoff der K_{Ca} -Kanäle geringer Leitfähigkeit (SK_{Ca}), hatte keinen signifikanten Effekt auf das thrombozytäre Membranpotential ($n = 9$) (Abb. 8, Tabelle 1).

Einfluss verschiedener K_{Ca} -Kanal Hemmstoffe auf EDHF-Wirkung

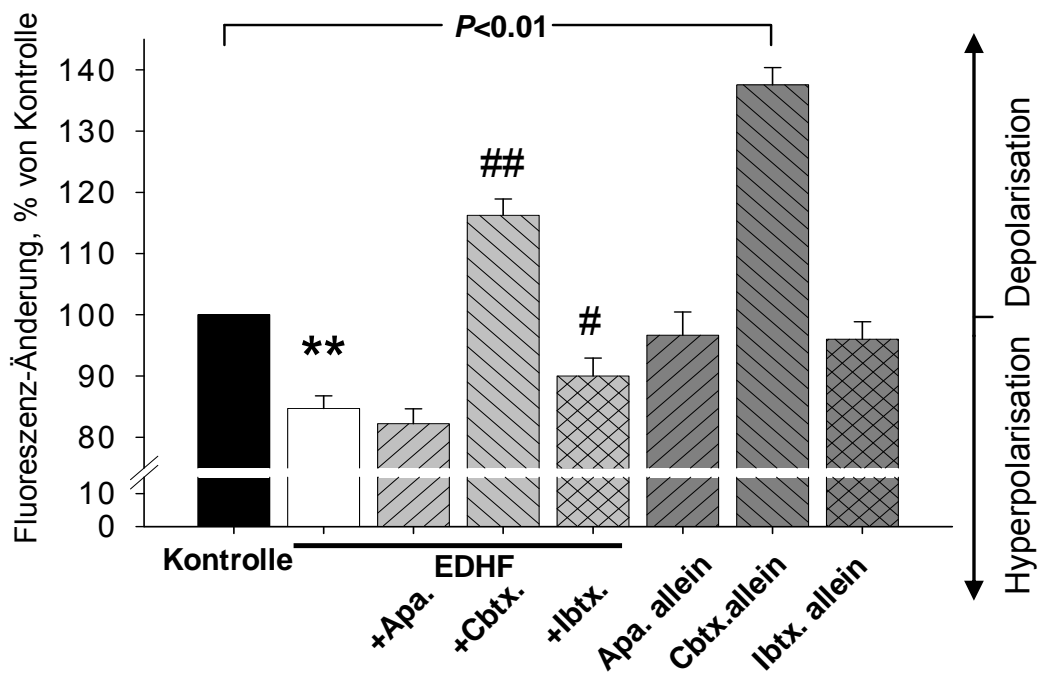


Abbildung 8: Einfluss verschiedener K_{Ca} -Kanal Hemmstoffe auf die thrombozytär hyperpolarisierende Wirkung des von Endothelzellen freigesetzten EDHF-Faktors ($n = 9$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Apamin (Apa) (500 nmol/L) hatte keinen Effekt ($n = 9$), Charybdotoxin (Cbtx) (50 nmol/L) konnte die Hyperpolarisation komplett aufheben ($n = 5$, #: $p < 0.01$ gegen EDHF) und hatte auch allein eine stark depolarisierende Wirkung auf Thrombozyten ($n = 7$). Iberiotoxin (Ibtx) (500 nmol/L) konnte die hyperpolarisierende EDHF-Wirkung ebenfalls signifikant aufheben ($n = 5$, #: $p < 0.05$ gegen EDHF) und hatte allein praktisch keinen Effekt auf das Membranpotential von Thrombozyten. (negative Fluoreszenzänderung entspricht Hyperpolarisation, positive Fluoreszenzänderung entspricht Depolarisation)

4.1.4 PCR und Restriktionsenzymverdau von CYP2C8/9

Um den Zusammenhang der hyperpolarisierenden Wirkung mit der Ausprägung des CYP2C8/9-Gens zu untersuchen, isolierten wir mRNA aus den unterschiedlich bis zur Konfluenz gewachsenen HUVEC-Zellen und führten eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch.

Es zeigte sich eine deutlich stärkere Expression des CYP2C8/9-Gens bei den HUVEC-Zellen, die mit Nifedipin und β -Naphtoflavin gewachsen waren, als bei den HUVEC, die unter Kontroll-Bedingungen bis zur Konfluenz gewachsen waren ($n = 3$) (Abb.9).

Das CYP2C8-Gen besteht aus 336 Basenpaaren. Um zu verifizieren, dass es sich bei unseren Banden tatsächlich um die CYP2C8-Expression handelt, führten wir einen spezifischen Restriktionsenzym-verdau mit Bcl1 (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) durch. Es zeigten sich die zwei erwarteten spezifischen Banden des gesparteten CYP2C8 Fragmentes, welche die Hochregulation des CYP2C8/9-Gens durch Nifedipin und β -Naphtoflavin verifizierten ($n = 3$) (Abb.10).

rtPCR des CYP2C8/9-Gens

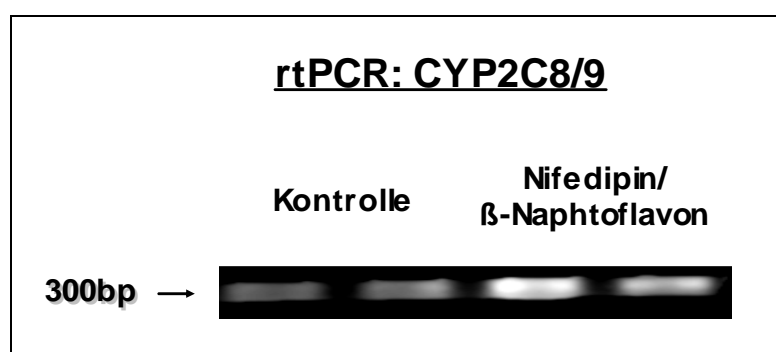


Abbildung 9: Repräsentative rtPCR des CYP2C8/9-Gens von HUVEC. Deutlich kräftigere Banden zeigen HUVEC, die mit Nifedipin und β -Naphtoflavin gewachsen sind, im Vergleich zu den Banden der HUVEC, die unter Kontroll-Bedingungen bis zur Konfluenz gewachsen sind ($n=3$).

Restriktionsenzymverdau des CYP2C8/9-Gens mit Bcl1

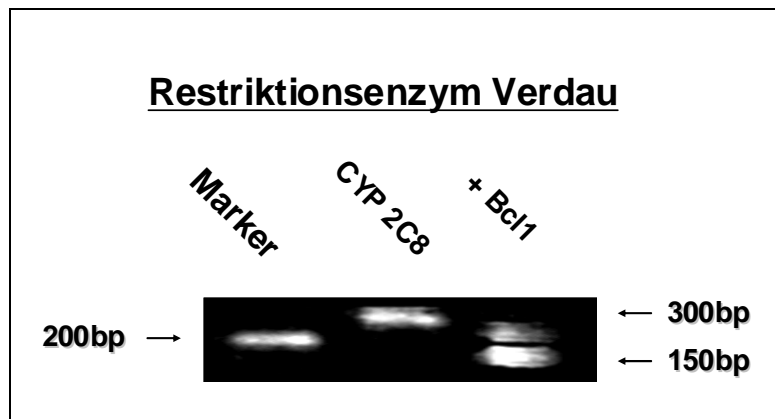


Abbildung 10: Repräsentative *rtPCR* des CYP2C8 Restriktionsenzymverdaus mit Bcl1. Das CYP2C8 Fragment wird von Bcl1 an spezifischer Stelle in zwei kleinere Fragmente gespaltet, was die CYP2C8 Bande verifiziert ($n=3$).

4.1.5. Effekt von EETs auf das thrombozytäre Membranpotential

Da Epoxyeicosatriensäuren (EETs) in vielen Gefäßbetten als ein möglicher EDHF identifiziert worden sind und CYP2C-abhängig gebildet werden, untersuchten wir als nächstes den Einfluss von extern zugegebenen EETs auf das thrombozytäre Membranpotential.

Um den optimalen Messzeitpunkt zu eruieren, fertigten wir zunächst eine Zeitkurve der Wirkung des 11,12-Stereoisomers (11,12-EETs), für das bei Beginn der Arbeit die meisten Literaturdaten vorlagen, auf Thrombozyten an. Nach Zugabe von 11,12-EET sanken die Fluoreszenzwerte über 7-10 Minuten, einer Hyperpolarisation entsprechend, deutlich ab. Nach ca. 10 Minuten stellte sich ein „steady state“ ein. Durch Zugabe von Gramacidin (100 nmol/L), einem Kationenionophor, stiegen die Fluoreszenzwerte deutlich an, was einer starken Depolarisation entspricht (Abb. 11).

Um nun zu untersuchen, welche EET-Isoform Thrombozyten am stärksten hyperpolarisiert, registrierten wir die Fluoreszenzwerte stets nach 10 Minuten Inkubation.

Kinetik der 11,12-EET Hyperpolarisation

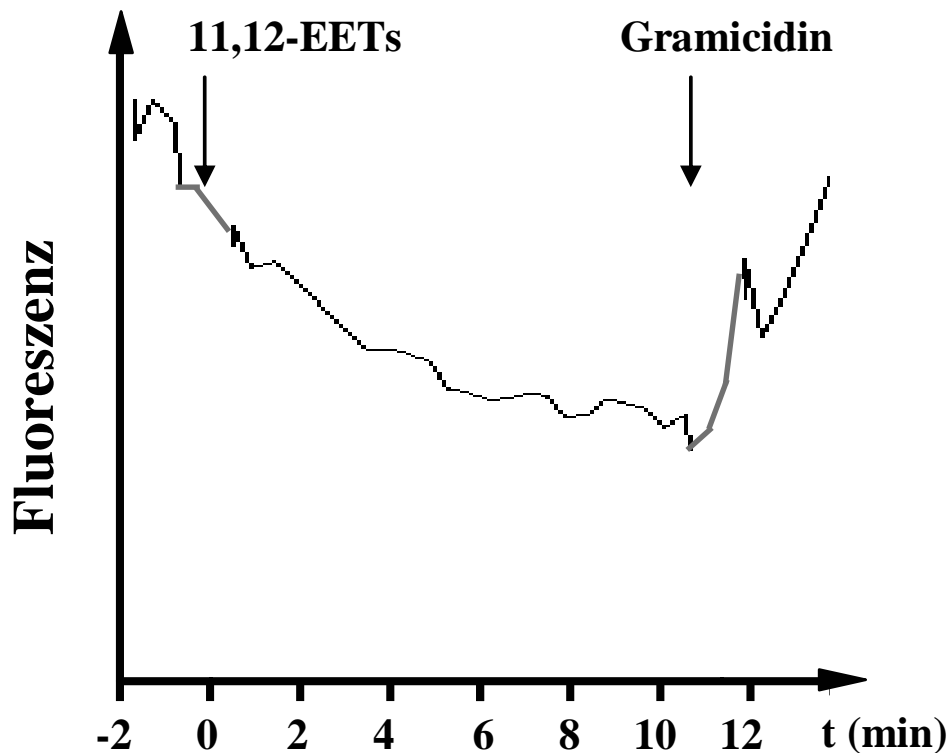


Abbildung 11: Zeitliche Entwicklung der Bis-oxonol - Fluoreszenzwerte menschlicher Thrombozyten nach 11,12-EET Zugabe ($1 \mu\text{M}$) (Hyperpolarisation) und anschließender Depolarisation nach Gramicidin Zugabe (100 nmol/L).

Alle verwendeten Isoformen (5,6- 8,9- 11,12- 14,15-EETs) hyperpolarisierten bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Thrombozyten signifikant. 11,12-EETs bewirkten die größte Abnahme des thrombozytären Membranpotentials (Ruhepotential: $-57,7 \text{ mV}$) auf $-69,4 \pm 2 \text{ mV}$ ($n = 12$, $p < 0.01$), 8,9-EETs hyperpolarisierten auf $-66,5 \pm 2 \text{ mV}$ ($n = 13$, $p < 0.01$) und 14,15-EETs auf $-63,2 \pm 4 \text{ mV}$ ($n = 13$, $p < 0.01$, jeweils gegen Kontrolle).

Da jedoch nur die 11,12-EET Isoform Thrombozyten auch schon mit einer Konzentration von 100 nM signifikant auf $-62,2 \pm 3 \text{ mV}$ hyperpolarisieren konnte ($n = 8$, $p < 0.05$ gegen Kontrolle) und am meisten in der Literatur beschrieben war, entschlossen wir uns dazu, die folgenden Experimente mit der 11,12-EET Isoform durchzuführen.

Die Membranpotentialwerte (in mV) sind in Tabelle 1 (siehe 4.1.5, S. 54) zusammengefasst, während die gemessenen relativen Fluoreszenzänderungen in nachfolgender Abbildung 12 dargestellt sind. Bei dieser Darstellung entspricht 1 % Fluoreszenzänderung annähernd 1 mV Membranpotential-Änderung.

Thrombozytäre Hyperpolarisation mit verschiedenen EET-Isoformen

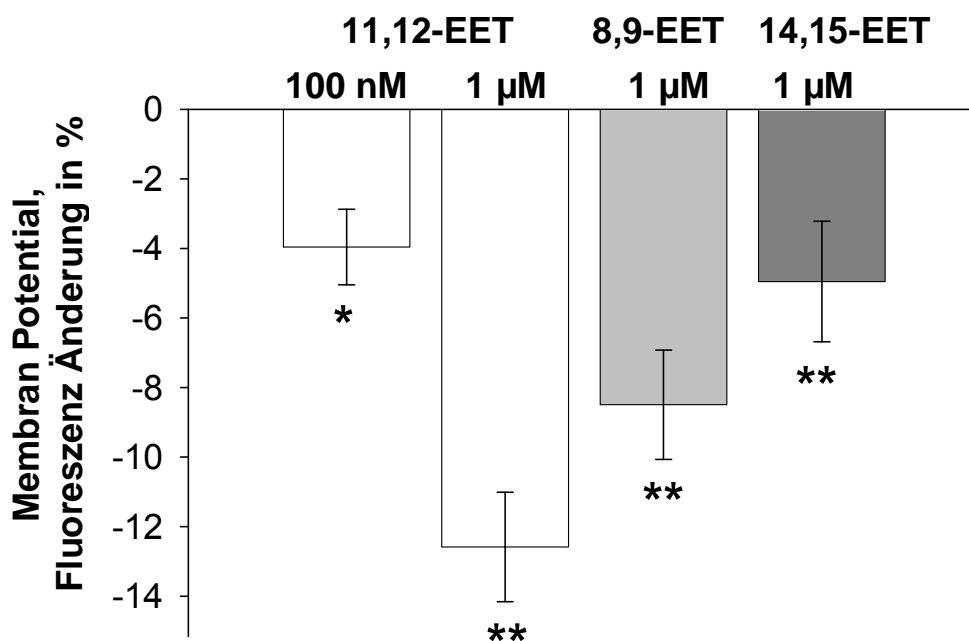


Abbildung 12: Einfluss verschiedener EET-Isoformen auf thrombozytäres Membranpotential (nach 10 min gemessen). 11,12-EETs 100 nM ($n = 8$, *: $p < 0.05$), 11,12-EETs, 1 µM ($n = 12$, **: $p < 0.01$), 8,9-EETs ($n = 13$, **: $p < 0.01$) und 14,15-EETs ($n = 13$, **: $p < 0.01$, jeweils gegen Kontrolle) (negative Fluoreszenzänderung entspricht Hyperpolarisation).

Als nächstes haben wir den Einfluss der drei oben beschriebenen Hemmstoffe auf die Thrombozyten hyperpolarisierende Wirkung von EETs untersucht.

Während Apamin (500 nmol/L) keinen signifikanten Effekt auf die hyperpolarisierende EET-Wirkung hatte (n = 4), konnte Iberiotoxin (500 nmol/L) die hyperpolarisierende EET-Wirkung teilweise (n = 4, p < 0.05) und Charybdotoxin (50 nmol/L) komplett aufheben (n = 4, p < 0.01 je gegen EET) (Abb. 13 und Werte in mV Tabelle 1).

