

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

**Funktion des Aktin-Zytoskelettproteins VASP für den
Thrombozyten shape change.
Untersuchungen an humanen und murinen Thrombozyten**

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

vorgelegt von

Martin Georg Wechsel
aus
Memmingen

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Schleicher
Prof. Dr. Andreas Dendorfer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Stand der Forschung	9
2.1	Die Hämostase	9
2.1.1	Die primäre Hämostase	9
2.1.2	Die sekundäre Hämostase	10
2.2	Die Gefäßwand	10
2.2.1	Das Endothel	10
2.3	Die Thrombozyten	11
2.3.1	Rolle innerhalb der Hämostase	11
2.3.2	Morphologie der Thrombozyten	12
2.3.3	Adhäsion	15
2.3.4	Formwandel	16
2.3.5	Aggregation	19
2.4	Thrombozytäre Membranglykoproteine	20
2.4.1	Integrine	20
2.4.2	Leucinreiche Glykoproteine	21
2.4.3	Selektine	21
2.4.4	Rezeptoren vom Immunglobulintyp	22
2.5	Hemmung der Thrombozytenaktivierung	22
2.5.1	Regulation der Adenylatzyklase- und Guanylatzyklase-Aktivität	23
2.5.2	cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen	24
2.5.3	Phosphodiesterasen	26
2.6	Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP)	27
2.6.1	Überblick	27
2.6.2	Die Rolle von VASP bei der Thrombozytenaktivierung	30
3	Fragestellung und Ziele der Arbeit	33

4	Material und Methoden	34
4.1	Material	34
4.1.1	Substanzen und Chemikalien	34
4.1.2	Puffer und Lösungen	36
4.1.3	Verwendete Stimulantien und Inhibitoren	38
4.1.4	Antikörper	39
4.1.5	Weitere Materialien und Geräte	39
4.1.6	Versuchstiere	40
4.2	Methoden	41
4.2.1	Blutabnahme beim Menschen	41
4.2.2	Blutabnahme bei VASP-Mäusen	41
4.2.3	Präparation humaner Thrombozyten	42
4.2.4	Präparation muriner Thrombozyten	43
4.2.5	Die Methode der Aggregometrie mit Messung von Formwandel und Aggregation	44
4.2.6	Messung des Formwandels bei Human- und Mäusethrombozyten	46
4.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.2.8	Immunologische Techniken: Western-Blotting	49
4.2.9	Elektronenmikroskopie	51
4.2.10	Statistische Auswertung	52
5	Ergebnisse	53
5.1	Untersuchungen zum <i>shape change</i> von Humanthrombozyten und Hemmwirkung durch cAMP- und cGMP- erhöhende Substanzen	53
5.1.1	Induktion von <i>shape change</i> durch ADP und U46619 bei Humanthrombozyten	53
5.1.2	Untersuchungen zur Hemmung des <i>shape change</i> durch cAMP- erhöhende Substanzen	55
5.1.3	Untersuchungen zur Hemmung des <i>shape change</i> durch cGMP- erhöhende Substanzen	57
5.1.4	VASP-Phosphorylierung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen	59

5.2	Untersuchungen zum <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Mausthrombozyten und Hemmwirkung durch cAMP- und cGMP- erhöhende Substanzen	64
5.2.1	Induktion von <i>shape change</i> durch ADP und U46619 bei VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Thrombozyten	64
5.2.2	Untersuchungen zur Hemmung des <i>shape change</i> durch cAMP- erhöhende Substanzen	67
5.2.3	Untersuchungen zur Hemmung des <i>shape change</i> durch cGMP- erhöhende Substanzen	71
5.2.4	VASP-Phosphorylierung der wt - Mausthrombozyten durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen	75
5.3	Vergleichende Untersuchungen der Aktivierung von Thrombozyten bei VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Mäusen mittels Rasterelektronenmikroskopie	78
5.3.1	Nachweis des morphologischen Aktivierungsgrades stimulierter Thrombozyten nach Aktivierung durch ADP und U46619	78
5.3.2	Morphologie der Thrombozyten nach Hemmung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen	81
6	Diskussion	84
6.1	Nachweis einer vergleichbaren Aktivierbarkeit von Human- und Maus- Thrombozyten	84
6.2	Nachweis einer vergleichbaren Aktivierbarkeit von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Maus-Thrombozyten	86
6.3	cAMP-erhöhende Substanzen führen zu einer Phosphorylierung von VASP und zu einer kompletten Hemmung des <i>shape change</i> von humanen Thrombozyten und murinen wt und VASP ^{-/-} -Maus- Thrombozyten	89
6.4	Wirkung von cGMP-erhöhenden Substanzen auf die Phosphorylierung von VASP und den <i>shape change</i> von humanen Thrombozyten und murinen wt und VASP ^{-/-} -Maus-Thrombozyten	90
7	Zusammenfassung	96

8	Abkürzungsverzeichnis	98
9	Abbildungsverzeichnis	101
10	Tabellenverzeichnis	103
11	Literaturverzeichnis	104

Danksagung

1 Einleitung

Der Blutkreislauf erfüllt wichtige Funktionen im menschlichen Körper. Er gewährleistet die Versorgung aller Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen, den Abtransport von Kohlendioxid und anderer Stoffwechselprodukte. Ausserdem dient er als Transportsystem für Hormone und Komponenten des Immunsystems. Der Aufrechterhaltung eines intakten Blutgefäßsystems kommt daher eine entscheidende Bedeutung für den menschlichen Organismus zu.

Die Haupt-Todesursache der westlichen Zivilisationen ist in über 50% die Folge einer kardiovaskulären Erkrankung (Ross, 1986; Ross, 1993; Ross, 1999). In Deutschland starben im Jahre 2008 365.000 Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2008). Ursache hierfür ist die Atherosklerose, die durch die WHO definiert wird als eine variable Kombination aus Intima- und Medieveränderungen der Arterien. Hierfür ist eine durch metabolische und andere Einflüsse bedingte Schädigung der Gefäßwände verantwortlich (Schoenhagen et al., 2000; Capron, 1988; Capron, 1989).

Atherosklerotische Ablagerungen sind charakterisiert durch einen chronisch-inflammatorischen Prozess in der Gefässwand (Libby, 2002) und entwickeln sich über Jahre und Jahrzehnte unter dem begünstigenden Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren (z.B. Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotin). Sie können als Angina pectoris, Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu akut lebensbedrohlichen Zuständen führen (Schoenhagen et al., 2000). Auch aufgrund des enormen Kostenfaktors dieser Erkrankungen besteht ein grosses Interesse an kardiovaskulärer Forschung mit dem Ziel der Verhinderung, Prophylaxe und optimierten Therapie der Grundkrankheit und deren Folgen. Dies kann aber nur erfolgen, wenn die Pathomechanismen der Initiation und Progression der Atherosklerose besser verstanden sind.

Zwei Zelltypen spielen hierbei eine besondere Rolle, nämlich die Blutplättchen (Thrombozyten) und Endothelzellen, welche die luminale Seite der Gefässwände auskleiden. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Analyse der

Thrombozyten-Aktivierung im frühen Stadium, den sogenannten Gestalt- oder auch Formwandel (engl. *shape change*). Der deutsche Anatom Max Schultze (1825-1874) beschrieb als erster im Jahre 1865 die Thrombozyten (Schultze, 1865). Dieser sah in den Blutplättchen „Kügelchen“ mit einem Durchmesser von 0,001 – 0,002 mm (Abb. 1-1).

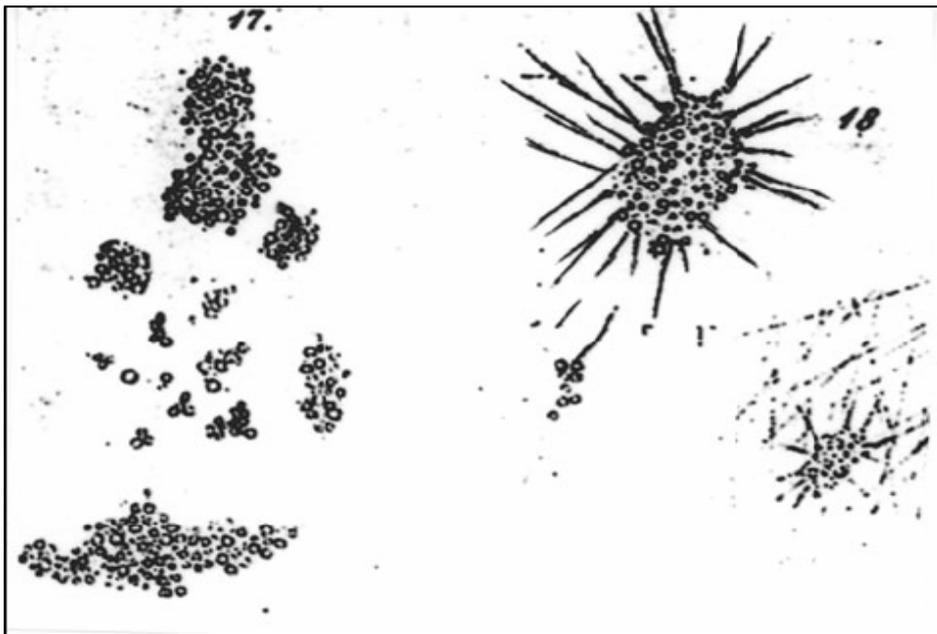


Abbildung 1-1: Schultzes Darstellung 17 und 18 des Blutplättchens.

Originalbeschriftung: Abb. 17. Die granulären Gebilde, die oft in großen Ansammlungen im normalen menschlichen Blut auftreten. Abb. 18. Dieselben nachdem das fibröse Material des Blutstropfen unter dem Deckgläschen geronnen ist (Schultze, 1865).

Im Jahre 1882 wurde durch den Pathologen Bizzozero erstmals die These („Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung“) formuliert, dass es eine von den roten und weißen Blutzellen unabhängige dritte Blutzellart gebe und er nannte sie Blutplättchen (Bizzozero, 1882).

Die Thrombozyten spielen im Rahmen der Atherosklerose eine auslösende und substantielle Rolle, weshalb ihre Funktion in physiologischer und pathophysiologischer Sicht seit Jahren mit im Zentrum der Atheroskleroseforschung steht. Mit $1,5-3,0 \times 10^5/\text{mm}^3$ stellen die Thrombozyten nach den Erythrozyten die zweitgrösste Zellpopulation des menschlichen Blutes dar. Blutplättchen entstehen im Knochenmark durch Abspaltung aus polyploiden „Mutterzellen“, den

Megakaryozyten. Sie sind kernlose Zellfragmente, diskoid geformt, besitzen einen Durchmesser von 2-3 μm bei einer Dicke von 1 μm und ihre Hauptaufgabe ist die Mitwirkung an der Hämostase.

Der physiologische Zustand der Thrombozyten unterliegt im Organismus einer feinen Regulation zwischen ruhender und aktivierter Form wie der Adhäsion, dem Formwandel, der Aggregation und eventuell einer Thrombus-Bildung (Abb. 1-2). Ihre Aktivierung ist eng verbunden mit dem humoralen System der Gerinnungsfaktoren. Diese führen bei Gefäßverletzung zur Ausbildung eines Fibrinnetzwerkes an der Stelle einer Läsion und im Zusammenspiel mit den Blutplättchen zur Ausbildung eines verschlussfähigen Thrombus. Hierbei adhären die Thrombozyten an die subendotheliale Matrix der geschädigten Gefäßwand, bilden ein Gerinnsel und führen so die Stillung der Blutung herbei.

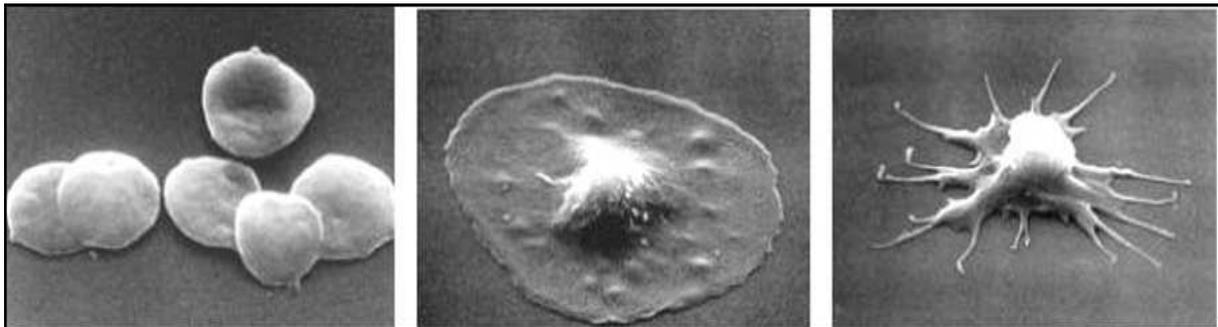


Abbildung 1-2: Die Thrombozytenaktivierung.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen im Bild links ruhende Thrombozyten mit diskoider Form, im mittleren Bild einen flach ausgebreiteten Thrombozyten und im rechten Bild die Ausbildung von Pseudopodien.

(Elektronenmikroskopie nach <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjmfam>)

Aus pathophysiologischer Sicht spielen die aktivierten Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Atherogenese mit den Folgen einer Gefäßverkalkung, Ausbildung einer koronaren Herzerkrankung und arteriellen Thrombusbildung z.B. im Rahmen eines Myokardinfarktes oder eines Schlaganfalls.

Es existieren vielfältige Mechanismen zur Aktivierung und auch zur Inhibition der Blutplättchen. Diese werden durch die Phosphorylierung spezifischer Signalproteine reguliert. Dabei wird die initiale Aktivierung mittels Ausbildung eines Formwandels der Blutplättchen von der Aggregation unterschieden. Beispielhaft zu nennende Aktivatoren sind Thromboxan A_2 , ADP, Lysophosphatidsäure, Thrombin und

Kollagen. Als Gegenspieler existieren Inhibitoren der Aktivierung wie Prostacyclin und Prostaglandin E₁ und weitere Substanzen, die durch Abhängigkeit von G-Proteinen eine Stimulierung der Adenylatzyklase bewirken. Durch die Aktivierung der Adenylatzyklase steigt die intrazelluläre Konzentration an cAMP und die cAMP-abhängige Proteinkinase A wird aktiviert. Dadurch werden spezifische Proteine phosphoryliert (Siess et al., 1990). Ebenfalls spielt die Aktivierung von cGMP durch NO eine Rolle.

Im Jahre 1989 wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Walter in Würzburg ein Protein charakterisiert und untersucht, das durch Gabe von Vasodilatoren phosphoryliert wird und sowohl in physiologischer wie auch pathophysiologischer Sicht einen Einfluss auf die Thrombozyten ausübt (Halbrügge et al., 1989). Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist ein 46 kDa Protein menschlicher Thrombozyten, das unter dem Einfluss von Vasodilatoren wie Prostacyclin und NO in den phosphorylierten Zustand übergeht. Der Einfluss von VASP auf die Aggregation von Thrombozyten wurde hinlänglich belegt (Aszodi et al., 1999; Massberg et al., 2004; Eliautou et al., 2009). Auch als Forschungs-Werkzeug zum Nachweis von Phosphorylierungsvorgängen bei unterschiedlichsten Fragestellungen ist das Protein VASP mittlerweile etabliert.

Ob und wie ausgeprägt allerdings eine Rolle von VASP auch im Rahmen der initialen Aktivierung der Thrombozyten, dem *shape change*, besteht ist bisher nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher unter anderem Untersuchungen an Thrombozyten von VASP-Wildtyp- und VASP-*Knockout*-Mäusen durchgeführt.

Die Erforschung der genauen Aktivierungsvorgänge und Regelkreise der Thrombozyten ist und bleibt essentiell für die Entwicklung weitergehender Gedankenmodelle zum Verständnis der Atherosklerose und für Therapie-Konzepte wie beispielhaft die duale Thrombozytenhemmung nach perkutaner Koronarintervention und Implantation von beschichteten und unbeschichteten Koronar-Stents.

2 Stand der Forschung

2.1 Die Hämostase

Nach Verletzungen der Gefäßwand kommt es zu einer Thrombusbildung, die im Normalfall das Gefäßleck abdichtet aber den weiteren Blutfluss im Gefäß gewährleistet. Diesen Vorgang nennt man Hämostase. Dieser lässt sich nach dem zeitlichen Ablauf in primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse einteilen.

2.1.1 Die primäre Hämostase

Im Rahmen der primären Hämostase kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an einer Läsion der Gefäßwand. Dies führt zur Formveränderung, Ausbreitung und Aktivierung der adhärennten Thrombozyten mit nachfolgender Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung. Über den Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor (Glycoprotein Ib/V/IX) und den durch Kollagen immobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF) wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Zellwandläsion hergestellt (Ruggeri, 2003). Als nächster Schritt folgt die Stabilisierung über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren. Es kommt zu Formveränderungen, dem sogenannten *shape change* und gleichzeitig zur Aktivierung der Thrombozyten. Aus freigesetzter Arachidonsäure bilden die Thrombozyten Thromboxan A_2 , welches nach Abgabe in den Extrazellularraum über die Bindung an einen spezifischen Thromboxanrezeptor die Aktivierung verstärkt. Darüberhinaus hat Thromboxan einen vasokonstriktorisches Effekt und fördert so durch Verlangsamung des Blutflusses die Thrombusbildung. Granulainhaltsstoffe werden freigesetzt, die sowohl den Aktivierungsvorgang verstärken, als auch durch Stimulation mit ADP oder Thromboxan noch ruhende Thrombozyten aus der Zirkulation rekrutieren, aktivieren und zur Aggregation mit den bereits adhärennten Thrombozyten anregen. Die aktivierten Thrombozyten werden durch Fibrinogenbrücken über das Glykoprotein IIb-IIIa vernetzt. Diese ganzen Vorgänge sind unter anderem calciumabhängig und es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem

intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und dem Aktivierungsgrad der Thrombozyten (Gawaz, 1999).

2.1.2 Die sekundäre Hämostase

Das primäre Thrombozytenkonglomerat ist noch relativ instabil. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die Bildung von Thrombin und Fibrin in der Umgebung des Thrombus führt zur Festigung und Stabilisierung des initialen Thrombozytenthrombus. Dies ist die sekundäre Hämostase. Die aktivierte Thrombozytenoberfläche ist entscheidend an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt. Die Anlagerung von Fibrin an das bestehende Thrombozytenaggregat führt über Quervernetzungen zur Konsolidierung des Thrombus.

2.2 Die Gefäßwand

Der Aufbau der Arterienwand gleicht drei ineinander geschobenen Röhren. Die innerste Schicht, die Intima, lässt sich in das einschichtige Endothel, eine Basalmembran und das bindegewebige Subendothel unterteilen. Es folgt die Membrana elastica interna, die die Intima von der Media trennt. Die mittlere Schicht der Gefäßwand besitzt mehrere Lagen glatter Muskulatur und einen variablen Anteil elastischer oder kollagener Fasern. Die Membrana elastica externa trennt die Media von der außen gelegenen Adventitia. Diese besteht aus einem Verband fibroelastischer Fasern des Kollagen Typ I.

2.2.1 Das Endothel

Das Endothel, ein einschichtiges Plattenepithel, umfasst beim Menschen eine Fläche von etwa $600\text{-}700\text{m}^2$ bei einem Gewicht von ca. 1,5 kg (Vogel, 1999). Die Endothelzellen der Intima sind maßgeblich daran beteiligt, die Homöostase und Integrität der Gefäßwand aufrechtzuerhalten. Das Endothel bildet ausserdem eine biochemisch aktive Oberfläche, die sich für die Regulation mannigfacher Funktionen wie Gefäßreparatur, Gefäßtonus, Entzündungsreaktionen und immunologische

Prozesse verantwortlich zeigt. Zusätzlich wird der thrombogenetische Prozess kontrolliert, indem das Endothel sowohl die Plättchenaktivierung als auch Plättcheninhibition beeinflusst. Desweiteren kontrolliert es die Passage von Molekülen und weißen Blutzellen in das zirkulierende Blut hinein und aus ihm heraus und die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und Entzündungsreaktionen.

Das Endothel ist unter physiologischen Bedingungen eine anti-thrombogene Oberfläche, die die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten verhindert. Fibrinablagerungen und Thrombinbildung werden unterdrückt, die Bildung vasoaktiver Substanzen gefördert. Allerdings kann sich das Endothel unter der Einwirkung physikalischer und inflammatorischer Reize in eine proadhäsive und prokoagulatorische Oberfläche umwandeln.

2.3 Die Thrombozyten

2.3.1 Rolle innerhalb der Hämostase

Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Zytoplasma-Abschnürungen aus den Megakaryozyten. Der exakte Mechanismus der Plättchenbildung ist derzeit allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie sind im peripheren Blut die kleinsten korpuskulären Bestandteile mit einem Durchmesser von circa 2 μm . Ihre Konzentration liegt beim gesunden Menschen bei 150.000 bis 400.000 pro μl Blut (Gawaz, 1999).