Einfluss verschiedener K_{Ca} -Kanal Hemmstoffe auf EET-Wirkung

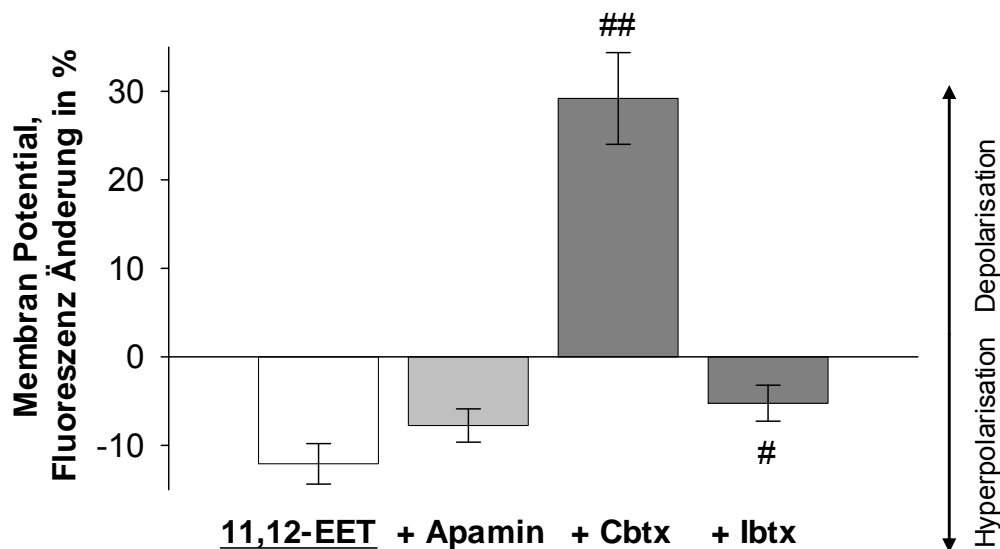


Abbildung 13: Einfluss verschiedener K_{Ca} -Kanal Hemmstoffe auf die thrombozytär hyperpolarisierende Wirkung von 11,12-EET. Apamin (Apa) (500 nmol/L) hatte keinen Effekt (n = 4), Charybdotoxin (Cbtx) (50 nmol/L) konnte die Hyperpolarisation komplett aufheben (n = 4, ##: p < 0.01 gegen EET). Iberiotoxin (Ibtx) (500 nmol/L) konnte die hyperpolarisierende EDHF-Wirkung signifikant reduzieren (n = 4, #: p < 0.05 gegen EET) (negative Fluoreszenzänderung entspricht Hyperpolarisation, positive Fluoreszenzänderung entspricht Depolarisation).

Alle anhand der jeweiligen Eichgeraden umgerechneten thrombozytären Membranpotentialwerte in mV sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Thrombozytäre Membranpotentialwerte in mV

| | Membranpotential [in mV] | +Charybdotoxin [in mV] | +Iberiotoxin [in mV] | +Apamin [in mV] |
|-------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| + Puffer | -57,7 | -18,2 | -59,5 | -60,7 |
| + EDHF | -72,5 | -41,9 | -67,4 | -74,9 |
| + 8,9-EET | -66,5 | -21,5 | -56,9 | -63,5 |
| + 11,12 EET | -69,4 | -29,4 | -62,8 | -65,2 |
| + 14,15 EET | -63,2 | n.b. | n.b. | n.b. |

Tabelle 1: Zusammenfassung aller gemessenen thrombozytären Membranpotentialwerte in mV. Die Umrechnung der Fluoreszenzwerte erfolgte anhand der jeweiligen Eichgerade.

4.2. Einfluss von EDHF und EETs auf thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen

Um eine wichtige physiologische Thrombozytenfunktion - die thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen - zu untersuchen, verwendeten wir den unter 3.6.2. beschriebenen Adhäsions-Versuchsansatz, bei dem Zentrifugation als Initiator thrombozytärer Adhäsion an HUVEC diente (154). Als Negativ-Kontrolle haben wir Abciximab (Reopro[®]), einen monoklonalen Antikörper, der gegen den thrombozytären Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor Komplex gerichtet ist, verwendet. Wurden die mit Calcein-AM inkubierten fluoreszierenden Thrombozyten 5 Minuten mit

Abciximab (0,2 $\mu\text{mol/L}$) behandelt und anschließend auf die konfluenten Endothelzellen (HUVEC) zentrifugiert, konnten wir bei intaktem Endothelzellrasen eine um $35 \pm 4 \%$ verringerte thrombozytäre Adhäsion messen ($n = 17$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle).

4.2.1. von EDHF

Wurden Thrombozyten 10 Minuten (vor Zentrifugation) mit EDHF-haltigen Überständen behandelt, so zeigte sich die Adhäsion an HUVEC um $20 \pm 6 \%$ verringert ($n = 16$, $p < 0.01$ gegen Überstände von Kontrollzellen) (Abb. 14).

Um zu untersuchen, ob dieser adhäsionshemmende Effekt des von HUVEC freigesetzten Faktors K_{Ca} -Kanal abhängig vermittelt wurde, wurden die Thrombozyten 5 Minuten mit K_{Ca} -Hemmstoffen vorbehandelt. Während Vorbehandlung mit Apamin (500 nmol/L) keinen messbaren Effekt auf die Adhäsions-Hemmung hatte ($n=5$), zeigte sich bei Charybdotoxin (50 nmol/L , 5 Minuten vor EDHF-Überstände Inkubation zugegeben) eine Zunahme der Adhäsion ($n = 10$, $p < 0.01$ gegen EDHF). Es zeigte sich sogar eine erhöhte Adhäsion um $18 \pm 7 \%$ gegenüber den mit Überständen von Kontrollzellen behandelten Thrombozyten (Abb. 14). Eine Vorbehandlung mit Iberiotoxin (500 nmol/L) konnte die Hemmung der Adhäsion durch die EDHF-Überstände komplett aufheben ($n = 6$, $p < 0.05$ gegen EDHF). Es zeigte sich nahezu die gleiche Adhäsion wie der Thrombozyten, die allein mit Überständen von Kontrollzellen behandelt wurden ($+ 2 \pm 7 \%$ gegenüber Kontrolle) (Abb. 14).

Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter EDHF

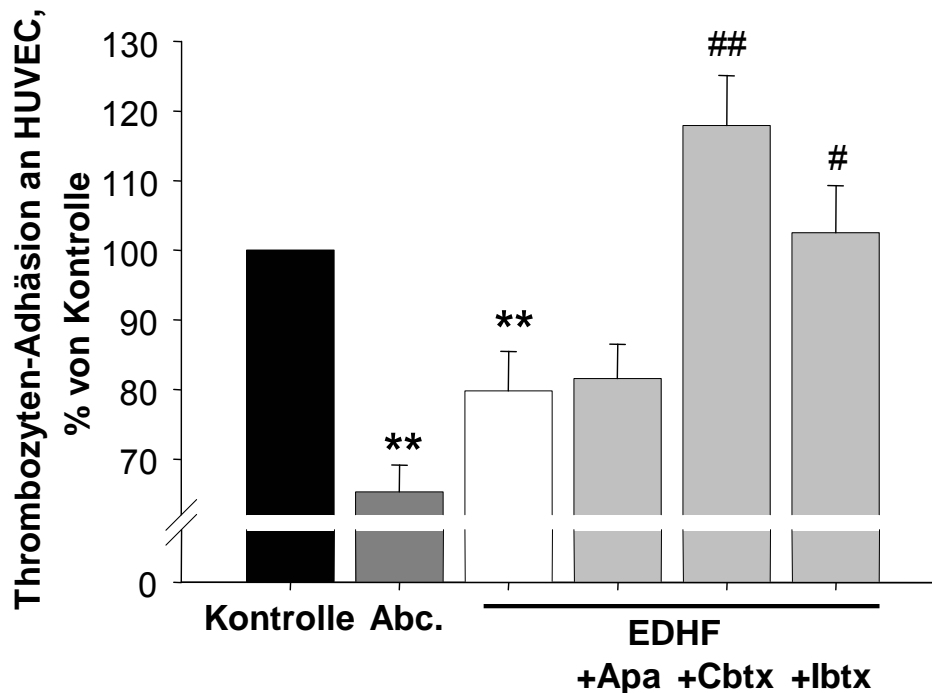


Abbildung 14: Messung der Thrombozyten-Adhäsion an HUVEC in % der Kontrolle (Thrombozyten + Puffer). Abciximab, als Negativkontrolle, verringerte die Adhäsion um 35 ± 4 % ($n = 17$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle), EDHF-Überstände um 20 ± 6 % ($n = 16$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Zusätzliche Gabe von Apamin (500 nmol/L) hatte keinen Effekt auf diese Reduktion ($n = 5$), Iberiotoxin (500 nmol/L) konnte sie komplett aufheben ($n = 6$, #: $p < 0.05$ gegen EDHF), ebenso Charybdotoxin (50 nmol/L) ($n = 10$, ##: $p < 0.01$ gegen EDHF), was sogar eine erhöhte Adhäsion bewirkte.

Abbildung 15 zeigt repräsentative Bilder (in Falschfarben) des Adhäsionsassays zu den in Abbildung 14 dargestellten Fluoreszenzänderungen. Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-scanning Mikroskops LSM 410 (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm aufgenommen.

Repräsentative Bilder der Thrombozyten-Adhäsion an Endothelzellen

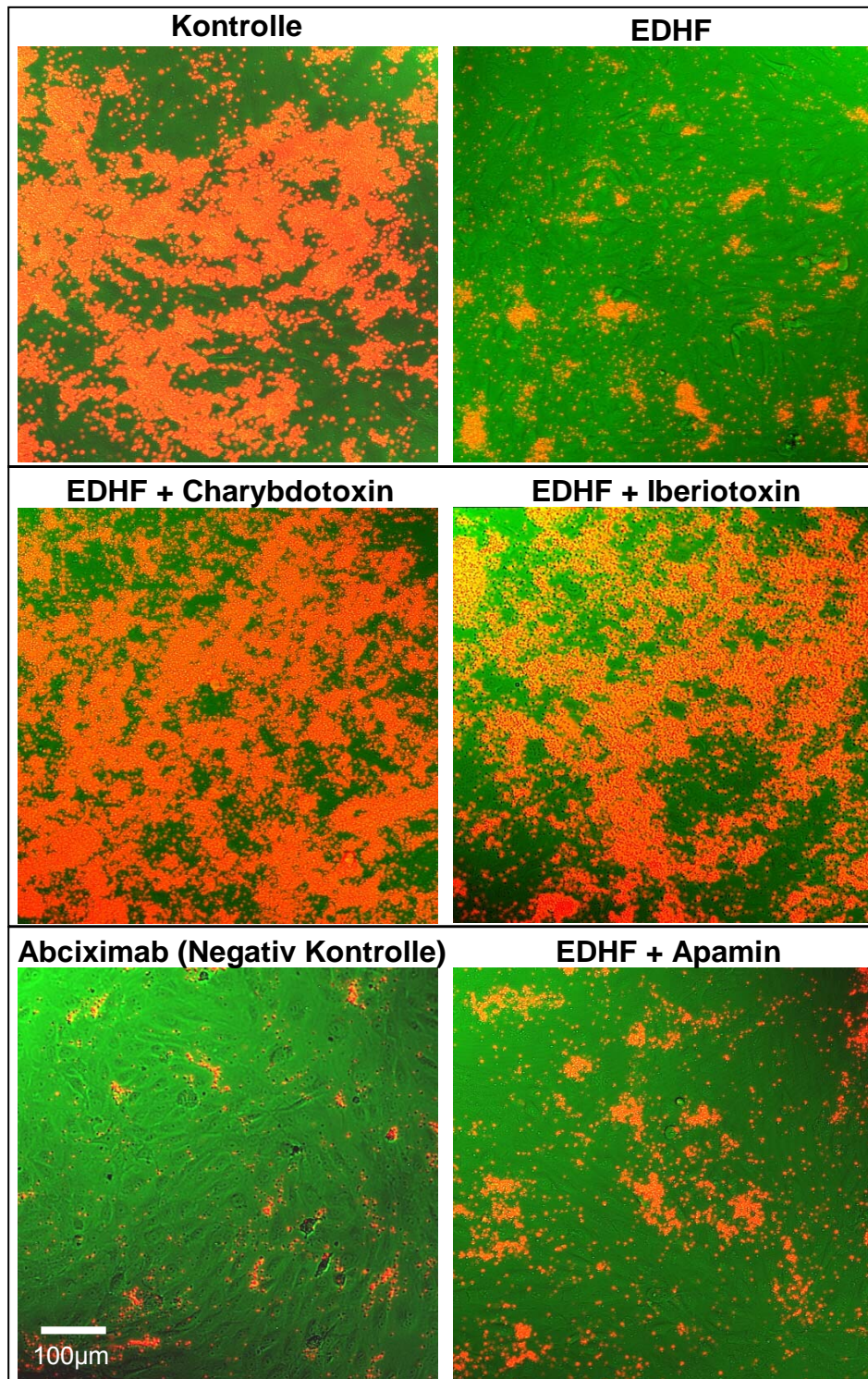


Abbildung 15: Repräsentative Bilder der Thrombozyten-Adhäsion an Endothelzellen in Falschfarben. Hier grün dargestellt die konfluenten HUVEC, rot die mit Calcein-AM fluoreszierenden adhärenen Thrombozyten. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops erstellt (Vergrößerung 20-fach).

Um zu untersuchen, ob Depolarisation selbst einen Einfluss auf die thrombozytäre Adhäsion hat, behandelten wir gewaschene Thrombozyten vor Zentrifugation mit den depolarisierenden Substanzen Charybdotoxin bzw. 4-Aminopyridin, ein unspezifischer Kalium-Kanal Blocker mit hoher Affinität für spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K_v). Charybdotoxin führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Adhäsion um $16 \pm 7 \%$ (50 nmol/L) bzw. $36 \pm 18 \%$ (100 nmol/L) (je $n = 16$, $p < 0.05$ gegen Kontrolle). 4-Aminopyridin (1 mmol/L) steigerte die Adhäsion um $63 \pm 13 \%$ ($n = 16$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle), was einen membranpotential-abhängigen Mechanismus vermuten lässt.

Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter Depolarisation

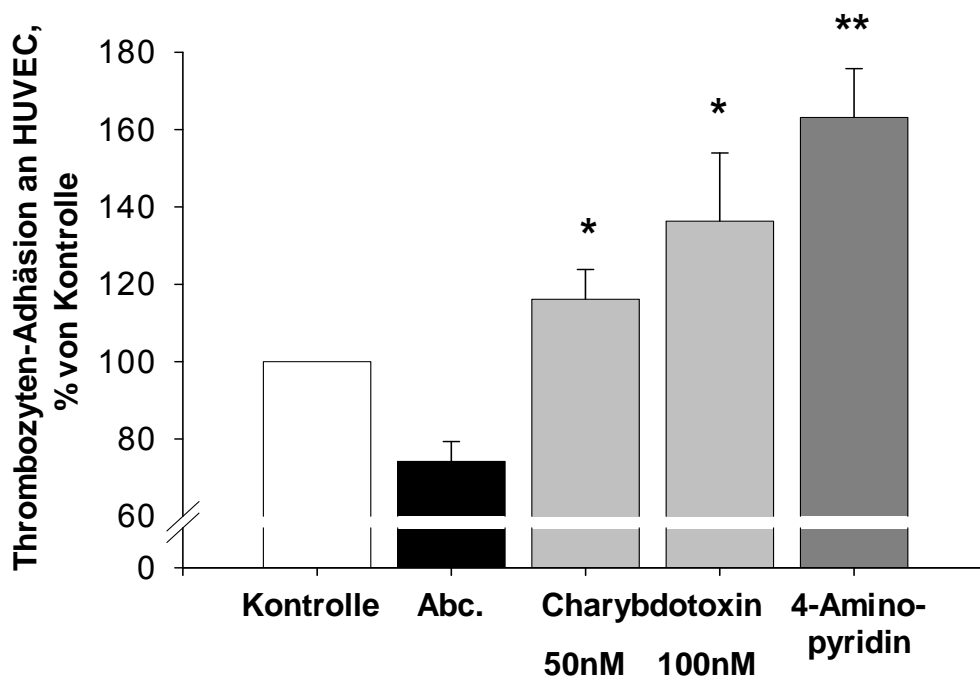


Abbildung 16: Messung der Thrombozyten-Adhäsion an HUVEC in % der Kontrolle (Thrombozyten + Puffer) mit Abciximab (Abc.) als Negativkontrolle. Charybdotoxin (50 nmol/L) steigerte die Adhäsion um $16 \pm 7 \%$ ($n = 16$, *: $p < 0.05$ gegen Kontrolle), Charybdotoxin (100 nmol/L) um $36 \pm 18 \%$ gegen Kontrolle ($n = 16$, *: $p < 0.05$ gegen Kontrolle), 4-Aminopyridin steigerte die Adhäsion um $63 \pm 13 \%$ ($n = 16$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle).

4.2.2. von EETs

Eine Vorbehandlung von Thrombozyten mit 11,12-EET (1 $\mu\text{mol/L}$) 10 Minuten vor Zentrifugation reduzierte ebenfalls deren Adhäsion an HUVEC um $22 \pm 4 \%$ ($n = 13$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Dies konnte durch vorherige Gabe von Charybdotoxin (50 nmol/L) ($n = 13$, $p < 0.01$ gegen 11,12-EET) und Iberiotoxin (500 nmol/L) ($n = 13$, $p < 0.05$ gegen 11,12-EET) verhindert werden (Abb. 17). Apamin (500 nmol/L) hatte auf die durch EETs erzielte Adhäsionshemmung (sowie auf die Hyperpolarisation) keinen messbaren Effekt ($n = 10$) (Abb. 17).

Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter 11,12-EET

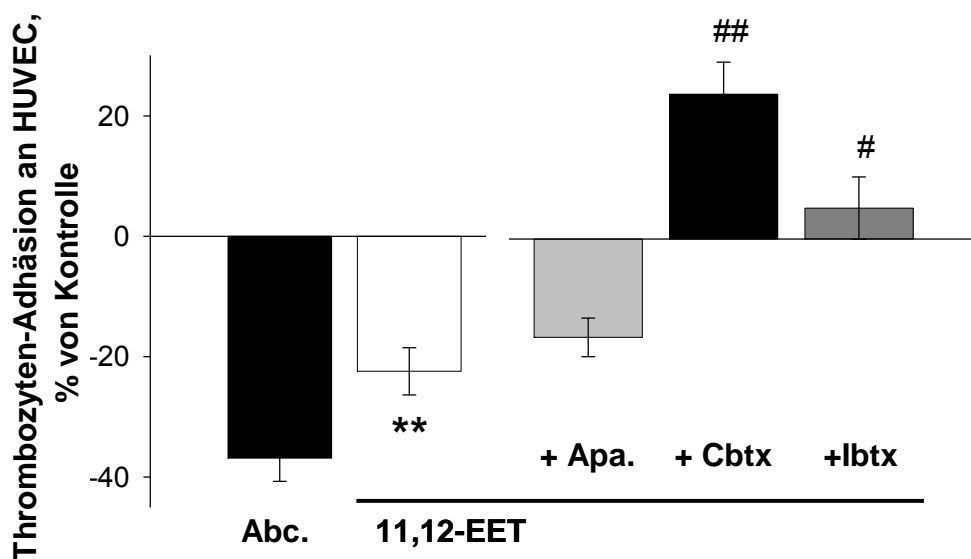


Abbildung 17: Thrombozyten-Adhäsion an HUVEC in % von Kontrolle (Thrombozyten + Puffer). Die Behandlung mit Abciximab (Abc.) diente als Referenz. 11,12-EET (1 $\mu\text{mol/L}$) reduzierte die Adhäsion um $22 \pm 4 \%$ ($n = 13$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Vorherige Gabe von Apamin (500 nmol/L) hatte keinen Effekt auf diese Reduktion ($n = 10$), Charybdotoxin (50 nmol/L) blockierte die Adhäsionsreduktion ($n = 13$, ##: $p < 0.01$ gegen 11,12-EET), Iberiotoxin (500 nmol/L) ebenfalls ($n = 13$, #: $p < 0.05$ gegen 11,12-EET).

4.3. Einfluss auf thrombozytäre Adhäsionsmolekül-expression

Eine mögliche Erklärung für verändertes Adhäsionsverhalten von Thrombozyten kann ihre veränderte Aktivierbarkeit sein. Wir untersuchten daher als Marker thrombozytärer Aktivierung die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62P und CD41.

P-Selektin (CD62P) ist in nicht aktivierten Thrombozyten in α -Granula gespeichert. Die Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin wurde mit monoklonalen Antikörpern gekoppelt an FITC mittels FACScan Durchflußzytometer erfasst (vgl. 3.2.2.). Pro Versuch wurden 10.000 Thrombozyten analysiert.

4.3.1. von EDHF

In Abbildung 18 ist die P-Selektin (CD62P) Expression dargestellt. Wurden unstimulierte Thrombozyten 10 Minuten mit EDHF-haltigen Überständen inkubiert, konnte keine signifikante Änderung der P-Selektin Expression gemessen werden ($n = 9$). Voraktivierung mit ADP ($20 \mu\text{mol/L}$) (3 Minuten) führte zu einer deutlichen Zunahme der P-Selektin Expression um $16 \pm 2 \%$ ($n = 9$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Wurden die Thrombozyten vor ADP-Gabe mit EDHF-Überständen behandelt, konnte diese Aktivierung signifikant verringert werden ($n = 9$, $p < 0.01$ gegen ADP). Vorherige Behandlung mit Iberiotoxin (500 nmol/L) hob die EDHF-Wirkung wieder auf und führte zu deutlicher thrombozytärer Aktivierung ($n = 9$, $p < 0.01$ gegen EDHF), vergleichbar mit alleiniger ADP-Stimulation (Abb. 18).

Thrombozytäre Degranulation mit EDHF-Wirkung

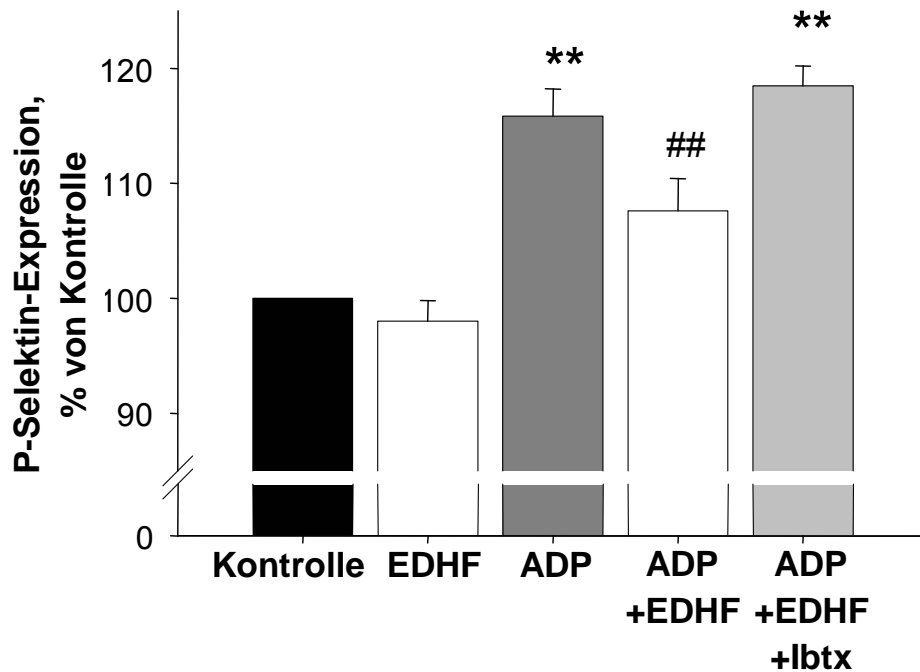


Abbildung 18: P-Selektin (CD62P) Expression von Thrombozyten. Vermehrte Expression zeigt eine thrombozytäre Degranulation an. An unbehandelten Kontroll-Thrombozyten hatten EDHF-Überstände keinen Effekt ($n = 9$). Voraktivierung mit ADP ($20 \mu\text{mol/L}$) (3 Minuten) führte zu einer deutlichen Zunahme ($+ 16 \pm 2 \%$, $n = 9$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle), welche durch Vorbehandlung mit EDHF-Überständen gehemmt wurde ($n = 9$, #: $p < 0.01$ gegen ADP). Dieser EDHF-Effekt wurde wiederum durch Vorbehandlung mit Iberitoxin (lbtx) (500 nmol/L) aufgehoben ($n = 9$, **: $p < 0.01$ gegen EDHF).

4.3.2. von EETs

11,12-EETs konnten die thrombozytäre P-Selektin Expression auch unstimulierter Thrombozyten dosisabhängig hemmen.

10 Minuten Inkubation von 100 nM führten zu einer Abnahme um $5 \pm 2 \%$ ($n = 3$, $p < 0.05$ gegen Kontrolle). $1 \mu\text{M}$ 11,12-EETs bewirkten eine P-Selektin Abnahme um $11 \pm 3 \%$ ($n = 7$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle) (Abb. 19).

Thrombozytäre Degranulation mit 11,12-EET-Wirkung

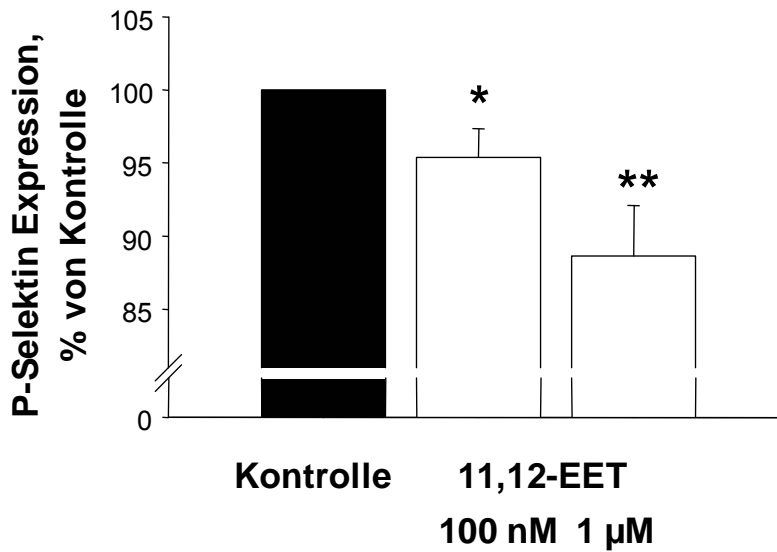


Abbildung 19: P-Selektin (CD62P) Expression in % von unstimulierten Thrombozyten. 11,12-EETs (100 nmol/L) reduzierten die P-Selektin Expression um 5 ± 2 % ($n = 3$, *: $p < 0.05$ gegen Kontrolle), 11,12-EETs (1 μ mol/L) um 11 ± 3 % ($n = 7$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle).

Als nächstes untersuchten wir, ob 11,12-EETs auch mit ADP (20 μ mol/L) (3 Minuten) voraktivierte Thrombozyten hinsichtlich der P-Selektin Expression beeinflussen können und ob dieser Prozess gegebenenfalls blockiert werden kann.

Wurden Thrombozyten 10 Minuten vor ADP Stimulation mit 11,12-EET (1 μ mol/L) behandelt, konnte das den ADP induzierten P-Selektin-Anstieg fast vollständig verhindern ($n = 9$, $p < 0.01$ gegen ADP). Durch zusätzliche Apamin-Gabe (100 nmol/L) vor EET Behandlung konnte dieser Effekt nicht beeinflusst werden ($n = 7$), wohl aber durch Charybdotoxin-Gabe (100 nmol/L) ($n = 9$, $p < 0.01$ gegen 11,12-EET + ADP) (Abb. 20).

Thrombozytäre Degranulation mit 11,12-EETs und K_{Ca} -Hemmstoffen

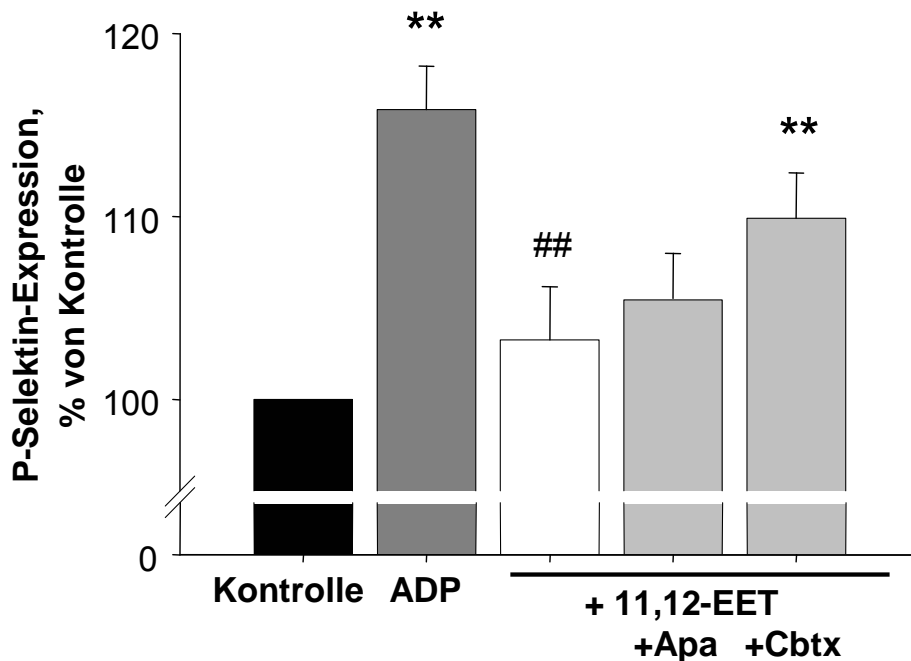


Abbildung 20: P-Selektin (CD62P) Expression in % von Kontrolle. Voraktivierung mit ADP (20 $\mu\text{mol/L}$) (3 Minuten) führte zu einer erhöhten P-Selektin Expression (+ 16 \pm 2 %, $n = 9$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle), welche durch Vorbehandlung mit 11,12-EETs (1 $\mu\text{mol/L}$) reduziert wurde ($n = 9$, #: $p < 0.01$ gegen ADP). Zusätzliche Apamin-Gabe (100 nmol/L) hatte keinen messbaren Effekt (+ 2 \pm 3 % gegen 11,12-EET, $n = 7$), Charybdotoxin dagegen hemmte den EET-Effekt (+ 7 \pm 2 % gegen 11,12-EET, $n = 9$, **: $p < 0.01$ gegen 11,12-EET + ADP).

Um weiter klären zu können, ob die Modulation der P-Selektin Expression vom Membranpotential abhängig ist, haben wir den Effekt der Zugabe verschiedener depolarisierender Stoffe getestet.

Charybdotoxin (100 nmol/L) hatte keinen messbaren Effekt ($n = 7$), Tetrabutylammonium Chlorid (TBA, 1 mmol/L) jedoch, ein unspezifischer Kaliumkanalblocker, erhöhte die P-Selektin Expression um 11 \pm 6 % ($n = 7$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle).

Ebenso zeigten Thrombozyten, die in Puffer mit hoher Kalium-Konzentration (50 nmol/L, Osmolarität an normalen Puffer angepasst) resuspendiert wurden, eine um 19 ± 2 % erhöhte P-Selektin Expression ($n = 7$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Auch der stark depolarisierende Kationenionophor Gramicidin (100 nmol/L) führte zu einer um 11 ± 5 % erhöhten CD62P-Expression ($n = 7$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Diese Daten sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

Thrombozytäre Degranulation und Depolarisation

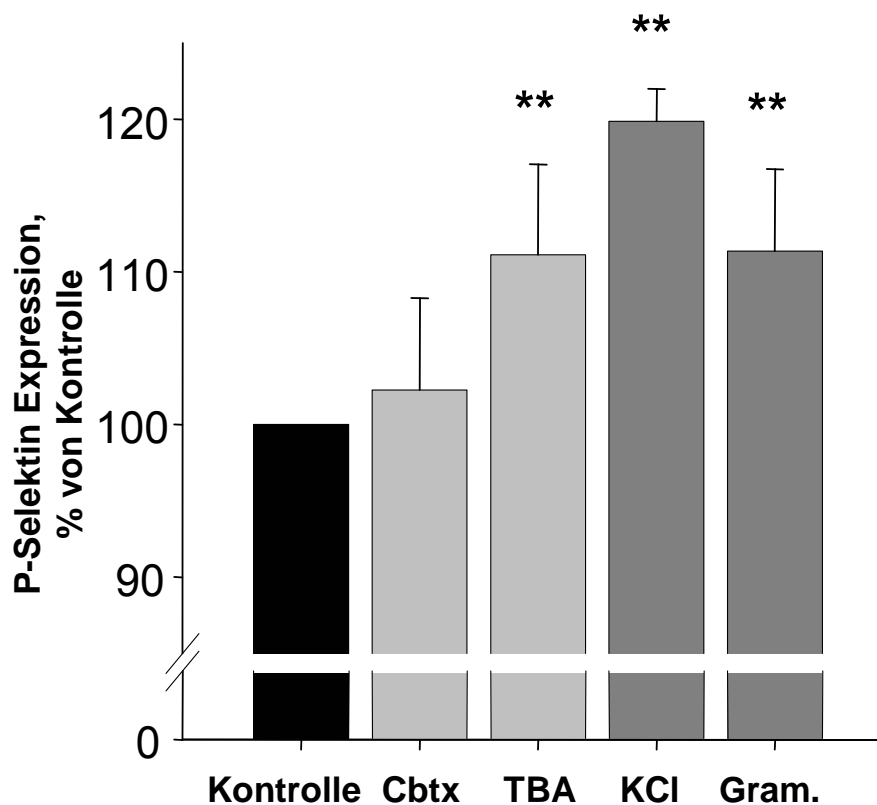


Abbildung 21: Membranpotential-abhängige thrombozytäre P-Selektin (CD62P) Expression in % von Kontrolle (unbehandelte Thrombozyten). Charybdotoxin (100 nmol/L) hatte keinen Effekt ($n = 7$). Tetrabutylammonium Chlorid (TBA, 1 mmol/L) steigerte die P-Selektin Expression um 11 ± 6 %, Kalium-Chlorid (KCL, 50 mmol/L) um 19 ± 2 % und Gramicidin (Gram, 100 nmol/L) um 11 ± 5 % (alle $n = 7$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle).

4.4. Verhalten der CYP2C9 überexprimierenden Zellen

Um die Vermutung, dass EETs in unseren HUVEC-Überständen einen EDHF darstellen, weiter erhärten zu können, untersuchten wir eine endotheliale Hybridzelllinie, die EA.hy926-Zellen.

In diese schnell wachsende Endothelzelllinie transfizierten wir das CYP2C9 Gen, wobei uns dankenswerterweise von Dr. B. Fisslthaler (Physiologie Frankfurt, Deutschland) ein Plasmid zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid kodiert zusätzlich eine Resistenz gegen F408, sodass in Geneticin-haltigen Medien nur erfolgreich und stabil transfizierte EA.hy-CYP2C9 Zellen überleben konnten.