Da sie im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Blutzellen keinen Zellkern aufweisen, werden die Thrombozyten als anukleäre Zellen bezeichnet. Ihre durchschnittliche Überlebenszeit im peripheren Blut beträgt 7-10 Tage, wobei ca. 70% ihres Bestandes im Blut zirkuliert und 30% in der Milz gespeichert ist. Anschliessend erfolgt der Abbau im retikuloendothelialen System der Leber und Milz. Im nicht-aktivierten Zustand besitzen Thrombozyten eine typische diskoide Gestalt mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 8 μm^2 . Lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin führen zu einer Aktivierung und zur Änderung der Form, dem sogenannten *shape change*. Nach ihrer Aktivierung kommt es zur Ausbildung von Plasmamembranausläufern, den so genannten Pseudopodien, welche bis zu 5 μm

lang sein können, und sie nehmen schliesslich eine sphärische Form an (White, 1994).

Die Blutplättchen sind an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt, von denen die Hämostase und Blutgerinnung die wichtigsten sind. Thrombozyten sind also einerseits für die Blutstillung und andererseits für die Einleitung der Gerinnung verantwortlich. Durch den Kontakt mit löslichen Agonisten (z.B. ADP, Thrombin, Kollagen, Fibrinogen, Thromboxan A_2), mit freiliegenden subendothelialen Strukturen (z.B. vWF, Kollagen, Fibronectin) oder dem dysfunktionellen Endothel (z.B. endothelialer vWF, GPIIb-IIIa, P-Selektin) werden die Thrombozyten aktiviert und dadurch die Adhäsion an die Gefäßwand möglich gemacht. Es erfolgen zahlreiche Interaktionen zwischen den Zellen und mit der Oberfläche und eine Rekrutierung weiterer Thrombozyten durch die Entleerung thrombozytärer Granula mit Ausschüttung weiterer Mediatoren. Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche spielen bei der Adhäsion eine zentrale Rolle. Dem Prozess der Thrombozytenaktivierung wirken endotheliale Faktoren entgegen. Dies sind im besonderen Maße vasodilatierende Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin, die antikoagulatorisch sowie antiadhäsiv wirken und die Dilatation des Gefäßes induzieren.

2.3.2 Morphologie der Thrombozyten

Die Ultrastruktur der Thrombozyten (siehe Abb. 2-1) zeigt einen komplexen Aufbau und kann morphologisch in 4 Bereiche unterteilt werden (Mackie et al., 1988; Gawaz, 1999; George, 2000).

- Periphere Zone
- Strukturelle Zone
- Zone der Organellen
- Membransystem

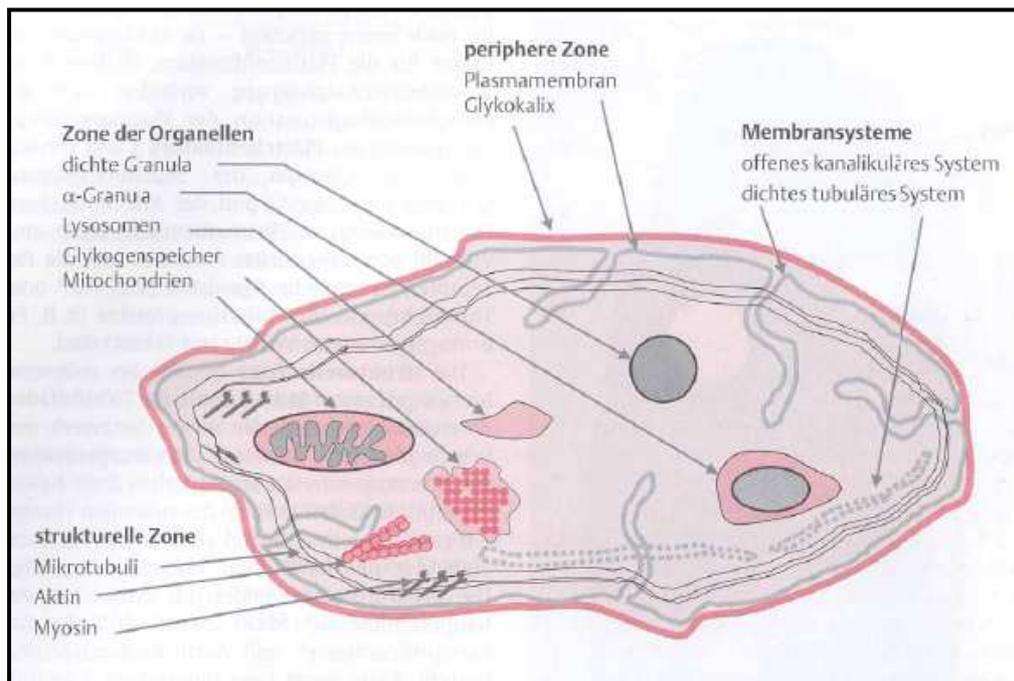


Abbildung 2-1: Aufbau und strukturelle Einteilung des Thrombozyten (Gawaz, 1999).

Die **periphere Zone** wird von der Zytoplasmamembran, aufgebaut aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden, gebildet. Diese sind kovalent mit den Membranproteinen verbunden und bilden die so genannte Glykokalix der Blutplättchen und sind in eine Phospholipiddoppelschicht eingebettet. An die Proteine und Lipide der Glykokalix sind N-Acetylneuraminsäurereste gebunden. Dadurch trägt die Glykokalix auf ihrer Oberfläche negative Ladungen. Dies führt zu einer elektrostatischen Abstoßung, die eine Adhäsion der Plättchen aneinander und an das an der Oberfläche ebenfalls negative Ladungen tragende Endothel unterbindet. In diese Zone sind die Membranproteine und Oberflächenrezeptoren integriert, welche für die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedenste Agonisten benötigt werden (White, 1994). Innerhalb der Plasmamembran sind die Phospholipide asymmetrisch verteilt. Neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin (Lecithin) und Phosphatidylethanolamin sind nach außen, negative Ladungen tragende Phospholipide wie Phosphatidylinositol und Sphingomyelin nach innen gerichtet. In die Plasmamembran der Blutplättchen ist eine grosse Anzahl von Proteinen eingebettet, die Rezeptoren sowohl für Agonisten als auch für Adhäsionsproteine

darstellen. Hierzu gehören die Rezeptoren für ADP, Thrombin, Fibrinogen und den vWF (Siess, 1989).

Die **strukturelle Zone** liegt unter der Plasmamembran, bildet das Zytoskelett und setzt sich aus Mikrotubuli, kurzen Aktinfilamenten und weiteren Strukturproteinen der Thrombozyten zusammen. Die Komponenten der strukturellen Zone halten die diskoide Form des ruhenden Thrombozyten aufrecht und sind aktiv an der Formveränderung der Thrombozyten nach ihrer Aktivierung beteiligt. Die Strukturproteine bilden das thrombozytäre Zytoskelett, welches hauptsächlich aus Aktin und Aktinbindeproteinen, sowie aus Myosin und Tubulin besteht. Nach Aktivierung und dem darauf folgenden Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} polymerisiert das Blutplättchen das lösliche monomere G-Aktin zu seiner Filament-Form. Eine Aktivierung der Thrombozyten führt zu der Bildung von Filamenten aus Aktin und Myosin (Siess, 1989; Gawaz, 2001).

Die **Zone der Organellen** im Zytoplasma beinhaltet vor allem Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei Formen an Speichergranula (dichte Granula, α -Granula und lysosomale Granula). Die Granula sind Proteinspeicher und speichern auch andere für die Plättchenfunktion essentielle Substanzen. Die dichten Granula enthalten niedermolekulare Verbindungen wie z. B. Ca^{2+} , ADP, ATP und Serotonin. Diese fördern vor allem den Aggregationsvorgang der Blutplättchen (Siess, 1989). Die am häufigsten vorhandenen α -Granula beinhalten verschiedenste Proteine wie Zytokine, Adhäsionsproteine und Wachstums- und Koagulationsfaktoren. Diese werden für die Adhäsion, Aggregation und Chemotaxis der Plättchen aber auch bei Entzündungsprozessen, der Wundheilung sowie für die Gerinnung benötigt (Gawaz, 2001).

Das **Membransystem** der Thrombozyten besteht aus dem mit der Plasmamembran in Verbindung stehenden offenen kanalikulären System ("*surface-connected open canalicular system*") und dem dichten tubulären System ("*dense tubular system*"), einem Abkömmling des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten und dem Hauptspeicherort für freie Kalziumionen. Freie Kalziumionen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der

Plättchenaktivierung. Übersteigt die freie zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration einen bestimmten Wert, kommt es zur Formveränderung der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien und Degranulation. Das offene kanalikuläre System, welches ein weit in das Blutplättchen hineinreichendes und mit der Plasmamembran verbundenes Kanalsystem darstellt, dient vor allem der Vergrößerung der Membranoberfläche nach der Aktivierung sowie der thrombozytären Sekretion und Endozytose (George, 2000).

Im ruhenden Zustand weisen die Blutplättchen eine charakteristisch diskoide Form mit einer durchschnittlichen Oberfläche von $8 \mu\text{m}^2$ auf. Nach Aktivierung führen sie einen Gestaltwandel durch und ändern ihre typisch diskoide Form. Sie bilden hierbei durch Ausstülpungen der Zytoplasmamembran kurze Pseudopodien und lange Filopodien aus. Dadurch kann sich ihre Oberfläche von ursprünglich $8 \mu\text{m}^2$ auf bis zu $13 \mu\text{m}^2$ vergrößern (Gawaz, 1999).

2.3.3 Adhäsion

Nach traumatischer Verletzung gesunder Blutgefäße und der schützenden Endothelzellschicht wird die Adhäsion der Thrombozyten hauptsächlich durch subendotheliale extrazelluläre Matrixstrukturen wie z.B. verschiedene Kollagentypen, vWF, Laminin, Fibronectin und Thrombospondin induziert (Ruggeri, 2002; Samara et al., 2003). Der vWF, in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert, wird freigelegt und bewirkt das Abfangen, Rollen und schliesslich die Adhäsion zirkulierender Blutplättchen. Hierbei sind v.a. Matrixkomponenten wie die Kollagen-Typen I, III und VI wichtig, an die vWF bindet (Ruggeri, 2002).

Zwei Membranglykoproteine, nämlich das Integrin- $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) und das Glykoprotein VI, interagieren mit exponiertem Kollagen. Sowohl $\alpha_2\beta_1$ als auch Glykoprotein VI vermitteln Adhäsion sowie intrazelluläre Signale zur Aktivierung der Thrombozyten. Anschliessend kommt es zur stabilen Adhäsion und Ausbreitung der Thrombozyten (Siess, 1989; Clemetson et al., 2001; Massberg et al., 2002). Die Kollagenrezeptoren stimulieren die Tyrosinkinase Syk, welche eine Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma_2$ durch Phosphorylierung hervorruft. Dadurch wird über die Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat („*second messenger*“) der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel erhöht. Die Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen wird kritisch durch

das *platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM 1; CD 31) gegenreguliert. Bei Scherkräften über 1000/sec beruht die initiale Thrombozytenadhäsion entscheidend auf der Interaktion zwischen Glykoprotein Ib (vWF-Rezeptor) und kollagengebundenem vWF (Savage et al., 1996; Savage et al., 1998; Ruggeri, 2002). Neben mehreren Kollagentypen und dem vWF sind Fibronektin, Laminin und Thrombospondin weitere Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix (Balbona et al., 1992). Inwieweit diese Matrixkomponenten für die Blutplättchenaktivierung im Rahmen der Hämostase oder Thrombose relevant sind ist allerdings derzeit noch nicht geklärt (Ruggeri, 2002; Samara et al., 2003).

2.3.4 Formwandel

Der initiale Formwandel der Thrombozyten, der *shape change*, ein Formwandel vom diskoiden zum sphärischen Thrombozyten mit Pseudopodienbildung, welcher auf einer Aktinpolymerisation mit Neuorganisation des Zytoskeletts beruht, läuft direkt nach der Thrombozytenaktivierung durch verschiedenste Agonisten ab (vgl. Abb. 2-2 und 2-3). Hierfür ist eine Umgestaltung der strukturellen Zone mit Vermehrung der Mikrotubuli in den Pseudopodien notwendig. Er dient vor allem der Vergrößerung der Membranoberfläche, Zentralisierung der Granula und Ausbreitung der Thrombozyten auf der subendothelialen Matrix (Gawaz, 1999). Es kommt zur Ausbildung langer Aktinfilamente in den Pseudopodien und Bildung eines kontraktiven Aktin-Myosin-Ringes. Eingeleitet wird der *shape change* unter anderem durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, einer Gruppe der heterotrimeren G-Proteine, die aus drei Untereinheiten, α , β und γ , aufgebaut sind. Dies gilt beispielhaft für Thrombin, welches auf der Oberfläche von Thrombozyten gebildet wird (Essler et al., 1998). Dies gilt ebenfalls für aus den dichten Granula aktivierter Plättchen freigesetztem ADP (Gachet et al., 2000), Thromboxan A_2 , *platelet activating factor* (PAF) und Lysophosphatidsäure (ebenfalls von stimulierten Thrombozyten sezerniert) (Siess, 1989).

Durch Thrombozytenstimuli wird die Aktivierung über Membranrezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine (G_i , G_q und $G_{12/13}$) gekoppelt sind, ausgelöst (Offermanns, 2000). Vier Subklassen der G-Proteine werden unterschieden. G_s und G_i stimulieren bzw. inhibieren die Aktivität der Adenylatzyklase und regulieren dadurch den Spiegel an cAMP und die Aktivität der Proteinkinase A. Bei erhöhten cAMP- Spiegeln zeigen

die Thrombozyten eine reduzierte Aktivierbarkeit. Rezeptoren, wie z.B. Thrombinrezeptoren oder der ADP-Rezeptor P_2Y_{12} , inhibieren über G_i -Aktivierung die Aktivität der Adenylatzyklase und verringern so die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Yang et al., 2002). Dies trägt zur Aktivierung der Plättchen nach Thrombin- oder ADP-Stimulation bei (Offermanns, 2006; Wilhelm et al., 1993; Haserück et al., 2004; Gachet, 2006).

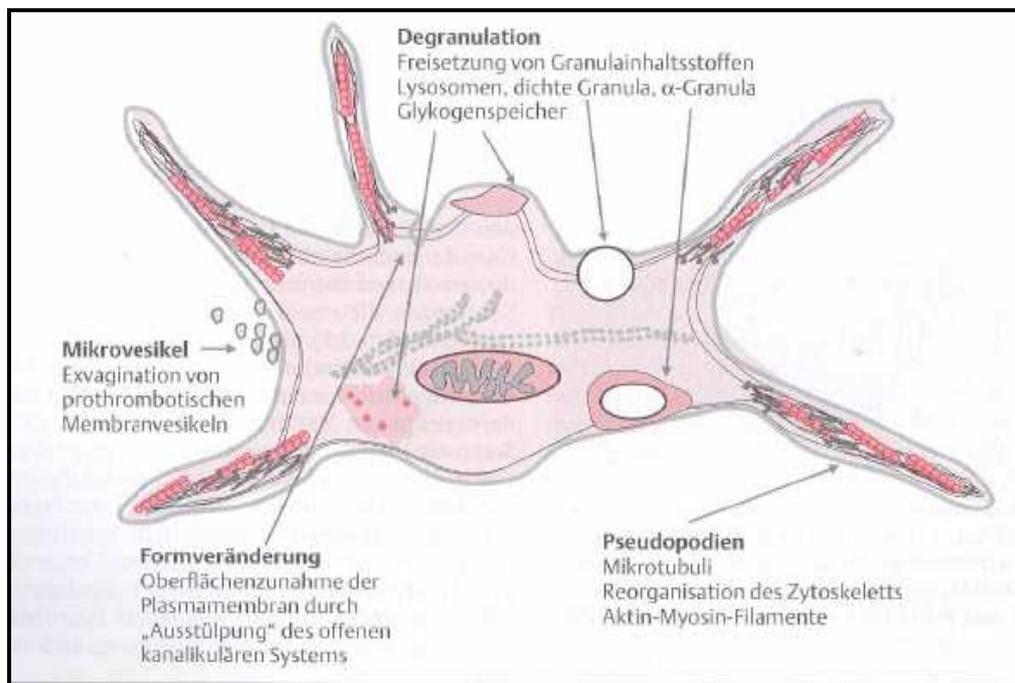


Abbildung 2-2: Aktivierter Thrombozyt mit Pseudopodienbildung (Gawaz, 1999).

Die thrombinsensitiven Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -4 (PAR-1 und PAR-4), sowie der ADP-Rezeptor P_2Y_1 und Thromboxanrezeptoren sind G_q gekoppelt (Kunapuli et al., 2003; Offermanns, 2006; Gachet, 2006). Die Phospholipase C_β wird durch G_q stimuliert und induziert die Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat und in Folge davon ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und auch die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette (Offermanns et al., 1997). Dadurch wird ein Gestaltwandel der Thrombozyten ausgelöst (Offermanns, 2006; Bauer et al., 2001; Essler et al., 1999).

Der Ca^{2+} -Anstieg aktiviert die Phospholipase A_2 , die die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden katalysiert. Die Arachidonsäure ist das Substrat der Zykllooxygenase 1, die Thromboxan A_2 bildet. Thromboxan A_2

bewirkt auto- und parakrine Wirkungen, verstärkt die Plättchenaktivierung und stimuliert die Sekretion von Granulainhaltsstoffen. In der vorliegenden Arbeit wird das Endoperoxidanalogen U46619 als Stimulus des Thromboxanrezeptors benutzt. Thromboxan A_2 unterstützt die Thrombozytenaktivierung aber nicht nur über eine reine G_q -Aktivierung sondern auch über G_{13} (Moers et al., 2003).

Die vierte Subklasse der G-Proteine, $G_{12/13}$, interagiert unter anderem mit kleinen GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie (Gratacap et al., 2001; Retzer et al., 2000; Klages et al., 1999). Diese sind bei vielen Zellen an der Signaltransduktion von Reorganisationsprozessen des Zytoskeletts beteiligt (Offermanns, 2006). Dadurch kann über eine komplexe Aktivierung von Rho und Rho-Kinase die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase initiiert werden. Dies ermöglicht dann, nach Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette, deren Interaktion mit Aktinfilamenten. Dieser Signalweg ist unabhängig von Ca^{2+} und bewirkt Veränderungen des Aktinzytoskeletts, der Grundlage des *shape change* (Offermanns, 2000; Offermanns, 2006; Bauer et al., 1999).

Die Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung kann jedoch auch durch einen anderen Weg, nämlich durch Erhöhungen des zytosolischen Ca^{2+} hervorgerufen werden. Die Adenylatzyklase und die Phospholipase C sind wesentlich an der Regulation des zytosolischen Ca^{2+} beteiligt. Die Phospholipase C_β versetzt Agonisten in die Lage direkt $G\alpha_q$ zu stimulieren (Siess et al., 1989; Siess et al., 2004; Offermanns, 2006).

Der *shape change* kann auch durch Aktivierung von Glykoproteinrezeptoren, wie GPVI und Integrin- $\alpha_2\beta_1$ ausgelöst werden (Penz et al., 2005). Konsequenz der Plättchenaktivierung ist eine Veränderung der Anordnung von Membranphospholipiden und damit der prokoagulatorischen Aktivität. Dadurch wird eine Oberflächenexposition anionischer Phospholipide, welche verschiedene Enzyme und Kofaktoren der Gerinnungskaskade (Faktoren Va, VIIIa, IXa und Xa) beinhalten, hervorgerufen (Heemskerk et al., 2002).

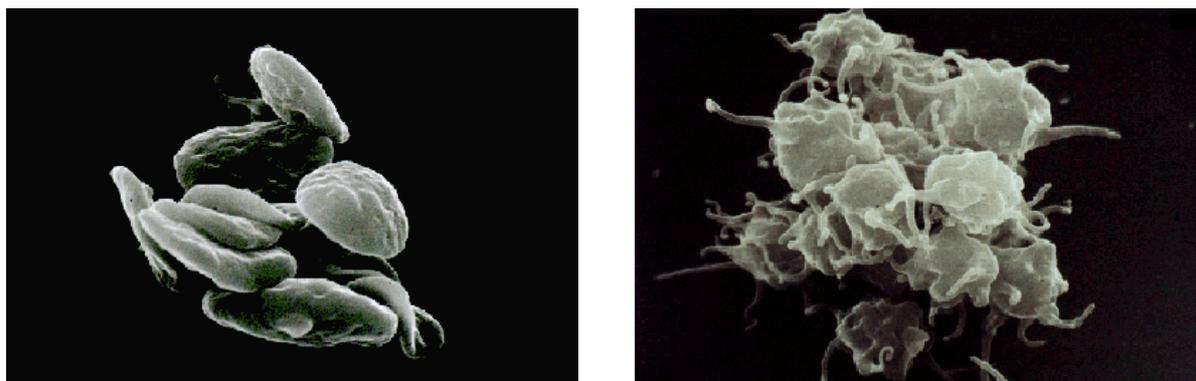


Abbildung 2-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten.