4.4.1. Nachweis des CYP2C9-Proteins in überexprimierenden Zellen

Nach Selektionierung der Zellklone, die über mehrere Passagen die zusätzliche F408-Resistenz exprimierten und diese offensichtlich stabil in ihr Genom integriert hatten, überprüften wir, ob diese Klone auch das CYP2C9 Protein überexprimierten. Insgesamt erhielten wir 9 Zellklone. Davon zeigten 7 eine Expression des CYP2C9 Proteins im Western Blot Zellklone „A“ bis „G“. Als Positivkontrolle diente Schweinelebergewebe. Abbildung 22 zeigt das repräsentative Ergebnis (des Zellklons „C“) eines dreier unabhängiger Western-Blots.

Western-Blot der Proteinexpression von CYP2C9

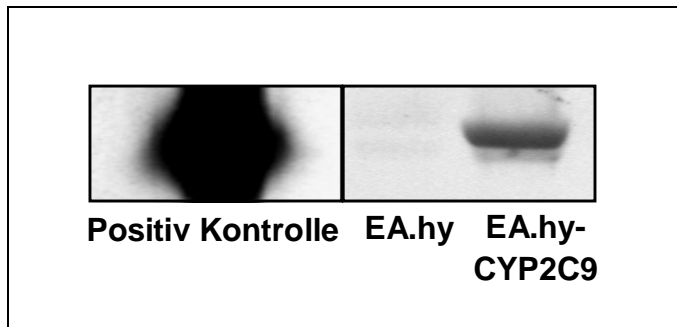


Abbildung 22: Western-Blot der CYP2C9 Proteinexpression. Positivkontrolle stellte Schweinelebergewebe, in denen CYP2C9 stark exprimiert ist, dar. Kontroll-EA.hy926 Zellen zeigten keine Expression, stabil transfizierte EA.hy-CYP2C9 des Zellklons „C“ zeigte eine deutliche Proteinexpression von CYP2C9 in 3 unabhängigen Ansätzen.

4.4.2. Freisetzung eines hyperpolarisierenden Faktors

Für unseren Bioassay sammelten wir anschließend Überstände (wie unter 3.6.1. beschrieben) von Kontroll-EA.hy926 Zellen sowie der transfizierten EA.hy-CYP2C9 Zellen des Zellklons „C“. Bei letzteren wählten wir wie bei den HUVEC-Versuchen zwei Ansätze. Ein Ansatz stellte unstimulierte Zellen dar, im anderen wurden die Zellen 5 Minuten vor Gewinnung der Überstände mit Bradykinin (100 nmol/L) stimuliert.

Um nur die EDHF-Wirkung erfassen zu können, wurden sämtliche Überstände wieder unter Hemmung der NO-Synthase (L-NA, 100 µmol/L) und Cyclooxygenase (Indomethacin, 20 µmol/L) gewonnen.

Im Gegensatz zu den Überständen der nicht transfizierten EA.hy926-Zellen, die Thrombozyten nicht hyperpolarisierten und deren Membranpotentialwerte nahezu auf dem Niveau lagen, das bei Inkubation in Kontroll-Pufferlösung ermittelt wurde ($n = 15$), hyperpolarisierten die Überstände von transfizierten EA.hy-CYP2C9 Zellen Thrombozyten signifikant um $9 \pm 2 \%$ ($n = 15$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle) (Abb. 23).

Dieser Effekt konnte durch Bradykinin (BK, 100 nmol/L) Stimulation der EA.hy-CYP2C9 Zellen 5 Minuten vor Überstände-Gewinnung noch

verstärkt werden auf $13 \pm 3 \%$ ($n = 15$, $p < 0.01$ gegen Kontrolle) (Abb. 23).

Thrombozytäre Iberiotoxin-Behandlung (500 nmol/L) konnte diesen hyperpolarisierenden Effekt der Bradykinin stimulierten EA.hy-CYP2C9 Überstände aufheben ($96 \pm 3 \%$ der Kontroll-Fluoreszenzwerte, $n = 4$, $p < 0.05$ gegen EA.hy-CYP2C9 + BK) (Abb. 23).

Thrombozytäre Hyperpolarisation mit Überständen transfizierter Zellen

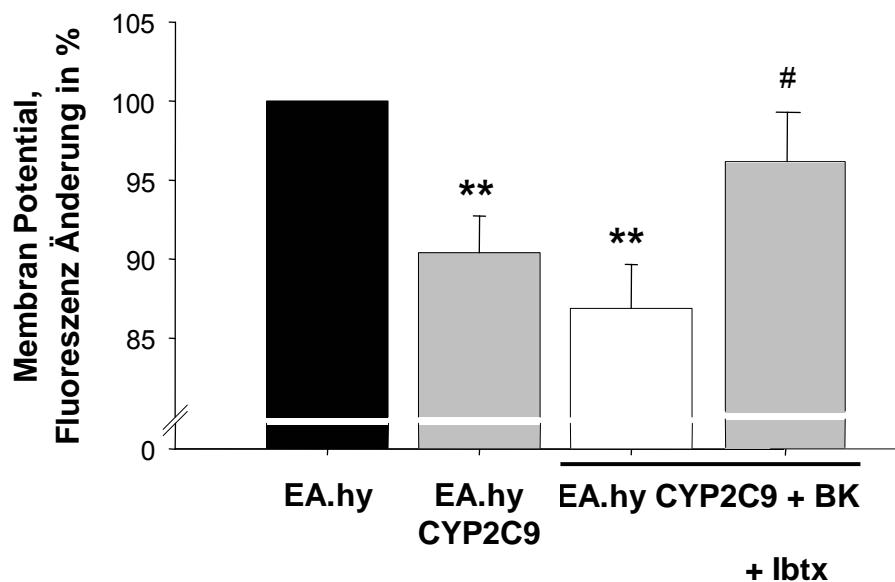


Abbildung 23: Thrombozytäre Membranpotentialmessung mit verschiedenen EA.hy926 Zell-Überständen. Die Fluoreszenzwerte sind in % von Kontroll-EA.hy Überständen angegeben ($n = 15$). Die Überstände der transfizierten EA.hy-CYP2C9 Zellen hyperpolarisierten Thrombozyten um $9 \pm 2 \%$, was durch Bradykinin (BK, 100 nmol/L) Stimulation der EA.hy-CYP2C9 Zellen noch verstärkt wurde auf $13 \pm 3 \%$ (je $n = 15$, **: $p < 0.01$ gegen Kontrolle). Thrombozytäre Behandlung mit Iberiotoxin (500 nmol/L) konnte diesen Effekt verhindern ($n = 4$, #: $p < 0.05$ gegen EA.hy-CYP2C9 + BK).

4.4.3. Einfluss des freigesetzten Faktors auf thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen

Nachdem die Überstände der transfizierten EA.hy-CYP2C9 Zellen ähnlich hyperpolarisierende Eigenschaften wie die HUVEC Überstände zeigten, haben wir auch ihre funktionellen Effekte auf thrombozytäre Adhäsion untersucht. Als Referenz verwendeten wir erneut Abciximab (0,2 µmol/L) (- 32 ± 5 %, n = 15, p < 0.01 gegen EA.hy926-Überstände).

Während die Überstände der nicht transfizierten EA.hy926 Zellen keine messbare Veränderung der Thrombozyten-HUVEC Adhäsion verursachten (n = 10, auch kein Effekt durch BK Stimulation), konnten wir eine deutliche Hemmung der thrombozytären Adhäsion messen, wenn diese mit Bradykinin (BK, 100 nmol/L) stimulierten EA.hy-CYP2C9 Überständen behandelt wurden (28 ± 4 %, n = 10, p < 0.01 gegen EA.hy926-Überstände) (Abb. 24).

Diese Adhäsionshemmung wurde nicht durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit Apamin (500 nmol/L) (n = 9, nicht in Abb.), jedoch durch Charybdotoxin (Cbtx, 50 nmol/L) (n = 8, p < 0.01 gegen EA.hy-CYP2C9 Überstände) oder Iberiotoxin (Ibtx, 500 nmol/L) verhindert (n = 5, p < 0.05 gegen EA.hy-CYP2C9 Überstände) (Abb. 24).

Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC mit Überständen von transfizierten Zellen

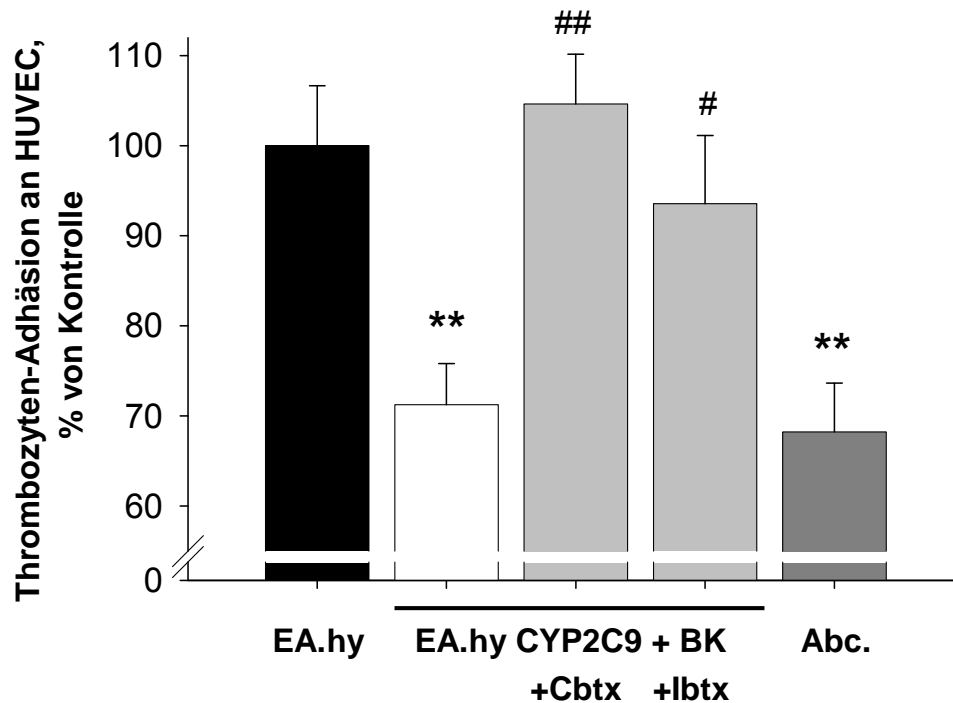


Abbildung 24: Thrombozyten-Adhäsion an HUVEC in % der Kontrolle. Bradykinin (BK, 100 nmol/L) stimulierte EA.hy-CYP2C9-Überstände hemmten die Thrombozyten Adhäsion um 28 ± 4 % ($n = 10$, **: $p < 0.01$ gegen EA.hy926-Überstände). Dieser Effekt wurde durch Charybdotoxin (Cbtx, 50 nmol/L) ($n = 8$, ##: $p < 0.01$ gegen EA.hy926-Überstände) oder Iberiotoxin (lbtx, 500 nmol/L) verhindert ($n = 5$, #: $p < 0.05$ gegen EA.hy-CYP2C9 Überstände). Abciximab (Abc, 0,2 μ mol/L) diente als Referenz (-32 ± 5 %, $n = 15$, **: $p < 0.01$ gegen EA.hy-CYP2C9 Überstände).

4.4.4. EET-Analyse der EA.hy-CYP2C9 Überstände

Analysen der EA.hy-CYP2C9 Überstände durch Flüssigkeitschromatographische Massenspektrometrie wurden dankenswerterweise von Prof. MD. W.B. Campbell in Wisconsin, Milwaukee, U.S.A., wie zuvor beschrieben, durchgeführt (108).

Wie in Abbildung 25 dargestellt, fanden sich in den unstimulierten EA.hy-CYP2C9 Überständen hohe Konzentrationen 8,9-EET ($28,7 \pm 7,1$ pg/ μ L) und 14,15-EET ($18,6 \pm 4,5$ pg/ μ L), sowie geringere Konzentrationen an 11,12-EET ($0,2 \pm 0,05$ pg/ μ L); 5,6-EET wurde nicht gemessen (alle Messungen $n = 7$).

Bradykinin-Stimulation (100 nmol/L) der transfizierten EA.hy-CYP2C9 Zellen führte zu jeweils deutlich höheren EET-Konzentrationen. Für 8,9-EET wurden $49,8 \pm 9,9$ pg/ μ L, für 14,15-EET $38,2 \pm 7,5$ pg/ μ L (je $n = 7$, $p < 0.01$ gegen EA.hy-CYP2C9) und für 11,12-EET wurden $0,3 \pm 0,05$ pg/ μ L ($n = 7$, $p < 0.05$ gegen EA.hy-CYP2C9) gemessen. Bei allen Messungen waren die Konzentrationen der EET-Abbauprodukte Dihydroxyeicosatriensäuren (DHET) deutlich geringer als die gemessenen EET-Konzentrationen.

Produkte der Lipooxygenase, wie zum Beispiel 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, welche die beobachteten Effekte auch erklären könnten, waren nicht messbar, obwohl die Methode dafür ebenfalls geeignet war (133). In Abbildung 25 sind alle gemessenen Konzentrationen der verschiedenen EET-Isomere dargestellt.

MSLC-Analysen der Überstände stabil CYP2C9 transfizierter EA.hy-Zellen

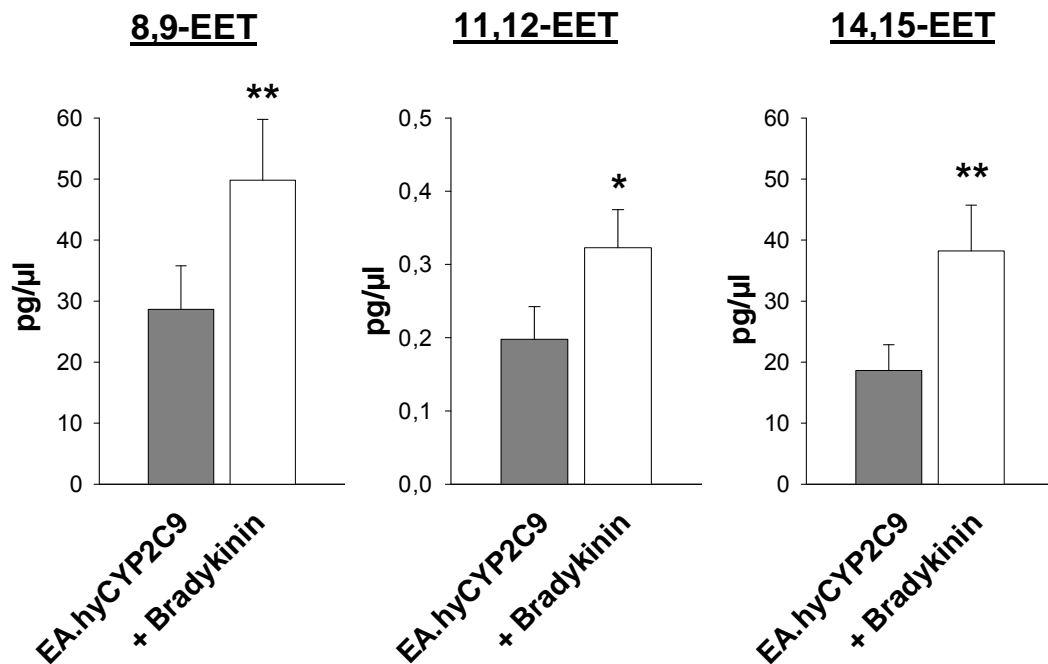


Abbildung 25: Analysen der EA.hy-CYP2C9 Überstände durch Massenspektrometrische-Liquidchromatografische (MSLC). Die verschiedenen EET-Konzentrationen sind in pg/µL dargestellt. 8,9-EET: $28,7 \pm 7,1$ (89,6 nmol/L), mit Bradykinin (BK, 100 nmol/L) Stimulation $49,8 \pm 9,9$ (155,4 nmol/L) ($n = 7$, **: $p < 0.01$). 11,12-EET: $0,2 \pm 0,05$ (0,62 nmol/L), mit BK $0,3 \pm 0,05$ (0,94 nmol/L) ($n = 7$, *: $p < 0.05$). 14,15-EET: $18,6 \pm 4,5$ (58,0 nmol/L), mit BK $38,2 \pm 7,5$ (119,2 nmol/L) ($n = 7$, **: $p < 0.01$).

5. Diskussion

5.1. EDHF als endotheliales Autakoid

EDHF wird neben NO und Prostazyklin als ein dritter wichtiger endothelialer Faktor definiert, der eine Gefäßrelaxation auslöst. Eine EDHF abhängige Relaxation erfolgt normalerweise nach Stimulation des Endothels z.B. mit Bradykinin, Acetylcholin oder Erhöhung der Wand-schubspannung (16; 26; 30; 47), während eine basale Freisetzung von EDHF aus unstimuliertem Endothel bisher nur indirekt gezeigt werden konnte (de Wit et al.). Da seine relaxierende Wirkung mit einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur einhergeht, entstand der Name endothelialer hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor - EDHF) (103; 148).