Links diskoidale Thrombozyten im Ruhezustand, rechts formveränderte, aktivierte Thrombozyten mit Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien).

(Quelle: www.akh-wien.ac.at).

2.3.5 Aggregation

Die Aggregation bezeichnet den Vorgang der Zusammenlagerung von mehreren Blutplättchen. Sie stellt einen Prozess dar, welcher innerhalb sehr kurzer Zeit nach Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten zur Bildung eines Plättenthrombus führt (Gawaz, 1999). Dabei kommt dem Glykoprotein IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)-Komplex nach dessen durch „*inside-out signaling*“ vermittelter Aktivierung eine zentrale Bedeutung zu (Ruggeri, 2002; Woodside et al., 2001). Durch Aktivierung des Thrombozyten kommt es im Bereich des GPIIb-IIIa zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen. Dies ist sowohl die Voraussetzung für die stabile Adhäsion der Plättchen an die exponierte subendotheliale Matrix, als auch die Voraussetzung für die Thrombozytenaggregation.

Neben Fibrinogen bindet das aktivierte GP IIb-IIIa bei diesen Vorgängen auch noch andere im Plasma vorhandene Adhäsionsmoleküle, wie vWF und Fibronectin, und kann dadurch weitere Thrombozyten rekrutieren (Ruggeri, 2002; Jang et al., 2002).

Die initiale Interaktion von Fibrinogen ist ein reversibler Vorgang. Nach der Freisetzung thrombozytärer Granula-Inhaltsstoffe resultiert jedoch eine irreversible Bindung des Fibrinogen an GP IIb-IIIa, was der sekundären Aggregationsphase entspricht (Gawaz, 1999; Ruggeri, 2002).

2.4 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Die Mechanismen während der Hämostase und Gerinnung setzen ein enges und geordnetes Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, Strukturen der Gefäßwand und plasmatischen Gerinnungsfaktoren voraus. Die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel wird über spezifische Rezeptoren reguliert.

Thrombozyten haben membranständige Glykoproteine für die Interaktion der Plättchen untereinander (z.B. GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (z.B. Kollagenrezeptoren), mit Endothelzellen sowie mit Leukozyten (z.B. P-Selektin) (Gawaz, 2001). Durch ihre molekulare Struktur werden diese Adhäsionsrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt (Gawaz, 1999).

2.4.1 Integrine

Thrombozyten, Leukozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen exprimieren Integrine, die an Prozessen der Zelldifferenzierung, Zelladhäsion, Migration und Proliferation beteiligt sind (Shattil et al., 1998). Die heterodimere Struktur besteht aus einer α - und einer nicht kovalent gebundenen β -Untereinheit. Zusammen bilden sie einen funktionellen Rezeptor. Integrine stehen mit verschiedenen Glykoproteinen (z.B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin) in Verbindung. Agonisten bewirken eine intrazelluläre Signalübertragung, die über zytoplasmatische Anteile des Rezeptors zu einer Aktivierung der Integrine führt („*inside-out signaling*“). Die Bindung von z.B. Fibrinogen bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung des Integrin-Rezeptors mit folgender Aktivierung intrazellulärer Signale („*outside-in signaling*“). So kann der integrinvermittelte Adhäsionsvorgang mit Mechanismen der Zellaktivierung kommunizieren (Phillips et al., 1988; Shattil et al., 1997, Shattil et al., 1998).

Fünf Integrine der Thrombozyten wurden beschrieben. GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin), auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet, wird ausschließlich von Thrombozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Phillips et al., 1988). Es gehört zu den β_3 -Integrinen und ist ein Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran. Es ist das häufigste Membranglykoprotein des Thrombozyten. Die Aufgabe des Fibrinogenrezeptors ist die Bindung von Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche

und ist daher der erste Schritt der Plättchenaggregation. Ist der GPIIb-IIIa-Rezeptor an der Oberfläche des Thrombozyten in einem Ruhezustand, so ist der Thrombozyt in einem nicht aktiven Zustand. Wird der Thrombozyt aktiviert, so kommt es zu einer raschen Konformationsänderung des Rezeptors mit Übergang in einen aktivierten Funktionszustand. Der aktivierte Rezeptor kann dann auch lösliches Fibrinogen aus dem Plasma an den Thrombozyten binden (Marguerie et al., 1994; Plow et al., 1992; Shattil et al., 1998; Nieswandt et al., 2002).

Weitere Integrinrezeptoren sind der Vitronektinrezeptor (GP $\alpha_v\beta_3$ -Integrin) und die Familie der β_1 -Integrine. Blutplättchen besitzen drei Integrine der β_1 -Klasse, den Kollagenrezeptor ($\alpha_2\beta_1$ -Integrin), Fibronektinrezeptor ($\alpha_5\beta_1$ -Integrin) und Lamininrezeptor ($\alpha_6\beta_1$ -Integrin). Sie sind an der primären Adhäsion und Aktivierung der Blutplättchen beteiligt. Ihre Bedeutung ist derzeit noch unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Nieswandt et al., 2001; Nieuwenhuis et al., 1985).

2.4.2 Leucinreiche Glykoproteine

Zu ihnen gehören das GP Ib-V-IX, welches den vWF, P-Selektin und Thrombin bindet, und das GP IV (Gawaz, 2001). Sie zeichnen sich durch ihren Reichtum an der Aminosäure Leuzin aus. Der GPIb-V-IX-Komplex bildet den Rezeptor für den vWF und vermittelt die Adhäsion frei zirkulierender Thrombozyten an Kollagen (Clemetson et al., 2001). Der GP Ib-V-IX-Komplex spielt bei hohen Scherkräften, wie zum Beispiel in arteriellen Strömungsbereichen, eine wichtige Rolle. Aufgrund einer hoch-affinen Bindung an immobilisierten vWF vermögen Thrombozyten einen initialen Kontakt mit der verletzten Gefäßwand herzustellen und zu adhären (Savage, 1998). Dieser via GP Ib-V-IX initiierte Kontakt ist jedoch keine feste, sondern nur eine transiente Verbindung mit der subendothelialen Matrix.

2.4.3 Selektine

Bisher sind drei Selektine in der Literatur beschrieben. Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die heterotypische Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Auf aktivierten Endothelzellen findet man E-Selektin, welches die Granulozytenadhäsion vermittelt. L-Selektin ist auf der Leukozytenoberfläche lokalisiert und ist beteiligt an

der Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel. P-Selektin ist in Plättchen als auch in Endothelzellen zu finden. Bei Thrombozyten ist es in den α -Granula und im Endothel in den Weibel-Palade- Körperchen gespeichert.

Im Ruhezustand der Zelle befindet sich dieser Rezeptor nicht an der Zelloberfläche. Im Rahmen einer Aktivierung kommt es jedoch zur schnellen Freisetzung. Zusätzlich bewirkt P-Selektin auf Thrombozyten und Endothel die Adhäsion von Leukozyten an geschädigtes Endothel und ruft im Leukozyten inflammatorische Reaktionen hervor (Gawaz, 2001).

2.4.4 Rezeptoren vom Immunglobulintyp

Bekannt sind drei Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp bei Thrombozyten. Die Bedeutung des „*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*“ (PECAM-1) und des „*intracellular adhesion molecule- 2*“ (ICAM-2) ist weitgehend ungeklärt. PECAM-1 wirkt bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel mit und beteiligt sich an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten. ICAM-2 ist auf aktivierten Thrombozyten zu finden und trägt ebenfalls zur Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion bei (Gawaz, 1999).

Auch das GPVI gehört zu der Gruppe der Immunglobuline und ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor (Nieswandt, Brakebusch et al., 2001). Der Rezeptorkomplex fungiert als thrombozytärer Kollagenrezeptor, der möglicherweise eine zentralere Rolle als das Integrin $\alpha_2\beta_1$ einnimmt (Massberg et al., 2003).

2.5 Hemmung der Thrombozytenaktivierung

Der Anstieg von intrazellulärem cAMP und cGMP ist der effektivste endogene Mechanismus zur Hemmung der Blutplättchen. Der Spiegel an zyklischen Nukleotiden wird reguliert durch die Adenylatzyklase bzw. die Guanylatzyklase. Ein Abbau erfolgt durch Phosphodiesterasen.

Die zyklischen Nukleotide aktivieren die cAMP- und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK, cGK). Diese nehmen durch Phosphorylierung von spezifischen Proteinen unmittelbar Einfluss auf das Geschehen in den Thrombozyten (siehe Abb. 2-4 und 2-5).

2.5.1 Regulation der Adenylatzyklase- und der Guanylatzyklase-Aktivität

Die Adenylatzyklase-Einheit ist aus Rezeptoren, heterotrimeren G-Proteinen und Adenylatzyklasen aufgebaut. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor aktiviert über ein G_s -Protein eine auf der Innenseite der Zellmembran lokalisierte katalytische Einheit der Adenylatzyklase mit Aufspaltung in eine α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Komplex. Adenylatzyklasen sind integrale Membranglykoproteine, die die Synthese von cAMP aus ATP katalysieren. Dies bedingt einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Adenylatzyklase der Thrombozyten wird durch die α -Untereinheit des stimulierenden G-Proteins ($G\alpha_s$) aktiviert und inhibiert durch die α -Untereinheit des Pertussistoxin-sensitiven inhibitorischen G-Proteins ($G\alpha_i$) (Offermanns, 2000; Offermanns, 2003; Jantzen et al., 2001). Die Bindung von Prostaglandinen (PGI_2 , PGE_1 , PGE_2) an seine spezifischen Rezeptoren, die an G_s gekoppelt sind, führt daher zu einer Stimulierung der cAMP-Bildung. Einige Aktivatoren der Thrombozyten, wie z.B. Thrombin, Epinephrin oder ADP, induzieren die Aktivierung von $G\alpha_i$ und können damit den cAMP-Spiegel herunterregulieren. Dies passt zu den thrombozytenaktivierenden Eigenschaften dieser Agonisten. Ein Absinken des cAMP-Spiegels in Thrombozyten scheint jedoch nicht allein ausschlaggebend für die Aggregation zu sein (Siess et al., 1990).

Für die komplette Aggregation ist die Aktivierung des G_q - als auch des G_i -gekoppelten Rezeptors erforderlich (Jin and Kunapuli, 1998). Wird nur einer dieser Wege gehemmt, so wird auch die Thrombozytenaggregation unterdrückt. Dies wird bei Thrombozyteninhibitoren wie z.B. Clopidogrel (Plavix®) ausgenutzt. Es bindet an den G_i -gekoppelten ADP-Rezeptor (P_2Y_{12}) und verhindert so die ADP vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase (Geiger et al., 1998; Geiger et al., 1999).

Die Guanylatzyklase existiert in löslicher und in membrangebundener Form. Thrombozyten enthalten nur die sich im Zytoplasma befindliche lösliche Form. Die lösliche Guanylatzyklase enthält Häm als prosthetische Gruppe und wird aktiviert durch das aus dem Endothel sezernierte Stickstoffmonoxid (= „*endothelium derived relaxing factor*“, EDRF), Nitrovasodilatoren oder anderen NO-bildenden und – freisetzenden Substanzen (Ignarro, 1989; Geiger et al., 2001; Schäfer et al., 2004; vgl. Abb. 2-4 und 2-5). Die Wirkung besteht aus einer Thrombozytenhemmung als auch Vasodilatation über eine Relaxation der glatten Muskelzellen. Durch das

aktivierte Enzym wird GTP in cGMP umgewandelt, was zu einer Aktivierung der cGK und damit zur Phosphorylierung spezifischer Zielproteine in Thrombozyten und in anderen Geweben führt (Nolte et al., 1994). In Thrombozyten liegt nur die cGK-I vor (Massberg et al., 1999). Durch Experimente an Thrombozyten von cGK-I-defizienten Mäusen konnte dessen anti-aggregatorische Funktion bewiesen werden (Massberg et al., 1999; Wettschurek et al., 2004).

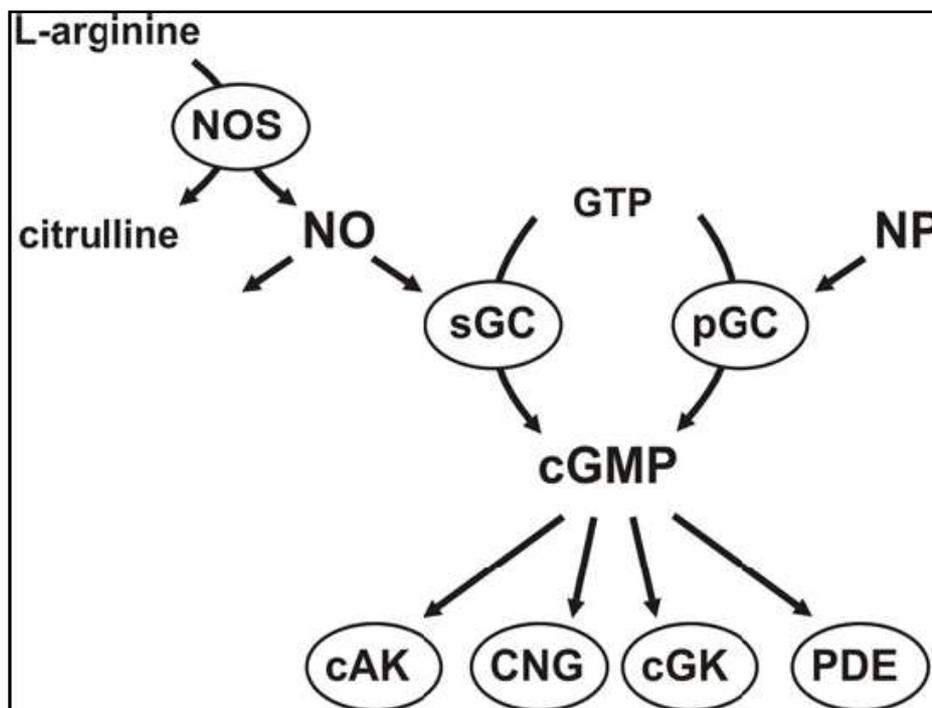


Abbildung 2-4: Synthese und Signalweg von cGMP.

Stickstoffmonoxid (NO) wird von L-Arginin durch die NO-Synthase produziert. NO aktiviert die lösliche Guanylyl-Zyklase zur Umwandlung von GMP aus GTP. Abhängige Effektoren von cGMP sind cAK, cGK, Kationenkanäle und die Phosphodiesterasen (Lukowski, 2006).

2.5.2 cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die Bedeutung der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen für die Hemmung der Plättchenaktivierung und -aggregation ist belegt (Offermanns, 2000; Offermanns, 2006). Die Aktivität von Proteinkinasen ist vom Spiegel zyklischer Nukleotide abhängig und stellt eine der Haupteffektormoleküle in der Vermittlung

physiologischer Effekte dar. Im Vergleich mit anderen Geweben und Zelltypen enthalten Thrombozyten eine hohe Konzentration sowohl an cAMP-abhängiger Proteinkinase (cAK) als auch an cGMP-abhängiger Proteinkinase (cGK) (Waldmann et al., 1986; El-Daher et al., 1996; Hofmann et al., 2005, vgl. Abb. 2-5). Die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen werden durch ein komplexes Netzwerk humoraler Faktoren moduliert (Smolenski et al., 2000; Münzel et al., 2003). Stickstoffmonoxid und das NO/cGMP/cGMP-Proteinkinase I-System als ein Inhibitor der Thrombozyten sind dabei sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen von außerordentlicher Bedeutung (Menshikov et al., 1993; Schlossmann et al., 2000; Gambaryan et al., 2004; Li et al., 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten drei Klassen von cGMP-Rezeptorproteinen klassifiziert werden.

Ebenfalls gelang es, durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationenkanäle, cGMP regulierte Phosphodiesterasen und die cGK zu identifizieren. In Thrombozyten liegt vor allem die im Zytoplasma lokalisierte Form Proteinkinase G I in hohen Konzentrationen vor (Keilbach et al., 1992; Pfeifer et al., 1999; Pfeifer et al., 1998). Durch die Bindung von cGMP wird eine Konformationsänderung hervorgerufen (Wall et al., 2003), die die Hemmung der Kinase durch den N-Terminus aufhebt und eine Phosphorylierung der Substratproteine erlaubt. Die Aktivierung der cAK bzw. der cGK führt, wie bereits angesprochen, zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen, die entweder das Ziel beider Kinasen darstellen oder separat reguliert werden (Schwarz et al., 2001).

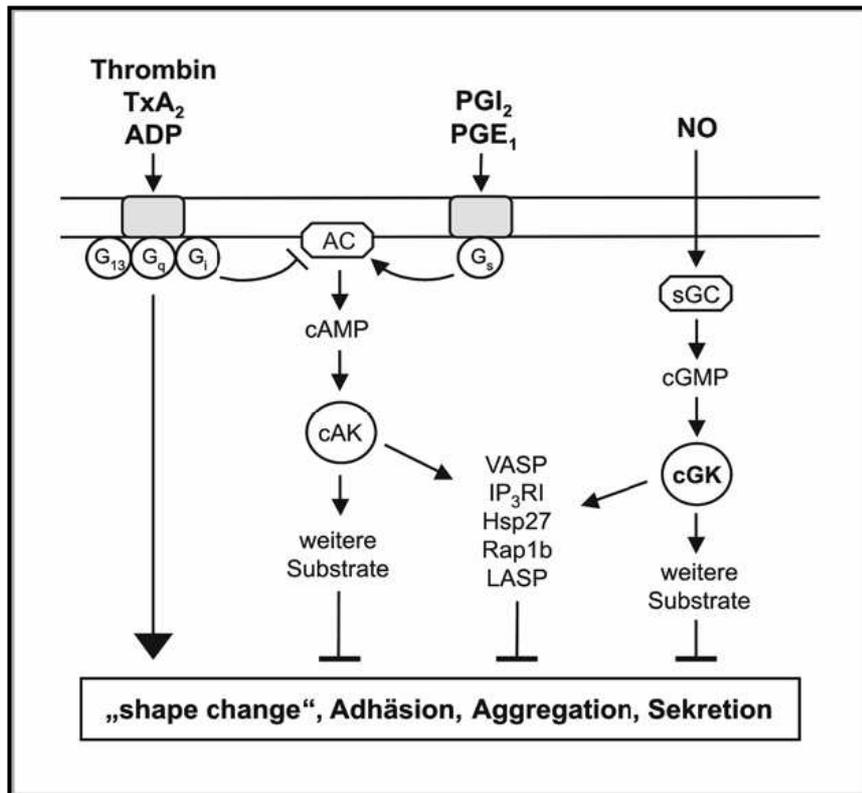


Abbildung 2-5: Darstellung der Regulation der Thrombozytenaktivität.

Antagonisten: NO, PGI₂, PGE₁; GTP-bindende Proteine (G₁₃, G_q, G_i, G_s), cAMP/cGMP, Adenylyl-/ Guanylylzyklase (AC/sGC), cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase (cAK/cGK), VASP, IP₃-Rezeptor Typ I (IP₃RI), Hitzeschockprotein 27 (Hsp27), kleines GTP-bindendes Protein Rap1b (Rap1b). Agonisten: Thrombin, Thromboxan A₂ (TxA₂), Adenosindiphosphat (ADP). Weiterführende Erklärungen siehe Text (nach Schwarz et al., 2001).

2.5.3 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) sind eine Gruppe von Enzymen, die den 3'-Phosphoester, der an cAMP bzw. cGMP gebunden ist hydrolysieren und die zyklischen Nukleotide in ihre inaktiven 5'-Metabolite verwandeln (Haslam et al., 1999). Hemmstoffe der Phosphodiesterasen regulieren die cAMP- und cGMP-Spiegel der Thrombozyten über einen verminderten Abbau der zyklischen Nukleotide (Manns et al., 2002; Mullershausen et al., 2003). Eine hohe Konzentration von PDE 5 in Thrombozyten und auch in glatten Muskelzellen der Gefäße führte zur Entwicklung einiger selektiver Substanzen (Haslam et al., 1999).