Für NO und Prostazyklin ist neben der lokalen Gefäßwirkung vielfach auch eine Freisetzung ins Gefäßlumen und weiterhin eine Beeinflussung der Funktion zirkulierender Blutbestandteile beschrieben (18; 54; 58; 113; 114; 121; 141). Beide hemmen u.a. die thrombozytäre Aktivierung (4; 100). Für EDHF war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht klar, ob er ebenfalls - was eine Freisetzung ins Gefäßlumen impliziert - Blutbestandteile wie Thrombozyten beeinflussen kann. Unsere Daten geben jetzt Anhalt dafür, dass EDHF ein auch nach luminal freisetzbarer Faktor ist, denn HUVEC setzten einen von NO und Prostacyclin unabhängigen Faktor in Über-stände (also „luminal“) frei, der Thrombozyten hyperpolarisierte und funktionell beeinflusste.

Obwohl die Existenz einer EDHF-medierten Gefäßdilatation unumstritten ist (16; 26), wird die Identität von EDHF und sein funktioneller Anteil an der vaskulären Relaxation in Gefäßbetten verschiedener Spezies dennoch nach wie vor sehr kontrovers diskutiert (149).

Darüber hinaus wurde noch nicht geklärt, ob EDHF seine vielfach nach-gewiesenen Effekte über freigesetzte Botenstoffe oder auch direkt über

myoendotheliale Verbindungen vermittelt (Gap junctions) (59; 149). Die letztgenannte These wird durch die Beobachtung gestützt, dass EDHF-Effekte auf den Gefäßtonus durch Blockade interzellulärer Gap junctions vermindert werden können (24; 137). Obwohl solche Beobachtungen suggerieren, dass zumindest in Bezug auf die Gefäßrelaxation eine Freisetzung von EDHF nicht zwingend erforderlich wäre, so schließen diese Daten die Möglichkeit einer EDHF-Freisetzung ins Gefäßlumen und damit eine Beeinflussung von Blutbestandteilen keineswegs aus.

In der Mehrzahl der tierexperimentell untersuchten Gefäßgebiete und bei nahezu allen bisher untersuchten menschlichen Gefäßen scheint EDHF jedoch ein Faktor zu sein, der in einer durch die Cytochrom P450 Oxidase (CYP 450) katalysierten Reaktion aus Arachidonsäure entsteht (48). Wichtige Produkte dieser Reaktion sind Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Erste Befunde, dass EETs eine Gefäßrelaxation bei Säugetieren bewirken können, konnten Hecker et al. 1994 an Schweine-Koronararterien erheben (65). Hierbei wurden 11,12-EETs untersucht. Zwei Jahre später konnte die Gruppe um Campbell et al. mit verschiedenen extern zugegebenen EET-Isoformen (5,6- 8,9- 11,12- 14,15-EET) an Rinder-Koronararterien eine Hyperpolarisation der Gefäßmuskulatur (gemessen mit patch-clamp Technik) und eine Relaxation dieser Gefäße auslösen (21). Alle EET-Isoformen waren hierbei gleich wirksam und vermittelten die Effekte über Stimulation Calcium aktivierbarer Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle).

Widmann et al. konnten 1998 zeigen, dass die Acetylcholin induzierte EDHF-artige Relaxation von Hunde-Koronararterien teilweise von Produkten der Cytochrom P450 Oxidase abhängig ist (159). Wenige Monate später konnten Miura et al. erstmals in Arteriolen des menschlichen Koronarsystems eine wichtige Rolle von Produkten der CYP 450 bei der Acetylcholin oder Bradykinin induzierten EDHF-artigen Dilatation nachweisen (99). Diese Effekte waren Endothel-abhängig.

Dass die Isoformen 2C der Cytochrom P450 Oxidase (CYP 2C) eine wichtige Rolle der EDHF-artigen Dilatation einnehmen, wurde an Schweine-Koronararterien und der Mikrozirkulation des Hamsters gezeigt (31; 46). Darüber hinaus konnte im Jahre 2000 von Bolz et al. durch Transfektion in isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters gezeigt

werden, dass die Isoform CYP2C8/9 eine entscheidende Rolle in der EDHF-artigen Gefäßrelaxation spielt (11). Die Beteiligung von CYP2C bei EDHF-vermittelten Reaktionen sowie die Freisetzung von EETs direkt aus Endothelzellen in den Extrazellulärraum konnten sowohl in mehreren Bioassays (31; 44; 50) als auch in Zellkulturen reproduziert werden (131). Auch an Segmenten der menschlichen Arteria mammaria interna zeigte sich eine zentrale Beteiligung von 11,12-EETs an EDHF-vermittelter Vasodilatation (2).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass kultivierte Endothelzellen aus Schweine-Koronararterien nach chronischer Inkubation mit den CYP-Induktoren Nifedipin und beta-Naphtoflavon (127) deutlich mehr 11,12-EETs produzierten als unbehandelte Zellen. Bei den so kultivierten Zellen konnte eine deutliche Induktion der CYP2C m-RNA, nicht jedoch der CYP2J oder CYP2B m-RNA, beobachtet werden. Nach Behandlung der Endothelzellen mit dem CYP2C9 Hemmer Sulfaphenazol (44; 127) war hingegen der Effekt nicht mehr nachweisbar.

Auch wir konnten in kultivierten humanen venösen endothelialen Umbilicalvenenzellen (HUVEC) mittels m-RNA Nachweis nach Stimulation mit Nifedipin und β -Naphtoflavon eine deutliche Hoch-Regulation des CYP2C-Gens gegenüber unbehandelten HUVEC beobachten.

Wir generierten durch Transfektion des CYP2C9-Gens eine endotheliale Zelllinie, die CYP2C9 auf m-RNA und Proteinebene stabil überexprimierte. Überstände dieser Zelllinie zeigten eine EET-Freisetzung, die sowohl bereits basal erhöht war als auch durch Bradykinin-Stimulation weiter gesteigert wurde. Die gleichartige Wirkung von CYP Hemmung bzw. Überexpression auf EET-Produktion und EDHF-Effekte legt die Annahme nahe, dass in einigen Spezies und Gefäßbetten EETs, insbesondere 11,12-EET, einen wichtigen EDHF darstellen können.

5.2. Effekt von EDHF sowie EETs auf das thrombozytäre Membranpotential

Um den Einfluss des endothelial freigesetzten EDHF auf Thrombozyten zu untersuchen, verwendeten wir den unter 3.6.1. ausführlich beschriebenen Bioassay. Wir konnten hiermit erstmals zeigen, dass HUVEC, welche mit Nifedipin und β -Naphthoflavon kultiviert wurden, nach Stimulation mit Bradykinin einen Faktor freisetzen, welcher menschliche Thrombozyten hyperpolarisierte. Diese Freisetzung konnte durch Vorbehandlung der HUVEC mit Sulfaphenazol, einem relativ spezifischen Hemmer von CYP2C9, blockiert werden, so dass keine Wirkung des endothelialen Überstands auf die Thrombozytenfunktion mehr messbar war.

In den Versuchen zum Nachweis von EDHF blockierten wir die NO-Synthase und die Cyclooxygenase. Wie wir bereits früher zeigen konnten, hemmen die von uns verwendeten Konzentrationen die NO- sowie Prostaglandin-Synthese effektiv (122). Daher ist es unwahrscheinlich, dass NO- oder Prostazyklin an den von uns beobachteten „EDHF“-Effekten beteiligt waren. Die beobachteten hyperpolarisierenden Effekte waren damit per definitionem durch den dritten unabhängigen Faktor, EDHF, vermittelt.

Ob dieser EDHF-Effekt nun via CYP2C-Metabolite wie Epoxyeicosa-trienäuren vermittelt wurde, soll im Weiteren noch ausführlich diskutiert werden. Die Steigerung der Effekte durch CYP2C8/9-Induktion mittels Nifedipin und β -Naphthoflavon sowie Bradykinin-Stimulation deuten jedenfalls zunächst darauf hin.

Das thrombozytäre Ruhemembranpotential, durch single cell patch-clamp gemessen, wird in der Literatur als zwischen -50 und -60 mV liegend beschrieben (53; 87; 144; 158). Änderungen des thrombozytären Membranpotentials können die Funktion von Thrombozyten beeinflussen (52; 117). Es gibt Daten, dass Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten durch ihre Depolarisation verstärkt werden kann (72).

Darüber hinaus gibt es Daten, dass auch Stimulation von Thrombozyten mit ADP oder Thrombin zu einer Depolarisation führen kann (68; 158).

Mit unserer Bis-oxonol Fluoreszenzmethode konnten wir anhand der Eichgerade (mit Zugrundelegen der Nernst-Gleichung) ein durchschnittliches thrombozytäres Ruhepotential von -58 mV abschätzen. Verglichen mit anderen Messmethoden, wie zum Beispiel der single cell patch-clamp Methode, kann das Membranpotential mit unserer Bis-oxonol Fluoreszenzmethode weniger exakt bestimmt werden. Allerdings können Membranpotentialänderungen bei Zellen in physiologischer Lösung, wie zum Beispiel Thrombozyten, sehr sensitiv und unter physiologischen Bedingungen erfasst werden (14; 15).

In unseren Versuchsansätzen hyperpolarisierten die gewonnenen „EDHF-haltigen Überstände“ Thrombozyten deutlich. Dieser Effekt wurde über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt und konnte durch Blockierung der Kalium-Kanäle mit großer (BK_{Ca}) und mittlerer (IK_{Ca}) Leitfähigkeit, nicht jedoch von denen mit geringerer (SK_{Ca}) Leitfähigkeit, blockiert werden. Während die EDHF-vermittelten Effekte in vielen Gefäßbetten durch eine Kombination aus Apamin und Charybdotoxin (durch Blockade von SK_{Ca} und IK_{Ca}) verhindert werden konnten (16), hatte Apamin in unseren Versuchen keinen blockierenden Effekt auf die thrombozytäre Hyperpolarisation. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die fehlende Expression von Calcium aktivierbaren Kalium-Kanälen mit geringer Leitfähigkeit (SK_{Ca}) auf Thrombozyten (43), während BK_{Ca} und IK_{Ca} -Kanäle auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnten (88; 89). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass SK_{Ca} -Kanäle nur im Endothel selbst - für die EDHF Bildung oder Freisetzung - von Bedeutung sind (16) nicht jedoch als Targets für EDHF in Zielzellen.

Charybdotoxin hingegen zeigte allein einen stark depolarisierenden Effekt auf Thrombozyten. Für Charybdotoxin ist eine spezifische Blockierung von IK_{Ca} -Kanälen sowie eine unspezifische Blockierung von BK_{Ca} -Kanälen und spannungsabhängig („voltage“-) aktivierbaren (K_V -Kanälen) Kalium-Kanälen beschrieben (88). Letztere sind auf Thrombozyten in großer Anzahl vorhanden (89). Durch unspezifische Blockierung von spannungsabhängig („voltage“-) aktivierbaren (K_V -Kanälen) Kalium-Kanälen ist der

stark depolarisierende Effekt des Charybdotoxin auf Thrombozyten am ehesten zu erklären. Trotzdem konnten wir durch Charybdotoxin eine deutliche Blockade des hyperpolarisierenden Effektes der EDHF-Überstände beobachten. Diese ist am ehesten via Blockierung von IK_{Ca} -Kanälen sowie Blockierung von BK_{Ca} -Kanälen erklärbar. Auch das spezifisch nur BK_{Ca} -Kanäle blockierende Iberiotoxin (56) konnte den EDHF-Effekt nahezu vollständig verhindern. Dies macht ein Vorhandensein von Calcium aktivierbaren Kalium-Kanälen mit großer (BK_{Ca}) Leitfähigkeit auf den Thrombozyten sowie deren Beeinflussung durch EDHF sehr wahrscheinlich.

Eine ähnliche hyperpolarisierende Wirkung konnte durch Behandlung der Thrombozyten mit EETs beobachtet werden. Auch diese Effekte konnten in gleicher Weise durch Blockierung von BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanälen, nicht jedoch von SK_{Ca} -Kanälen, verhindert werden. Diese Analogie stellt einen weiteren Hinweis auf eine Rolle von EETs bei der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation von Thrombozyten dar.

5.3. Effekt von EDHF sowie EETs auf die Thrombozytenfunktion

Bei Untersuchung der Thrombozytenfunktion besteht immer das potentielle Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro, so bei Gewinnung oder Verarbeitung der Proben. Alle freiwilligen gesunden Spender gaben an, mindestens in den zurückliegenden zwei Wochen keine Medikamente eingenommen zu haben. Weiterhin wurde die Abnahme und Verarbeitung der Proben nach standardisierten Bedingungen durchgeführt. Es wurde in Voruntersuchungen auch überprüft, dass Thrombozyten nach ihrer Präparation weder Spontanaggregation noch Spontanadhäsion zeigten. Daten von thrombozytären Membranpotentialen an Thrombozyten in vivo liegen leider nicht vor, so dass wir nicht mit Sicherheit sagen können, ob diese nicht durch die Präparation bereits vordepolarisiert waren. Die nachfolgend angestellten Überlegungen müssen also mit dieser Einschränkung versehen werden, die allerdings für alle in vitro Untersuchungen an Blutplättchen gilt.

Sowohl nach Inkubation der Thrombozyten mit EDHF-Überständen als auch mit Epoxyeicosatriensäuren zeigte sich neben einer Hyperpolarisation eine deutlich verminderte Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen in vitro. Eine noch stärkere Reduktion der thrombozytären Adhäsion zeigte sich durch Behandlung der Thrombozyten mit den gewonnenen Überständen der CYP2C9 stabil überexprimierenden und mit Bradykinin stimulierten Zellen. Diese Effekte waren - wie schon die Effekte aufs Membranpotential - abhängig von Calcium aktivierbaren Kalium-Kanälen (K_{Ca} -Kanäle) verschiedener Leitfähigkeit. Während Apamin keinen Effekt hatte, konnte Iberiotoxin die Hemmung der Adhäsion aufheben - es zeigte sich eine mit Kontrollzellen vergleichbare Adhäsion. Charybdotoxin hingegen bewirkte sogar eine vermehrte Adhäsion an Endothelzellen.

Zu beachten ist die ausschließlich thrombozytäre Behandlung mit Kalium-Kanalblockern, EET und EDHF-Überständen. Dies bedeutet, dass die

Behandlung von Endothelzellen in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt.

Interessanterweise bewirkte eine signifikante Depolarisation von Thrombozyten durch Charybdotoxin oder 4-Aminopyridin eine deutlich vermehrte thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen sowohl im statischen Versuch als auch unter Shear Stress. Diese Daten lassen auf einen Einfluss des thrombozytären Membranpotentials auf die Thrombozytenfunktion schließen (75).

In Bezug auf thrombozytäre Aggregation ist ebenfalls mehrfach ein teilweise membranpotential-abhängiger Effekt gezeigt worden. Depolarisation steigerte die ADP-induzierte Aggregation (72; 112; 158). Da basale Aggregation ohne Stimulus nicht reproduzierbar messbar ist, verwendeten wir stets Stimuli (ADP, Thrombin, Kollagen) zur Induktion der Aggregationsreaktion. In unseren Versuchansätzen hatte Hyperpolarisation mit EDHF-Überständen oder EETs (bis zu 10 μ mol/L) keinen Einfluss auf die thrombozytäre Aggregation. Eine mögliche Erklärung wäre das Überwiegen von membranpotential-unabhängigen Signalwegen der thrombozytären Aggregation nach Beginn der Aggregationsreaktion mit membranpotential-unabhängigen Stimuli, wie ADP, Thrombin oder Kollagen.

Möglicherweise hat EDHF / haben EETs aber durch Hyperpolarisierung des thrombozytären Ruhemembranpotentials einen protektiven Effekt, indem membranpotential-abhängig eine Hemmung der thrombozytären Adhäsion vermittelt wird. Durch Hyperpolarisation könnten EDHF / EETs den Schwellenwert für das Öffnen spannungsabhängiger K_V -Kanäle modulieren und dadurch potentiell protektive Effekte ausüben (75).

Ein weiterer Mechanismus der erniedrigten Adhäsion könnte in der Verringerung der Degranulation und somit einer erniedrigten Adhäsionsmolekülexpression in der Thrombozytenmembran liegen (83). Wir konnten durch EDHF / EETs eine deutliche Reduktion der basalen sowie insbesondere der ADP-induzierten P-Selektin Expression messen. Auch diese Effekte des EDHF / der EETs wurden zumindest teilweise durch Potentialänderungen infolge Aktivierung Calcium aktivierbarer Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt.

Die physiologische Blutstillung mit thrombozytärer Aktivierung, Adhäsion und Aggregation ist nach dem gegenwärtigen Verständnis ein hochkomplexer Vorgang mit unterschiedlichen, teilweise parallel, teilweise seriell, überwiegend synergistisch ablaufenden Prozessen.

Bei Gefäßwandverletzung kommt es zur Freilegung von subendothelialer Matrix, insbesondere von Kollagen, einem thrombozytären Stimulus. Dieser Kontakt der Thrombozyten löst via GP VI, dem wichtigsten thrombozytären Kollagenrezeptor, ihre erste Antwort, nämlich Aktivierung und Aggregation aus (92; 93).

Bei Aktivierung schütten Thrombozyten u.a. den Inhalt ihrer α -Granula aus - hierdurch wird unter anderem thrombozytäres P-Selektin exprimiert, welches in funktionsfähiger Form in großer Anzahl in thrombozytären α -Granula gespeichert wird und nach Aktivierung mit der Zellmembran fusioniert. Thrombozytäres P-Selektin scheint - neben insbesondere von Willebrand factor (vWF) via GPIb-V-IX Komplex - auch teilweise an der initialen Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen beteiligt zu sein, indem Thrombozyten aus dem Blutfluss abgebremst werden und das so genannte „Thrombozyten-rolle“ entsteht (92).

Weiterhin schütten (durch Verletzung oder Stimulation) aktivierte Endothelzellen u.a. die Inhaltsstoffe ihrer intrazellulären Speicher, die so genannten Weibel-Palade-Körperchen, aus und exprimieren diverse Faktoren, wie auch endotheliales P-Selektin (152). Neben P-Selektin, Endothelin und einigen proinflammatorischen Faktoren, wie beispielsweise Interleukin-8, ist dies das Plasmaprotein von Willebrand factor (vWF), welches gerade bei Gefäßverletzung eine große Rolle in der Regulierung der thrombozytären Aggregation und Adhäsion spielt (32; 152). Das Adhäsionsmolekül vWF bindet bei Thrombozyten an zwei oberflächlichen Rezeptoren, dem Glykoprotein (GP) Ib-V-IX sowie dem Integrin Alpha (IIb) beta 3 (42; 135). Die gegenwärtige Hypothese der initialen transienten Adhäsion besagt, dass insbesondere der Kontakt von vWF mit thrombozytärem GP Ib-V-IX weitere Thrombozyten aus dem Blutfluss rekrutiert und zur Bildung des so genannten „weißen Thrombus“ beiträgt. Durch weitere thrombozytäre Aktivierung und damit auch weitere Expression von thrombozytärem P-Selektin und alpha (IIb) beta (3), dem

Fibrinogen-Rezeptor, und durch Kontakt mit Kollagen, z.B. via GP VI, wird eine feste Adhäsion begünstigt (33; 105; 129). Ein Effekt von Kollagen ist die Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors. Dadurch wird die feste thrombozytäre Vernetzung durch Fibrinogen via thrombozytäre $\alpha\text{IIb}\beta_3$ Rezeptoren (3) begünstigt. Durch die parallel ablaufende plasmatische Gerinnung und durch den Einbau von Leukozyten und Erythrozyten kann sich der so genannte „rote Thrombus“ formieren (37; 93; 97; 101; 102; 106; 107; 156).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von P-Selektin im hochkomplexen System der Homöostase sowohl teilweise im Bereich der ersten lockeren Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen als auch gerade in der irreversiblen festen Adhäsion mitbeteiligt zu sein scheint. Weiterhin stellt thrombozytäres P-Selektin einen generellen Aktivierungs-Marker von Thrombozyten dar.

Die Reduktion der thrombozytären Aktivierung, gemessen an einer reduzierten P-Selektin Expression, könnte also eine mögliche Erklärung für die beobachtete verringerte feste thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen und damit die Hemmung der Thrombusbildung darstellen.

Wir konnten zeigen, dass EDHF / EETs die thrombozytäre Adhäsion sowie die thrombozytäre Aktivierung an HUVEC in vitro reduzieren kann. Wie groß der Einfluss dieser Effekte im komplexen Gerinnungssystem in vivo ist und ob EDHF / EETs möglicherweise weitere Teile dieses Systems beeinflussen, müssen künftige Experimente, insbesondere unter in vivo Bedingungen, zeigen.

5.4. Sind die funktionellen EDHF / EET-Effekte auf Thrombozyten vom Membranpotential abhängig?

Ging man zunächst von einer rein membranpotential-abhängigen Wirkweise des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors aus, so sind seit einiger Zeit für EDHF und insbesondere EETs auch vom Membranpotential unabhängige Effekte beschrieben. So beschrieben Node et al. 1999 erstmals, dass EETs die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (109) oder Aktivierung kleiner G-Proteine (110) reduzieren können. Fleming et al. beschrieben weitere intrazelluläre vom Membranpotential unabhängige Effekte von EETs (49). Diese beeinflussen hierbei mehrere endotheliale Signalkaskaden der Zellproliferation und Angiogenese. Somit können EETs auch als wichtige intrazelluläre „second-messenger“ mit Verstärkungs- und Modulationseigenschaften wirken (49; 50).

Das wirft die Frage auf, ob die von uns beobachteten, insbesondere funktionellen Effekte membranpotentialabhängig oder -unabhängig vermittelt wurden.

EDHF und externe EETs hyperpolarisierten Thrombozyten und verringerten deren Adhäsion an Endothelzellen. Allerdings kann daraus nicht geschlossen werden, dass die Wirkung via Hyperpolarisation allein, also vom Membranpotential abhängig, vermittelt wurde. Ein möglicherweise zusätzlicher vom Membranpotential unabhängiger Effekt kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings spricht für eine wichtige Rolle des Membranpotentials die Tatsache, dass thrombozytäre Depolarisation mit verschieden Stimuli unterschiedlicher Wirkungsweise jeweils eine erhöhte Adhäsion an Endothelzellen bewirkte. Dabei wurden neben Charybdotoxin auch 4-Aminopyridin, ein unspezifischer Kalium-Kanal Blocker, verwendet. Dabei ergab sich eine Art Dosis-Wirkungs-Beziehung: Je größer die thrombozytäre Depolarisation war desto mehr thrombozytäre Adhäsion an HUVEC zeigte sich.

Bei der P-Selektin Expression zeigte sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der thrombozytären Degranulation je mehr die Thrombozyten depolarisiert wurden. So bewirkte neben Tetrabutylammonium, ein unspezifischer Kaliumkanalblocker, auch Gramacidin, ein potenter Kationenionophor und nicht zuletzt stark depolarisierende hohe Kalium-Konzentration selbst, eine vermehrte thrombozytäre Degranulation, gemessen an membranärer P-Selektin Expression.

Auffällig ist die Tatsache, dass Charybdotoxin allein zu keiner messbar erhöhten thrombozytären Degranulation und P-Selektin Expression führte, obwohl es eine starke Depolarisation induzierte und die thrombozytäre Adhäsion signifikant steigerte. Das deutet darauf hin, dass neben der Depolarisation noch andere Aktivierungsprozesse von Bedeutung sind. Dazu passt die Beobachtung, dass die durch EDHF und EETs auf Thrombozyten vermittelte Hyperpolarisation und reduzierte P-Selektin Expression nur mäßig ausgeprägt war, während die durch EDHF / EETs Behandlung erzielte Hemmung der thrombozytären Adhäsion an Endothelzellen sehr ausgeprägt war. Dieser „quantitative“ Unterschied könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass neben Membranpotential-abhängigen Effekten auch noch andere Signalwege von Bedeutung sind. Beispielsweise könnten über thrombozytäre G-Proteine intrazelluläre Signalkaskaden mit Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert worden sein wie es für Endothelzellen beschrieben wurde (49).

Ob EETs allerdings durch die thrombozytäre Membran diffundieren können oder ob sie via transmembranärer Proteine oder anderer Fettsäuren intrazelluläre Reaktionen in Thrombozyten bewirken können, ist aktuell noch unklar.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass für die funktionellen EDHF / EETs Effekte auf Thrombozyten die beobachteten Änderungen des Membranpotentials eine wichtige Rolle spielten, aber eine Rolle anderer Signalwege, die ebenfalls von EDHF / EETs beeinflusst worden sein könnten, nicht ausschließen.

5.5. Identität von EDHF - Sind EDHF und EETs identisch?

Als erstes Indiz, dass EDHF eine EET darstellen könnte, ist die beobachtete Analogie der thrombozytären Beeinflussung der von den Endothelzellen im Rahmen unseres Bioassays (s. 3.6.1.) gewonnenen Überständen und den extern zugegebenen Epoxyeicosatriensäuren (EETs) zu werten. Beide hyperpolarisierten Thrombozyten, verringerten die Adhäsion an HUVEC und hemmten die ADP-induzierte Degranulation. Diese Effekte waren allesamt über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt.

Um die Frage der Identität unseres EDHF weiter klären zu können, generierten wir eine CYP2C9 stabil überexprimierende Zelllinie. Auch Überstände dieser Zelllinie hyperpolarisierten Thrombozyten und hemmten ihre Adhäsion an HUVEC nach endothelialer Bradykinin-Stimulation deutlich. Auch diese Effekte waren über Calcium aktivierbare Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle) vermittelt, was als ein weiteres Indiz der EDHF - EET Analogie gewertet werden kann.

Um letztendlich Klarheit zu bekommen, wurden die gewonnenen Überstände der CYP2C9 stabil überexprimierenden Zelllinie durch Massenspektrometrische-Liquidchromatografische Messung (MSLC) auf ihren EET-Gehalt hin analysiert.

In der Tat ließen sich in allen analysierten Proben relevante Konzentrationen verschiedener EETs nachweisen. Durch Bradykinin-Stimulation ließ sich die Menge der nachgewiesenen EETs in allen Proben noch deutlich steigern. Allerdings zeigte sich mit 89,6 nmol/L (unstimuliert) und 155,4 nmol/L (BK-stimuliert) die größte Menge des Stereoisomers 8,9-EET. In geringerer Konzentration zeigte sich mit 58,0 nmol/L und nach Stimulation 119,2 nmol/L 14,15-EETs.

Überraschenderweise zeigte sich nur 0,62 nmol/L und stimuliert 0,94 nmol/L des Stereoisomers 11,12-EET. Das Isomer 5,6-EET konnte nicht nachgewiesen werden.

Ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnten weitere Lipooxygenase Produkte, wie z.B. (z.B. 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE), trotz hochsensitiver Meßmethoden (133).

Bezüglich der Menge der detektierten EETs in den Überständen ist festzustellen, dass wir mit 100 nmol/L 11,12-EETs thrombozytäre Hyperpolarisation und funktional hemmende Effekte auf Thrombozyten messen konnten. Allerdings fanden sich in den analysierten Proben erstaunlicherweise nur geringe - allein wahrscheinlich nicht wirksame - Mengen des Stereoisomers 11,12-EET. Es fanden sich jedoch relevante Mengen der Stereoisomere 8,9- und 14,15-EETs in den analysierten Proben. Addiert man die Menge von nachgewiesenen 8,9-, 11,12- und 14,15-EETs pro stimulierter Probe zusammen, ergibt sich ein Gehalt von etwa 275 nmol/L. Diese Menge an wirksamen Gesamt-EETs ist mit den von uns gemessenen Effekten gut vereinbar, wobei die Menge des Verlustes der Schockgefrierung und ggf. des Transportes der Überstände noch nicht berücksichtigt wurde. Weiterhin ist zu beachten, dass lediglich das CYP2C9-Gen, nicht aber die Kombination aus CYP2C8/9, stabil transfiziert werden konnte und sich daraus potentiell auch geringere EET-Konzentrationen ergeben könnten.

Da bei Beginn dieser Arbeit die meisten Daten für 11,12-EET vorlagen und wir zudem - bezogen auf die Dosis - die größten hyperpolarisierenden Effekte mit exogenem 11,12-EET gemessen haben, wurde die Mehrzahl der Versuche mit dieser Isoform durchgeführt. Allerdings zeigten sowohl 8,9-EET als auch 14,15-EET signifikant hyperpolarisierende Wirkung auf Thrombozyten (1 μ mol/L).

Abschließend kann gesagt werden, dass die MSLC-Messungen als ein weiterer Hinweis dafür verstanden werden können, dass Epoxyeicosatriensäuren (EETs) in unseren Ansätzen als EDHF fungierten. Der in dieser Arbeit untersuchte EDHF wurde demzufolge wohl Cytochrom P450 2C8/9-abhängig gebildet.

5.6. Mögliche pathophysiologische Konsequenzen

Endotheliale Dysfunktion, Verminderung der endothelabhängigen Relaxation sowie aktivierte Thrombozyten selbst sind an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt (60; 92; 94; 134; 139). Als Hauptursachen für den plötzlichen thrombotischen Verschluss mit folgendem ischämischen Herzinfarkt werden Aggregation und Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an instabilen atherosklerotischen Plaques angesehen (55).

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir nun erstmals zeigen, dass kultivierte und stimulierte Endothelzellen einen Cytochrom P450 2C8/9-abhängig gebildeten EDHF freisetzen, der NO- und Prostazyklin-unabhängig Thrombozyten hyperpolarisiert und deren Aktivierung und Adhäsion an Endothelzellen vermindert. Diese Effekte scheinen, zumindest teilweise, vom Membranpotential abhängig zu sein (75). Auch endotheliale Depolarisation und die daraus resultierende endotheliale Superoxid-Freisetzung kann Thrombozyten im Sinne einer Aktivierung beeinflussen (77-79).

Für die wichtigen beiden anderen vom Endothel produzierten relaxierenden Autakoiden, Stickoxid (NO) und Prostazyklin (PGI_2), sind vielfache gefäß- und kardioprotektive Effekte beschrieben. So hemmen sie die thrombozytäre Aggregation (4; 12; 86) und sowohl NO als auch Prostazyklin sind damit bedeutende Schutzfaktoren gegen das Entstehen arterieller Thrombosen (70; 100; 119).

Unsere Daten unterstreichen, dass auch EDHF Einfluss auf wichtige thrombozytäre Funktionen, insbesondere ihre Adhäsion, hat. Eine besondere Rolle würde EDHF dann spielen, wenn er in atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßen oder unter den Bedingungen einer vermehrten Superoxidproduktion (Inaktivierung von NO) im Gegensatz zu NO unverändert gebildet würde oder wirksam wäre. Obwohl bei NO Hemmung theoretisch mehr EDHF gebildet werden kann (5) ist diese Frage noch unklar. Immerhin konnte im Tiermodell an diabetisch vorgeschädigten

Widerstandsarterien der Ratte sowie an Gefäßen von eNOS-knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass EDHF unter diesen Bedingungen eine bedeutende Rolle der (verbleibenden) endothelialen Gefäßdilatation einnehmen kann (13; 146; 160).

Es ist daher zumindest vorstellbar, dass der EDHF-vermittelte hyperpolarisierende, vasodilatatorische und antithrombozytäre Effekt auch im Bereich humaner pathophysiologisch vorgeschädigter Gefäße, z.B. bei atherosklerotisch bedingter Reduktion der NO- und Prostazyklinproduktion, eine zentrale Rolle einnehmen und dann die Bedeutung anderer autakoider antithrombozytärer Faktoren unter diesen Bedingungen sogar noch übertreffen könnte (73; 146). Umgekehrt gibt es vereinzelt Hinweise, dass Störungen der EET / EDHF Produktion bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie z.B. Hypertonus oder renalen Erkrankungen, eine Rolle einnehmen könnten: Bei geringerer CYP2C-Expression und verminderter EET-Produktion zeigte sich eine höhere Inzidenz dieser Erkrankungen (22; 71; 90; 132; 162).

Ob diese von uns beobachteten Effekte aber tatsächlich die theoretisch mögliche klinische Relevanz haben, muss in weiteren tierexperimentellen in-vivo Experimenten und schließlich auch entsprechenden klinischen Studien geklärt werden. Auch die Frage, ob EETs bereits von unstimulierten Endothelzellen in ausreichender Menge gebildet werden können, ist noch nicht ausreichend geklärt.

Vielversprechend sind jedoch Daten von Archer et al., die eine deutlich höhere basale und stimulierte Freisetzung von Epoxyeicosatriensäuren, insbesondere 11,12-EET, in der linken Arteria mammaria interna (LIMA) als in der A. radialis und der Vena saphena magna zeigen (2; 64; 85). Viele vergleichende Untersuchungen zeigen, dass die Wiederverschlußrate der LIMA-Bypässe verschwindend gering ist im Vergleich zu Bypässen unter Verwendung der Arteria radialis und der Vena saphena magna (2; 64; 85). Es lässt sich spekulieren, dass für diese positiven Ergebnisse in der LIMA die thrombozytenhemmende Wirkung von EDHF mit verantwortlich ist. Da in der LIMA normalerweise keine Atherosklerose

auftritt, wäre es vorstellbar, dass die EET-abhängig verminderte thrombozytäre Adhäsion in menschlichen Gefäßen möglicherweise einen eigenständigen und wichtigen protektiven Mechanismus bei Atherosklerose und thrombotischen Komplikationen darstellen könnte.

Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass auch Thrombozyten selbst, nach Stimulation mit Thrombin oder Plättchen-Aktivierendem-Faktor (PAF), EETs aus ihren Membranen freisetzen können (164). Möglicherweise könnte dadurch auch ein vom Endothel freigesetztes EET-Signal vom Thrombozyten durch weitere EET-Freisetzung noch selbständig verstärkt werden.

In Zusammenschau verdeutlichen diese Daten eine möglicherweise wichtige Rolle von EETs und EDHF im menschlichen Koronar- und Herz-Kreislauf-System und eröffnet damit zukünftige Therapieoptionen, die auf eine Verbesserung der EDHF-Wirkung abzielen. Neue therapeutische medikamentöse Ansätze über EDHF / EETs sowie Membranpotential-modulierung sind zukünftig vorstellbar und könnten in der Therapie der Herz-Kreislauf-Krankheiten, die derzeit noch immer die häufigste Todesursache in der nördlichen Hemisphäre darstellen, von Bedeutung werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der potentielle Einfluss des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) auf Thrombozyten untersucht und geprüft, ob die EDHF Wirkungen durch eine (oder mehrere) Epoxyeicosatriensäuren (Produkte der endothelialen CYP450 Monooxygenase) ausgelöst sein könnten.