2.6 Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP)

2.6.1 Überblick

Im Rahmen der Untersuchung des Phosphorylierungsmusters von humanen Thrombozyten, die mit Substanzen behandelt wurden, die die intrazelluläre cAMP- bzw. cGMP-Konzentration erhöhen, identifizierten Halbrügge und Walter 1989 (Halbrügge and Walter, 1989; Nolte et al., 1991) ein Protein mit einer apparenten Molekularmasse von 46/50 kDa, das sowohl durch die cAK als auch die cGK phosphoryliert wird (Smolenski et al., 1998). Das Protein wurde „VASP“ nach „Vasodilatator Stimuliertes Phosphoprotein“ (engl. *vasodilator stimulated phosphoprotein*) genannt. VASP wurde charakterisiert als wichtiges Substrat für die cAK als auch die cGK I in menschlichen Thrombozyten (Waldmann et al., 1987). VASP wurde initial aus menschlichen Thrombozyten isoliert, wird aber auch in einer Vielzahl anderer Zellen und Geweben exprimiert. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen eine einheitliche, dreigeteilte Domänenstruktur (siehe Abb. 2-6). Sie besteht aus einer N-terminalen Ena-VASP Homologie 1 (EVH 1)-Domäne und einer C-terminalen EVH 2-Domäne. Diese sind durch eine Prolin-reiche Region (PRR) voneinander getrennt (Gertler et al., 1996; Haffner et al., 1995; Krause et al., 2002). Über die EVH 1-Domäne bindet VASP Prolin-reiche Liganden wie die fokalen Kontakt-Proteine Vinculin (Reinhard et al., 1996) und Zyxin (Reinhard, Jouvenal et al., 1995), das Listerien Oberflächenprotein ActA (Niebuhr et al., 1997) und das Adaptorprotein Fyb/Slap (Krause et al., 2000). Die Prolin-reichen Regionen von VASP interagieren mit SH3-Domänen sowie mit dem G-Aktin bindenden Protein Profilin (Reinhard, Giehl et al., 1995). Die EVH 2-Domäne vermittelt die Bindung sowohl an G- als auch an F-Aktin (Bachmann et al., 1999; Walders-Harbeck et al., 2002). Die Abb. 2-6 zeigt den schematischen Aufbau von humanem VASP und dessen Bindungspartnern.

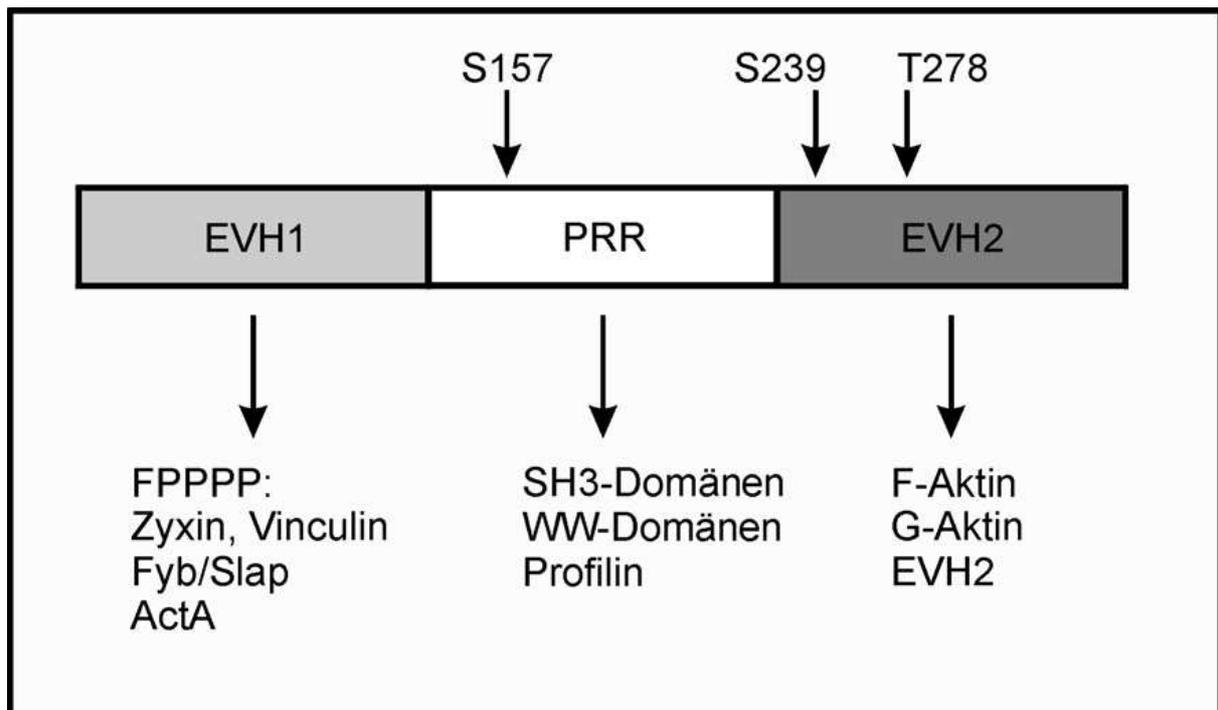


Abbildung 2-6: Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP) des Menschen.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur des ca. 380 Aminosäuren großen humanen VASP mit dessen Bindungspartnern. Die Phosphorylierungsstellen der cAK und cGK sind mit Pfeilen markiert (Serin 157, Serin 239 und Threonin 278). Die N-terminale EVH 1-Domäne vermittelt die Bindung an Prolin-reiche Liganden, die das Sequenzmotiv FPPPP enthalten, wie z.B. Vinculin, Zyxin, ActA und Fyb/Slap. Die mittlere Prolinreiche Region interagiert mit Profilin sowie SH3- und WW-Domänen. Die C-terminale EVH 2-Domäne bindet an G- und F-Aktin und ist für die Tetramerisierung verantwortlich, wodurch Interaktionen mit VASP-Bindungspartnern stabilisiert werden (nach Harbeck et al., 2000).

VASP gehört zu einer Familie, die auch als Ena/VASP-Proteinfamilie bezeichnet wird (Haffner et al., 1995; Gertler et al., 1996; Zimmer et al., 1996). Sie umfasst neben VASP das Drosophila Enabled Protein (Ena) (Gertler et al., 1995), ein Substrat der Abelson Thyrosinkinase (Abl), das Ena-homologe Protein der Säugetiere Mena (m = mammalian) und das Protein mit Ähnlichkeit zu Ena-VASP Evl (Ena-VASP-like protein) (Gertler et al., 1995).

Ena/VASP-Proteine sind Bestandteile der Zellmatrix und des Aktinzytoskeletts. In Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten steht VASP vor allem im Zusammenhang mit fokaler Adhäsion, elastischen Fasern, Zellkontakten und hochdynamischen Regionen der Plasmamembran (Reinhard et al., 1992; Walter et al., 1995; Reinhard et al., 2001). VASP bindet direkt an Profilin, Zyxin und an das

Protein Vinculin, das bei der Adhäsion und dem Kontakt der Zellen untereinander von Bedeutung ist (Kwiatkowski et al., 2003).

Sowohl VASP als auch Profilin sind an der Spitze der Lamellipodien konzentriert lokalisiert (Kwiatkowski et al., 2003; Rottner et al., 1999). Dort bewirkt VASP eine Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen. Eine Hypothese lautet, dass VASP-Proteine die Aktivität von *capping*-Proteinen einschränken können. VASP bindet hierbei an die Enden von freien Aktin-Filamenten und ermöglicht so eine fortlaufende Anbindung von Monomeren während es die Fähigkeit der capping-Proteine zur Unterbrechung dieser Filamentverlängerung blockiert. Die Phosphorylierung von VASP bewirkt schliesslich eine reduzierte Bindungsfähigkeit von VASP an F-Aktin und damit eine hemmende Funktion (Harbeck et al., 2002).

In vitro besitzt VASP nur geringe Aktin-Nukleations- und -Polymerisations-Aktivität, die durch die Zugabe des Aktin-bindenden Proteins Profilin erhöht wird (Walders-Harbeck et al., 2002; Castellano et al., 2001; Galler et al., 2006; Blume et al., 2007). Es spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytoskelettalen Organisation und Zellmobilität (Reinhard, Jouvenal et al., 1995; Niebuhr et al., 1997; Dramsi and Cossart, 1998).

Durch die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts werden zelluläre Vorgänge wie die Thrombozyten-Aktivierung, Zell-Zell-Adhäsion, Änderung der Zellform sowie Motilität und Zellteilung reguliert. Hierfür sind eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen notwendig (Machesky, 2002; Pollard and Borisy, 2003; Vasioukhin and Fuchs, 2001). Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie sind neben dem Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) und dem Arp 2/3 Komplex ein relevanter Faktor für das räumlich und zeitlich kontrollierte Remodelling der Mikrofilamente (Bear et al., 2001). Die Ena/VASP-Proteine scheinen auch bei den Signaltransduktionswegen der kleinen GTPasen der Rho-Familie beteiligt zu sein (Garcia Arguinzonis et al., 2002; Grosse et al., 2003; Krugmann et al., 2001; Chitaley et al., 2004). Die Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 regulieren die Bildung von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Das adäquate Zusammenspiel dieser GTPasen ist ebenfalls unerlässlich für die korrekte Reorganisation des Zytoskeletts. Zusammenfassend können die Ena/VASP-Proteine über ihren Einfluss auf die Aktin-Polymerisation und Reorganisation wichtige zelluläre Eigenschaften regulieren (Renfranz and Beckerle, 2002).

2.6.2 Die Rolle von VASP bei der Thrombozytenaktivierung

In Thrombozyten ist VASP, wie oben bereits dargestellt, an der Schnittstelle zweier hauptsächlich inhibitorisch wirkender Signalwege lokalisiert. Die VASP-Phosphorylierung als Antwort auf cGMP erhöhende Substanzen (z.B. Nitrovasodilatoren), cAMP erhöhende Substanzen (PGE₁, PGI₂) und selektive membrangängige Aktivatoren der cGK und der cAK, korreliert eng mit einer Thrombozyteninhibierung und im Besonderen mit der Hemmung der Fibrinogenbindung an das humane Thrombozytenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Halbrügge et al., 1990; Horstrup et al., 1994; Abel et al., 1995; Ammendola et al., 2001). Dies hat eine Veränderung des Molekulargewichts von 46 kDa auf 50 kDa zur Folge.

Drei verschiedene Phosphorylierungsstellen konnten bislang in VASP biochemisch identifiziert werden (Serin 157, Serin 239, Threonin 278, vgl. Abb. 2-6). Die Phosphorylierung dieser Stellen reguliert Interaktionen und Funktionen von VASP (Geese et al., 2002; Loureiro et al., 2002). Diese werden sowohl von der cAK als auch der cGK mit überkreuzender Selektivität phosphoryliert und von der Protein-Phosphatase I und II dephosphoryliert (Halbrügge et al., 1990; Eigenthaler et al., 1992; Butt, Abel et al., 1994; Abel et al., 1995; Smolenski et al., 1998).