EDHF wurde bisher hauptsächlich, neben NO und Prostazyklin, als dritter funktionell bedeutender vom Endothel gebildeter vasodilatierender Faktor charakterisiert. Für NO und Prostazyklin ist vielfach eine Freisetzung in das Gefäßlumen und damit neben der lokalen dilatierenden Wirkung auch eine Beeinflussung zirkulierender Blutbestandteile, wie Thrombozyten beschrieben. Beide können die thrombozytäre Aktivierung und Aggregation effektiv hemmen und dadurch gefäßprotektive Wirkungen ausüben. Ob EDHF ebenfalls Blutbestandteile wie Thrombozyten beeinflussen kann, war die Hauptfragestellung dieser Arbeit.

Wir konnten erstmals im Bioassay zeigen, dass kultivierte menschliche Endothelzellen (HUVEC) nach entsprechender Stimulation einen EDHF freisetzen, der Thrombozyten hyperpolarisiert. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass dieser Faktor die thrombozytäre Adhäsion an Endothelzellen sowie die thrombozytäre Aktivierung (P-Selektin Expression) hemmte. Diese Effekte waren - analog zu den hyperpolarisierenden Effekten - vermittelt durch Aktivierung von Calcium aktivierbaren Kalium-Kanälen (K_{Ca} -Kanäle) mit großer (BK_{Ca}) und mittlerer (IK_{Ca}) Leitfähigkeit, nicht jedoch von denen mit geringerer (SK_{Ca}) Leitfähigkeit.

Die beobachteten Hemmeffekte waren durch die EDHF Wirkungen auf das thrombozytäre Membranpotential erklärbar, ein zusätzlicher

ergänzender membranpotentialunabhängiger Effekt konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Der in unserem Bioassay nachweisbare EDHF zeigte ähnliche Eigenschaften wie exogen verabreichte Epoxyeicosatriensäuren (EETs) - Produkte, die durch die Cytochrom P450 2C8/9 Oxidase im Endothel aus Arachidonsäure gebildet werden. Erhärtet wurden diese Befunde durch eine CYP2C9 stabil überexprimierende Zelllinie mit endothelialen Eigenschaften, welche verschiedene EETs in physiologischen Konzentrationen freisetzte und deren Überstand ähnliche hyperpolarisierende und antiadhäsive Effekte auf Thrombozyten wie der EDHF hatte. EDHF stellte somit unter unseren experimentellen Bedingungen eine Epoxyeicosatriensäure (oder eine Mischung verschiedener EETs) dar.

Bei vielen Herz-Kreislauf Erkrankungen spielen thrombozytäre Aktivierung und Adhäsion eine wichtige Rolle. Insbesondere beim akuten Herzinfarkt, der Haupttodesursache in westlichen Industrieländern, kommt es in pathophysiologisch, z.B. durch Atherosklerose, vorgeschädigten Gefäßen, aufgrund einer arteriellen Thrombusbildung zum kompletten Gefäßverschluss mit Myokardischämie. Daher könnte EDHF bzw. EET - infolge seiner thrombozytenhyperpolarisierenden und antiadhäsiven Effekte - von großer Bedeutung sein, vor allem, wenn er durch Risikofaktoren wie freie Sauerstoffradikale und Hyperlipidämie weniger stark beeinflusst würde als NO.

Die Daten dieser Dissertation könnten somit zukünftiger Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sowie Basis für die Entwicklung potentiell gefäßprotektiver Medikamente zur effektiveren Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Abc | Abciximab |
| ACh | Acetylcholin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| APA | Apamin |
| aqua dest. | aqua destillata, destilliertes Wasser |
| BK | Bradykinin |
| BK _{CA} | Calciumaktivierter Kaliumkanal mit großer (big) Leitfähigkeit |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CBTX | Charybdotoxin |
| CYP | Cytochrom P450 Oxidase |
| CYP2C9 | Untertyp 2C9 der Cytochrom P450 Oxidase |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EA.hy926 | Endotheliale Hybridzelllinie |
| EC | Endothelzellen, <u>endothelial cells</u> |
| EDHF | <u>endothelium-derived hyperpolarizing factor</u> = endothelialer hyperpolarisierender Faktor |
| EET | Epoxyeicosatriensäure |
| et al. | et altera, und weitere |
| g | Einheit der Fliehkraft |
| IBTX | Iberiotoxin |
| Fa. | Firma |
| h | Stunden |
| HUVEC | <u>human umbilical vein endothelial cells</u> = menschliche venöse Nabelschnur Endothelzellen |
| IK _{CA} | Calciumaktivierter Kaliumkanal intermediärer Leitfähigkeit |
| K _{CA} | Calciumaktivierter Kaliumkanal |

| | |
|------------------|--|
| L | Liter |
| LIMA | linke Arteria mammaria interna |
| L-NA | N _ω -Nitro-L-Arginin |
| mind. | mindestens |
| mg | Milligramm |
| mV | Millivolt |
| μg | Mikrogramm |
| ml | Milliliter |
| μl | Mikroliter |
| mM | Millimolar, mmol/L |
| μM | Mikromolar, μmol/L |
| n | Anzahl |
| n.b. | nicht bestimmt |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar, nmol/L |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAF | Plättchen-Aktivierender-Faktor |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion, <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction |
| pg | Picogramm |
| PGI ₂ | Prostazyklin, Prostaglandin I ₂ |
| PRP | <u>p</u> latelet <u>r</u> ich <u>p</u> lasma = Thrombozyten-Reiches Plasma |
| PPP | <u>p</u> latelet <u>p</u> oor <u>p</u> lasma = Thrombozyten-Armes Plasma |
| Rpm. | <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute = Umdrehungen pro Minute |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| s.o. | siehe oben |
| sog. | so genannte |
| SK _{CA} | Calciumaktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit |
| Tab. | Tabelle |
| u.a. | unter anderem |
| z.B. | zum Beispiel |

7.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Arachidonsäure-Produkte
- Abbildung 2:** Prinzip Membranpotential-sensitiver Farbstoffe
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung des EDHF-Bioassay
- Abbildung 4:** Fluoreszenzspektrum von Calcein AM
- Abbildung 5:** Durchflußzytometrie der Eichreihe
- Abbildung 6:** Einfluss verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen auf die DiBAC₄(3) - abhängige Fluoreszenz von Thrombozyten
- Abbildung 7:** Hyperpolarisierende Wirkung der EDHF Überstände auf Thrombozyten
- Abbildung 8:** Einfluss verschiedener K_{Ca}-Kanal Hemmstoffe auf EDHF-Wirkung
- Abbildung 9:** rtPCR des CYP2C8/9-Gens
- Abbildung 10:** Restriktionsenzymverdau des CYP2C8/9-Gens mit Bcl1
- Abbildung 11:** Kinetik der 11,12-EET Hyperpolarisation
- Abbildung 12:** Thrombozytäre Hyperpolarisation mit verschiedenen EET-Isoformen
- Abbildung 13:** Einfluss verschiedener K_{Ca}-Kanal Hemmstoffe auf EET-Wirkung
- Abbildung 14:** Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter EDHF
- Abbildung 15:** Repräsentative Bilder der Thrombozyten-Adhäsion an Endothelzellen
- Abbildung 16:** Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter Depolarisation
- Abbildung 17:** Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC unter 11,12-EET
- Abbildung 18:** Thrombozytäre Degranulation mit EDHF-Wirkung
- Abbildung 19:** Thrombozytäre Degranulation mit 11,12-EET-Wirkung

- Abbildung 20:** Thrombozytäre Degranulation mit 11,12-EETs und K_{Ca} -Hemmstoffen
- Abbildung 21:** Thrombozytäre Degranulation und Depolarisation
- Abbildung 22:** Western-Blot der Proteinexpression von CYP2C9
- Abbildung 23:** Thrombozytäre Hyperpolarisation mit Überständen transfizierter Zellen
- Abbildung 24:** Thrombozytäre Adhäsion an HUVEC mit Überständen von transfizierten Zellen
- Abbildung 25:** MSLC -Analysen der Überstände stabil CYP2C9 transfizierter EA.hy-Zellen
- Tabelle 1:** Thrombozytäre Membranpotentialwerte in mV

7.3. Literaturverzeichnis

1. **Albelda SM, Daise M, Levine EM and Buck CA.** Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 83: 1992-2002, 1989.
2. **Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR and Michelakis ED.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation* 107: 769-776, 2003.
3. **Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH and Fuster V.** Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* 10: S43-S50, 1992.
4. **Bassenge E.** Antiplatelet effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide donors. *Eur Heart J* 12 Suppl E: 12-15, 1991.
5. **Bauersachs J, Popp R, Fleming I and Busse R.** Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor: formation and interactions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57: 439-446, 1997.
6. **Becker BF, Heindl B, Kupatt C and Zahler S.** Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 89: 160-167, 2000.
7. **Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr. and Seed B.** Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165, 1989.
8. **Block LH and Buhler FR.** Atherosclerosis, cell motility, calcium, and calcium-channel blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 Suppl 2: S1-S3, 1992.
9. **Body SC.** Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 Suppl 1: S13-S25, 1996.
10. **Bolz SS, de Wit C and Pohl U.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca²⁺ during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br J Pharmacol* 128: 124-134, 1999.
11. **Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, de Wit C, Fleming I, Busse R and Pohl U.** Antisense oligonucleotides against cytochrome P450

2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J* 14: 255-260, 2000.

12. **Botting R and Vane JR.** Mediators and the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium. *Ann Med* 21: 31-38, 1989.
13. **Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I and Busse R.** An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9747-9752, 2000.
14. **Brauner T, Hulser DF and Strasser RJ.** Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim Biophys Acta* 771: 208-216, 1984.
15. **Bronner C and Landry Y.** The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisoxonol in mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1070: 321-331, 1991.
16. **Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM and Weston AH.** EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23: 374-380, 2002.
17. **Busse R, Fleming I and Hecker M.** Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J* 14 Suppl I: 2-9, 1993.
18. **Busse R, Trogisch G and Bassenge E.** The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol* 80: 475-490, 1985.
19. **Cabre F, Tost D, Suesa N, Gutierrez M, Ucedo P, Mauleon D and Carganico G.** Synthesis and release of platelet-activating factor and eicosanoids in human endothelial cells induced by different agonists. *Agents Actions* 38: 212-219, 1993.
20. **Campbell WB and Gauthier KM.** What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 177-183, 2002.
21. **Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF and Harder DR.** Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 78: 415-423, 1996.
22. **Carroll MA, Escalante B and McGiff JC.** Cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid: implications for blood pressure regulation. *Pol J Pharmacol Pharm* 42: 191-201, 1990.

23. **Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A and Hobbs AJ.** Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1426-1431, 2003.
24. **Chaytor AT, Martin PE, Edwards DH and Griffith TM.** Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by ACh in the rat hepatic artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2441-H2450, 2001.
25. **Coats P, Johnston F, MacDonald J, McMurray JJ and Hillier C.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor : identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation* 103: 1702-1708, 2001.
26. **Cohen RA and Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92: 3337-3349, 1995.
27. **Coleman HA, Tare M and Parkington HC.** K⁺ currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J Physiol* 531: 359-373, 2001.
28. **Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT and Creager MA.** Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 83: 1057-1062, 1991.
29. **de Silva HA, Carver JG and Aronson JK.** Pharmacological evidence of calcium-activated and voltage-gated potassium channels in human platelets. *Clin Sci (Lond)* 93: 249-255, 1997.
30. **de Wit C, Bolz SS and Pohl U.** Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Z Kardiol* 89 Suppl 9: IX/113-IX/116, 2000.
31. **de Wit C, Esser N, Lehr HA, Bolz SS and Pohl U.** Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *Am J Physiol* 276: H1527-H1534, 1999.
32. **de Wit TR and van Mourik JA.** Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 241-255, 2001.
33. **Dejana E, Languino LR, Colella S, Corbascio GC, Plow E, Ginsberg M and Marchisio PC.** The localization of a platelet GpIIb-IIIa-related protein in endothelial cell adhesion structures. *Blood* 71: 566-572, 1988.

34. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
35. **Dora KA.** Cell-cell communication in the vessel wall. *Vasc Med* 6: 43-50, 2001.
36. **Doughty JM, Boyle JP and Langton PD.** Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 130: 1174-1182, 2000.
37. **Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B and Furie BC.** Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 2006.
38. **Edelberg JM, Christie PD and Rosenberg RD.** Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circ Res* 89: 117-124, 2001.
39. **Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ and Weston AH.** K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272, 1998.
40. **Edwards G, Feletou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM and Weston AH.** Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128: 1788-1794, 1999.
41. **Edwards G, Thollon C, Gardener MJ, Feletou M, Vilaine J, Vanhoutte PM and Weston AH.** Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 129: 1145-1154, 2000.
42. **Falati S, Edmead CE and Poole AW.** Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. *Blood* 94: 1648-1656, 1999.
43. **Fine BP, Hansen KA, Salcedo JR and Aviv A.** Calcium-activated potassium channels in human platelets. *Proc Soc Exp Biol Med* 192: 109-113, 1989.
44. **Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R and Fleming I.** Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* 36: 270-275, 2000.

45. **Fisslthaler B, Michaelis UR, Randriamboavonjy V, Busse R and Fleming I.** Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone: novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression. *Biochim Biophys Acta* 1619: 332-339, 2003.
46. **Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I and Busse R.** Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401: 493-497, 1999.
47. **Fisslthaler B, Popp R, Michaelis UR, Kiss L, Fleming I and Busse R.** Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 38: 1427-1432, 2001.
48. **Fleming I.** Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res* 89: 753-762, 2001.
49. **Fleming I and Busse R.** Endothelium-Derived Epoxyeicosatrienoic Acids and Vascular Function. *Hypertension* 2006.
50. **Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R and Busse R.** The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflugers Arch* 442: 511-518, 2001.
51. **Freedman JC and Novak TS.** Optical measurement of membrane potential in cells, organelles, and vesicles. *Methods Enzymol* 172: 102-122, 1989.
52. **Friedhoff LT, Kim E, Priddle M and Sonenberg M.** The effect of altered transmembrane ion gradients on membrane potential and aggregation of human platelets in blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 832-837, 1981.
53. **Friedhoff LT and Sonenberg M.** The membrane potential of human platelets. *Blood* 61: 180-185, 1983.
54. **Furchgott RF.** The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 276: 1186-1188, 1996.
55. **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ and Chesebro JH.** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326: 310-318, 1992.

56. **Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vazquez J and Kaczorowski GJ.** Use of toxins to study potassium channels. *J Bioenerg Biomembr* 23: 615-646, 1991.
57. **Gebremedhin D, Harder DR, Pratt PF and Campbell WB.** Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *J Vasc Res* 35: 274-284, 1998.
58. **Gerber JG, Voelkel N, Nies AS, McMurtry IF and Reeves JT.** Moderation of hypoxic vasoconstriction by infused arachidonic acid: role of PGI₂. *J Appl Physiol* 49: 107-112, 1980.
59. **Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, Giddings BD and Edwards DH.** cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6392-6397, 2002.
60. **Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Wacławski MA, Nour KR and Quyyumi AA.** Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106: 653-658, 2002.
61. **Halldorsson H, Magnusson MK and Thorgeirsson G.** Different mechanisms of homologous and heterologous desensitization of thrombin-induced endothelial prostacyclin production. *Eur J Pharmacol* 208: 193-198, 1991.
62. **Haller H.** Endothelial function. General considerations. *Drugs* 53 Suppl 1: 1-10, 1997.
63. **Hamilton CA, McPhaden AR, Berg G, Pathi V and Dominiczak AF.** Is hydrogen peroxide an EDHF in human radial arteries? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2451-H2455, 2001.
64. **He GW and Liu ZG.** Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation* 104: I344-I349, 2001.
65. **Hecker M, Bara AT, Bauersachs J and Busse R.** Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 481 (Pt 2): 407-414, 1994.
66. **Hoepfl B, Rodenwaldt B, Pohl U and de Wit C.** EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in

hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H996-H1004, 2002.

67. **Hong SL and Deykin D.** Activation of phospholipases A2 and C in pig aortic endothelial cells synthesizing prostacyclin. *J Biol Chem* 257: 7151-7154, 1982.
68. **Horne WC, Norman NE, Schwartz DB and Simons ER.** Changes in cytoplasmic pH and in membrane potential in thrombin-stimulated human platelets. *Eur J Biochem* 120: 295-302, 1981.
69. **Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA and Fishman MC.** Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242, 1995.
70. **Ignarro LJ.** Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 3: 31-36, 1989.
71. **Imig JD.** Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F496-F503, 2005.
72. **Ishikawa Y and Sasakawa S.** Membrane potential of stored platelets and its effect on platelet functions. *Thromb Res* 45: 265-273, 1987.
73. **Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Behrens C, Real R, Degenhardt C, Orzechowski HD, Pries AR, Paul M and Hoyer J.** Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ Res* 89: 174-179, 2001.
74. **Krotz F.** Targeting arterial thrombosis - current concepts and future developments. *Curr Drug Targets* 7: 1231, 2006.
75. **Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB and Pohl U.** Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 595-600, 2004.
76. **Krotz F, Schiele TM, Zahler S, Konig A, Rieber J, Kantlehner R, Pollinger B, Duhmke E, Theisen K, Sohn HY and Klauss V.** Sustained platelet activation following intracoronary beta irradiation. *Am J Cardiol* 90: 1381-1384, 2002.
77. **Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V and Pohl U.** NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 100: 917-924, 2002.

78. **Krotz F, Sohn HY, Keller M, Gloe T, Bolz SS, Becker BF and Pohl U.** Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 2003-2009, 2002.
79. **Krotz F, Sohn HY and Pohl U.** Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1988-1996, 2004.
80. **Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW and Busija DW.** Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H406-H411, 2002.
81. **Li PL, Chen CL, Bortell R and Campbell WB.** 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circ Res* 85: 349-356, 1999.
82. **Li PL, Zhang DX, Ge ZD and Campbell WB.** Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K(Ca) channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1229-H1236, 2002.
83. **Liang ZQ, Zhu Y, Gu ZL, Lu Q and Fan PS.** [Effects of quercetin on platelet-endothelial cell adhesion and their expression of adhesion molecules]. *Yao Xue Xue Bao* 38: 574-577, 2003.
84. **Little TL, Xia J and Duling BR.** Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res* 76: 498-504, 1995.
85. **Liu ZG, Ge ZD and He GW.** Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein. *Circulation* 102: III296-III301, 2000.
86. **Macdonald PS, Read MA and Dusting GJ.** Synergistic inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Thromb Res* 49: 437-449, 1988.
87. **MacIntyre DE and Rink TJ.** The role of platelet membrane potential in the initiation of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 47: 22-26, 1982.
88. **Mahaut-Smith MP.** Calcium-activated potassium channels in human platelets. *J Physiol* 484 (Pt 1): 15-24, 1995.

89. **Mahaut-Smith MP, Rink TJ, Collins SC and Sage SO.** Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets. *J Physiol* 428: 723-735, 1990.
90. **Maier KG and Roman RJ.** Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 81-87, 2001.
91. **Maruyama Y.** A patch-clamp study of mammalian platelets and their voltage-gated potassium current. *J Physiol* 391: 467-485, 1987.
92. **Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B and Gawaz M.** A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196: 887-896, 2002.
93. **Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U and Nieswandt B.** A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 197: 41-49, 2003.
94. **Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J and Gawaz M.** Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 112: 1180-1188, 2005.
95. **Matoba T and Shimokawa H.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci* 92: 1-6, 2003.
96. **Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106: 1521-1530, 2000.
97. **Matsumoto Y, Takizawa H, Gong X, Le S, Lockyer S, Okuyama K, Tanaka M, Yoshitake M, Tandon NN and Kambayashi J.** Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thromb Res* 2006.
98. **Michaelis UR, Fisslthaler B, Medhora M, Harder D, Fleming I and Busse R.** Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). *FASEB J* 17: 770-772, 2003.

99. **Miura H and Gutterman DD.** Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* 83: 501-507, 1998.
100. **Moncada S.** Prostacyclin and arterial wall biology. *Arteriosclerosis* 2: 193-207, 1982.
101. **Moroi M, Jung SM, Okuma M and Shinmyozu K.** A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 84: 1440-1445, 1989.
102. **Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A and Diaz-Ricart M.** Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 88: 2081-2092, 1996.
103. **Nagao T and Vanhoutte PM.** Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* 445: 355-367, 1992.
104. **Nathan C and Xie QW.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-13728, 1994.
105. **Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH and Jackson SP.** Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem* 277: 2965-2972, 2002.
106. **Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H and Fassler R.** Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 20: 2120-2130, 2001.
107. **Nieswandt B and Watson SP.** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102: 449-461, 2003.
108. **Nithipatikom K, Grall AJ, Holmes BB, Harder DR, Falck JR and Campbell WB.** Liquid chromatographic-electrospray ionization-mass spectrometric analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Anal Biochem* 298: 327-336, 2001.
109. **Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC and Liao JK.** Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285: 1276-1279, 1999.

110. **Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC and Liao JK.** Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem* 276: 15983-15989, 2001.
111. **Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T and Luscher TF.** Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97: 2494-2498, 1998.
112. **Pales J, Lopez A and Gual A.** Platelet membrane potential as a modulator of aggregating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 944: 85-89, 1988.
113. **Palmer RM, Ashton DS and Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.
114. **Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
115. **Parkington HC, Chow JA, Evans RG, Coleman HA and Tare M.** Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo. *J Physiol* 542: 929-937, 2002.
116. **Pfister SL, Spitzbarth N, Edgemond W and Campbell WB.** Vasorelaxation by an endothelium-derived metabolite of arachidonic acid. *Am J Physiol* 270: H1021-H1030, 1996.
117. **Pipili E.** Platelet membrane potential: simultaneous measurement of diSC3(5) fluorescence and optical density. *Thromb Haemost* 54: 645-649, 1985.
118. **Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA and Lotz M.** Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann N Y Acad Sci* 557: 374-385, 1989.
119. **Pohl U and Busse R.** EDRF increases cyclic GMP in platelets during passage through the coronary vascular bed. *Circ Res* 65: 1798-1803, 1989.
120. **Pohl U, de Wit C and Gloe T.** Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol Scand* 168: 505-510, 2000.

121. **Pohl U, Herlan K, Huang A and Bassenge E.** EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 261: H2016-H2023, 1991.
122. **Pohl U, Heydari N and Galle J.** Effects of LDL on intracellular free calcium and nitric oxide-dependent cGMP formation in porcine endothelial cells. *Atherosclerosis* 117: 169-178, 1995.
123. **Pohl U, Holtz J, Busse R and Bassenge E.** Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8: 37-44, 1986.
124. **Pries AR and Kuebler WM.** Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 1-40, 2006.
125. **Quaschnig T, Ruschitzka FT, Maier W and Luscher TF.** [Role of endothelium in the etiology and therapy of atherosclerosis]. *Internist (Berl)* 41: 355-362, 2000.
126. **Quignard JF, Feletou M, Thollon C, Vilaine JP, Duhault J and Vanhoutte PM.** Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 127: 27-34, 1999.
127. **Quilley J, Fulton D and McGiff JC.** Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol* 54: 1059-1070, 1997.
128. **Raj JU, Toga H, Ibe BO and Anderson J.** Effects of endothelin, platelet activating factor and thromboxane A₂ in ferret lungs. *Respir Physiol* 88: 129-140, 1992.
129. **Reininger AJ, Agneskirchner J, Bode PA, Spannagl M and Wurzing LJ.** c7E3 Fab inhibits low shear flow modulated platelet adhesion to endothelium and surface-absorbed fibrinogen by blocking platelet GP IIb/IIIa as well as endothelial vitronectin receptor--results from patients with acute myocardial infarction and healthy controls. *Thromb Haemost* 83: 217-223, 2000.
130. **Reiss AB and Edelman SD.** Recent insights into the role of prostanoids in atherosclerotic vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 4: 395-408, 2006.
131. **Revtyak GE, Hughes MJ, Johnson AR and Campbell WB.** Histamine stimulation of prostaglandin and HETE synthesis in human endothelial cells. *Am J Physiol* 255: C214-C225, 1988.

132. **Roman RJ.** P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 82: 131-185, 2002.
133. **Rosolowsky M and Campbell WB.** Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1299: 267-277, 1996.
134. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
135. **Ruggeri ZM.** Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 78: 611-616, 1997.
136. **Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C and Levi R.** Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8664-8667, 1988.
137. **Sadow SL, Tare M, Coleman HA, Hill CE and Parkington HC.** Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 90: 1108-1113, 2002.
138. **Savage D, Perkins J, Hong LC and Bund SJ.** Functional evidence that K⁺ is the non-nitric oxide, non-prostanoid endothelium-derived relaxing factor in rat femoral arteries. *Vascul Pharmacol* 40: 23-28, 2003.
139. **Schachinger V, Britten MB and Zeiher AM.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899-1906, 2000.
140. **Schlossmann J, Feil R and Hofmann F.** Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 35: 21-27, 2003.
141. **Schorr K.** [Prostaglandins and endothelial cells]. *Z Kardiol* 74 Suppl 7: 93-97, 1985.
142. **Shaul PW, Farrar MA and Magness RR.** Prostacyclin synthesis and stimulation of cyclic AMP production in ovine fetal vasculature: heterogeneity in pulmonary and systemic arteries. *Dev Pharmacol Ther* 18: 89-99, 1992.
143. **Shimokawa H and Morikawa K.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* 39: 725-732, 2005.

144. **Sims PJ and Wiedmer T.** Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca^{++} - dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores. *Blood* 68: 556-561, 1986.
145. **Smyth EM and FitzGerald GA.** Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm* 65: 149-165, 2002.
146. **Sobey CG.** Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 28-38, 2001.
147. **Tanaka M, Kanatsuka H, Ong BH, Tanikawa T, Uruno A, Komaru T, Koshida R and Shirato K.** Cytochrome P-450 metabolites but not NO, PGI₂, and H₂O₂ contribute to ACh-induced hyperpolarization of pressurized canine coronary microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1939-H1948, 2003.
148. **Taylor SG and Weston AH.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 9: 272-274, 1988.
149. **Triggle CR and Ding H.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: is there a novel chemical mediator? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 153-160, 2002.
150. **Tsukahara H, Gordienko DV and Goligorsky MS.** Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 722-729, 1993.
151. **Ungvari Z and Koller A.** Selected contribution: NO released to flow reduces myogenic tone of skeletal muscle arterioles by decreasing smooth muscle Ca(2+) sensitivity. *J Appl Physiol* 91: 522-527, 2001.
152. **van Mourik JA, Romani dW and Voorberg J.** Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* 117: 113-122, 2002.
153. **Vanhoutte PM.** The endothelium and control of coronary arterial tone. *Hosp Pract (Off Ed)* 23: 77-4, 1988.
154. **Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K, Broxterman HJ, Gebbink MF and Pinedo HM.** Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* 96: 4216-4221, 2000.

155. **Waggoner A.** Optical probes of membrane potential. *J Membr Biol* 27: 317-334, 1976.
156. **Watson SP, Auger JM, McCarty OJ and Pearce AC.** GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 3: 1752-1762, 2005.
157. **Webb DJ.** Endogenous endothelin generation maintains vascular tone in humans. *J Hum Hypertens* 9: 459-463, 1995.
158. **Wencel-Drake JD and Feinberg H.** ADP induced depolarization of human platelet membrane potential. *Thromb Haemost* 53: 75-79, 1985.
159. **Widmann MD, Weintraub NL, Fudge JL, Brooks LA and Dellsperger KC.** Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo. *Am J Physiol* 274: H283-H289, 1998.
160. **Wigg SJ, Tare M, Tonta MA, O'Brien RC, Meredith IT and Parkington HC.** Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H232-H240, 2001.
161. **Yamamoto Y, Fukuta H, Nakahira Y and Suzuki H.** Blockade by 18 β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol* 511 (Pt 2): 501-508, 1998.
162. **Yu BN, Luo CH, Wang D, Wang A, Li Z, Zhang W, Mo W and Zhou HH.** CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. *Clin Chim Acta* 348: 57-61, 2004.
163. **Zhang RZ, Yang Q, Yim AP, Huang Y and He GW.** Role of NO and EDHF-mediated endothelial function in the porcine pulmonary circulation: comparison between pulmonary artery and vein. *Vascul Pharmacol* 44: 183-191, 2006.
164. **Zhu Y, Schieber EB, McGiff JC and Balazy M.** Identification of arachidonate P-450 metabolites in human platelet phospholipids. *Hypertension* 25: 854-859, 1995.

7.6. Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Überlassung des Themas, aber vor allem für die hervorragende fachliche Anleitung und überaus wertvollen Diskussionen. So wurde meine Ausbildung sowohl durch seine fachliche Beratung als auch persönliche Betreuung in entscheidender Weise geprägt.

Ein ganz besonderer Dank gilt ebenso Herrn PD. Dr. med. Florian Krötz, der durch sein grenzenloses Engagement, seine ausgezeichnete persönliche wie fachliche Betreuung und nicht zuletzt durch seinen großen Optimismus, maßgeblich an dem Entstehen dieser Arbeit beteiligt ist. Er stand mir stets fachlich, menschlich und freundschaftlich mit gutem Rat zur Seite.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn PD. Dr. med. Hae - Young Sohn, der jederzeit beratend zur Seite stand und die Arbeit nicht zuletzt durch wertvolle Erfahrungsberichte erleichterte.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich auch bei den anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts, Lehrstuhl für Vegetative Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, die ich im Laufe der Zeit sowohl fachlich als auch menschlich sehr zu schätzen gelernt habe, für ihre stete Hilfsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben und mich darüber hinaus stets in jeder erdenklichen Hinsicht großzügig unterstützt und gefördert haben.

Meiner langjährigen Lebenspartnerin, die gerade in schwierigen und teilweise frustrierenden Phasen dieser Arbeit mit viel Verständnis und Liebe eine unendlich große Stütze und Rückhalt für mich war und somit auch einen wesentlichen Anteil zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat, gilt ebenfalls ein ganz besonderer Dank.

7.5. Publikationen Tobias Riexinger

Originalarbeiten:

- Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment: **Blood** **2002**; 100 (3), 917-24.
- Krötz F, Riexinger T, Keller M, Sohn HY, Pohl U. 11,12-EETs hyperpolarize human platelets. In: **EDHF 2002**, Taylor and Francis Publishing, London, UK,
- Krötz F, Riexinger T, Keller M, Sohn HY, Pohl U. A Cytochrome P450 2C8/9-derived EDHF inhibits platelet adhesion to endothelial cells, **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** **2004** Mar;24 (3):595-600.

Abstracts (Auswahl):

- Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Riexinger T, Becker BF und Pohl U. Die Aktivität endothelialer Ectonucleotidasen wird durch Depolarisations-induzierte Superoxidbildung gehemmt: Bedeutung für Plättchenaggregation. **Z Kardiol** (2002).
- Krötz F, Riexinger T, Sohn HY, Gloe T, Keller M, Becker BF, Pohl U. Endothelial ectonucleotidase-activity is decreased by depolarisation-induced superoxide production. Implications for platelet aggregation. **Pfüger's Archiv/ European Journal of Physiology** (2002).
- Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Riexinger T, Keller M, Zahler S, and Pohl U. Enhanced platelet recruitment by NAD(P)H-oxidase dependent platelet superoxide release. **Pfüger's Archiv/ European Journal of Physiology** (2002).
- Krötz F, Riexinger T, Sohn HY, Pohl U. Effect of EDHF on platelet membrane potential. **JPET** (2002).
- Riexinger T, Krötz F, Sohn HY, Keller M, Pohl U. Effect of EDHF and external EETs on the membrane potential and function of human platelets. **J Vasc Res** (2002)
- Riexinger T, Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Ein Cyp2C8/9-abhängiger EDHF hemmt die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen. **Pfüger's Archiv/ European Journal of Physiology** (2003).
- Pohl U, Riexinger T, Sohn HY, Keller M, Krötz F. A Cytochrome P450 2C8/9-derived EDHF inhibits platelet adhesion to endothelial cells in vitro **Faseb** (2003), Federation of American Societies for Experimental Biology; P6836
- Krötz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Riexinger T, Plank Chr, Pohl U. Magneto-fektion - eine effiziente Technik für Antisense-Transfektion von Endothelzellen in vitro und in vivo. **Z Kardiol** (2003), Band 92, Suppl. 1, V900
- Riexinger T, Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Ein Cyp2C8/9-abhängiger EDHF hemmt die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen. **Z Kardiol** (2003), Band 92, Suppl. 1, V1443

7.4. Curriculum Vitae

Tobias Riexinger

| | | |
|----------------------|----------------------------|---|
| Geburtstag | 19. Juli 1977 | |
| Geburtsort | Heidelberg am Neckar | |
| Eltern : | | |
| Gerhard Riexinger | Oberstudienrat | |
| Dr. Gisela Riexinger | Oberärztin | |
| Ehestand | ledig | |
| Ausbildung | 1983 - 1987 | Grundschule Nußloch |
| | 1987 - 1996 | Humanistisches Kurfürst - Friedrich Gymnasium, Heidelberg |
| | 1996 | Abitur (Note: 1,7) |
| Zivildienst | 01/10/1996 - 31/10/97 | Rettungsdienst, Deutsches Rotes Kreuz, Schwetzingen, anschließend Weiterbildung z. Rettungssanitäter |
| Studium | 01/04/1998 - 30/11/2004 | Studium der Humanmedizin an Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| | März 2000 | Ärztliche Vorprüfung |
| | März 2001 | Erstes Staatsexamen |
| | September 2003 | Zweites Staatsexamen |
| | November 2004 | Drittes Staatsexamen (Gesamt: gut) Approbation 30.11.2004 |
| Ausland: | 2002 | London, Royal Brompton Hospital |
| | 2003 | Kapstadt, University of Stellenbosch |
| | 2004 | Sydney, University of Sydney New York, Mount Sinai Hospital |
| Promotion | Oktober 2000 | Beginn der experimentellen Phase der Promotionsarbeit am Institut für Physiologie, Lehrstuhl für Vegetative Physiologie Prof. Dr. med. U. Pohl der Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| | 03-12/2002 | Mehrere Postervorträge |
| | März 2003 | Vortrag Internationaler Physiologen- Kongress, Tübingen |
| | April 2003 | Vortrag Deutscher Kardiologen- Kongress, Mannheim |
| seit Februar 2005 | | Assistenzarzt im Deutschen Herzzentrum, München |