Die von der cAK bevorzugte Phosphorylierung von Serin 157 führt zu einem deutlichen Shift der Molekülmasse von VASP in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von 46 kDa zu 50 kDa (Eigenthaler et al., 1992). Dagegen wird VASP an Serin 239 bevorzugt durch die cGK phosphoryliert und stellt eine der besten in vitro Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase G dar (Butt, Abel et al., 1994; Butt, Eigenthaler et al., 1994). Erst nach Einführung von spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin 157 und Serin 239 konnte die VASP-Phosphorylierung in intakten Zellen genauer untersucht werden (Smolenski et al., 1998). In Experimenten mit gut charakterisierten Proteinkinase-Aktivatoren war der Shift in der Molekülmasse nützlich, um deren Präferenzen sowohl für die cAK als auch die cGK in intakten Zellen zu analysieren (Halbrügge et al., 1990; Eigenthaler et al., 1992).

VASP-defiziente Mäuse zeigen einen milden Phänotyp. Dieser äussert sich durch eine leichte Megakaryozyten-Hyperplasie im Knochenmark und in der Milz (Hauser et al., 1999). Die Phosphorylierungsstellen des murinen VASP sind an Serin 153, Serin

235 und Threonin 274 (siehe Abb. 2-7). Die in dieser Arbeit eingesetzten Phosphorylierungs-Antikörper sind konkordant an humanen und murinen Tz einsetzbar (Harbeck et al., 2000).

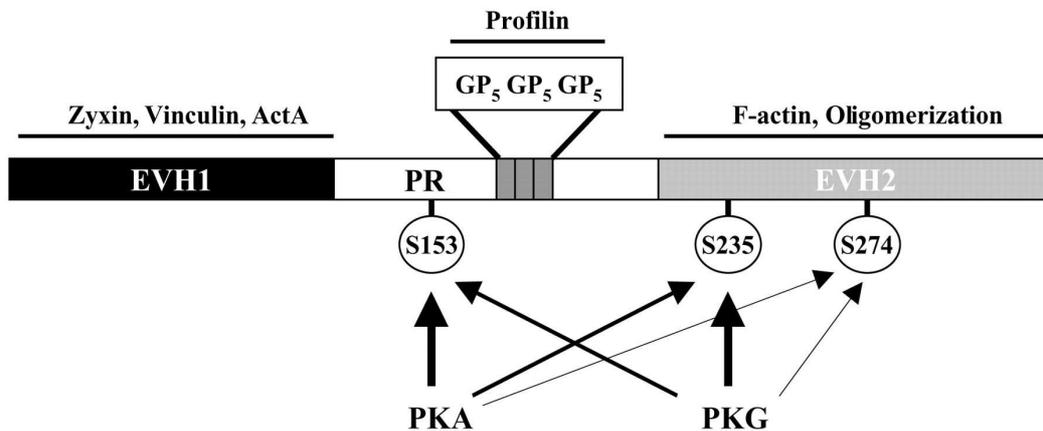


Abbildung 2-7: Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP) der Maus.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur des murinen VASP mit dessen Bindungspartnern. Die Phosphorylierungsstellen der cAK und cGK (Serin 153, Serin 235 und Threonin 274) sind mit Pfeilen markiert (nach Harbeck et al., 2000).

An isolierten VASP-defizienten Plättchen wurde eine erhöhte Aktivierung durch Thrombin und Kollagen als auch eine verminderte Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation durch zyklische Nukleotide nachgewiesen (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Isolierte Thrombozyten aus VASP^{-/-}-Mäusen zeigen ferner eine erhöhte Agonisten-induzierte Expression von P-Selektin und Fibrinogen-Bindung an das Integrin GPIIb-IIIa (Aszodi et al., 1999). Eine mögliche Erklärung für die Thrombozyten-inhibierende Funktion von VASP konnte auch durch Daten von Bearer (Bearer et al., 2000) geliefert werden. Der Aktivierung von Thrombozyten folgt der Gestaltwandel, der shape change, der durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verursacht wird. Gelsolin fördert diesen shape change durch Bindung und Auflösung von Aktin Filamenten. VASP bindet in vitro gleichzeitig mit Gelsolin an die Enden von Aktin-Filamenten und hemmt dabei dessen Aktinauflösende Funktion. Daraus ergibt sich die Erkenntnis, dass VASP in vitro eine zentrale Rolle innerhalb der Regulation der Thrombozytenaktivität einnimmt (Hauser et al., 1999; Kwiatkowski

et al., 2003). Wie bereits oben erwähnt scheint die Phosphorylierung von VASP eine zentrale Rolle in der Hemmung der Thrombozyten zu spielen.

Zudem adhären VASP^{-/-}-Thrombozyten in vivo verstärkt an Endothel und subendotheliale extrazelluläre Matrix (Massberg et al., 2003). Die Expression der anderen Familienmitglieder Mena und Evi in VASP^{-/-}-Mäusen ist nicht erhöht und es besteht die Möglichkeit, dass die Funktion von VASP durch Mena oder Evi kompensiert wird (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999).

3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie im vorangehenden Kapitel dargestellt, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Rolle des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) auf den Formwandel der Thrombozyten *in vitro* untersucht werden. Der *shape change* der Thrombozyten kann über einen Kalzium-abhängigen Signalweg über die Myosin-Leichtketten-Kinase oder über einen Kalzium-unabhängigen Signalweg via Rho und Rho-Kinase initiiert werden. VASP besitzt eine Funktion für die Aktivierung der Thrombozyten durch eine Aktin-Polymerisationsaktivität und Interaktion mit Profilin, und könnte daher bei der dem *shape change* zugrunde liegender Remodellierung des Aktinzytoskelettes (z.B. der Ausbildung von Pseudopodien und Filopodien) eine Rolle spielen. Weiterhin könnte durch Phosphorylierung von VASP durch cAMP- und cGMP-abhängige Kinasen der *shape change* gehemmt werden.

Folgende Fragen sollten durch Untersuchungen an Human- und Mäusethrombozyten geklärt werden:

1. Gibt es Unterschiede von Mäuse- und Human-Thrombozyten bezüglich der Aktivierbarkeit und Hemmbarkeit des *shape change* ?
2. Spielt VASP eine Rolle für den *shape change* ? Durchführung vergleichender Untersuchungen der Induktion des *shape change* durch verschiedene Agonisten an Thrombozyten von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Mäusen.
3. Bewirkt die Phosphorylierung von VASP durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen eine Hemmung des *shape change*? Gibt es Unterschiede der VASP-Phosphorylierung bei Mäuse- und Human-Thrombozyten?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Substanzen und Chemikalien

Acetylsalicylsäure	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid	Amresco
Adenosin-3´-Phosphat 5´-Phosphat	Sigma
Albumin, bovin	Sigma
Albumin, human	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Apyrase	Sigma
β-Mercapto-Ethanol	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Butanol, <i>n</i> -Butanol	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Merck
D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Ethanol, absolut	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Formaldehyd-Lösung (37% w/v)	Sigma
Glycin	Merck
HEPES, N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethanosulfon-säure]	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Merck
Isofluran Gas	Abbot
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kupfersulfat	Sigma
L-α-Lysophosphatidsäure	Sigma

Magermilchpulver	Biorad
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol, absolut	Merck
Natriumcitrat	Sigma
Saures Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck
Natriummonohydrogenphosphat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Refludan	Pharmion
8-pCPT- cGMP	BioLog
Prostaglandin E_1	Sigma
Salzsäure (37%)	Merck
SDS	Sigma
Sp-5,6- DCI- cBIMPS	BioLog
SNAP	Sigma
TEMED	Sigma
Thrombin, human	Sigma
TRIS-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
U46619	Biomol
Zitronensäure, Monohydrat	Sigma
Zitronensäure, Trinatriumsalz	Sigma

4.1.2 Puffer und Lösungen

Resuspensionspuffer B:	20 mM	HEPES
	138 mM	NaCl
	2,9 mM	KCl
	1,0 mM	MgCl ₂
	0,36 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH = 6,2	
Resuspensionspuffer C:	20 mM	HEPES
	138 mM	NaCl
	2,9 mM	KCl
	1,0 mM	MgCl ₂
	0,36 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH = 7,4	
2x SDS-Auftragspuffer nach Laemmli:	TRIS-HCl, pH 6,8	0,1 M
	Glycerin	20ml
	SDS	4g
	β-Mercaptoethanol	2ml
	Bromphenolblau	1mg
	H ₂ O bidest	ad 100ml
Acrylamid-Stammlösung:	40% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung 37,5:1	
Sammelgel-Puffer:	0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	
Trenngel-Puffer:	1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8	
Ammoniumpersulfat (APS):	10% (w/v) APS in H ₂ O bidest, in 0,5ml Aliquots auf 20°Celsius, frisch zusetzen	

Natriumdodecylsulfat (SDS):	10% (w/v) SDS in H ₂ O bidest
5x Elektrophoresepuffer:	TRIS 75g Glycin 360g SDS 25g H ₂ O bidest ad 5l pH nicht nachstellen
Kathodenpuffer:	40 mM Aminocaprinsäure 20% Methanol pH ca. 7,6
Anodenpuffer I:	0,3 M TRIS 20% Methanol pH ca. 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM TRIS 20% Methanol pH ca. 10,4
TBST-Puffer:	10 mM TRIS, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20
Block-Lösung:	TBST-Puffer 5% (w/v) Magermilchpulver
Erst-AK-Lösung:	Erst-AK verdünnt in 30ml TBST-Puffer
Zweit-AK-Lösung:	Zweit-AK verdünnt in 30ml TBST-Puffer

Fixier-Puffer:	150 mM	NaCl
	4,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,6 mM	KH ₂ PO ₄
	4,6 mM	Na ₂ EDTA
	0,16 % (w/v)	Formaldehyd

PBS-Puffer:	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH = 7,4	

4.1.3 Verwendete Stimulantien und Inhibitoren

Tabelle 4-1: Eingesetzte Agonisten zur Aktivierung von Thrombozyten.

Angabe des Lösungsmittels, Stocklösungen und eingesetzte Konzentrationen.

Abkürzung	Wirkstoff	Gelöst in	Stock	Konz.
LPA	Lysophosphatidsäure	Ethanol	1 mM	1 nM- 1 mM
U 46619	Thromboxan A ₂ -Analogon	Ethanol	10 mM	1 nM- 1 µM
ADP	Adenosin 3,5- Diphosphat	NaCl 0,9%	5 mM	50 nM- 10 µM

Tabelle 4-2: Eingesetzte Antagonisten zur Inhibition von Thrombozyten.

Angabe des Lösungsmittels, Stocklösungen und eingesetzte Konzentrationen.

Abkürzung	Wirkstoff	Gelöst in	Stock	Konz.
PGE ₁	Prostaglandin E ₁	Ethanol, PBS	2,82 mM	1 nM- 1 mM
cBIMPS	Sp-5,6-DCI- cBIMPS	NaCl 0,9%	20 mM	1 µM- 1 mM
8pCPT	8-pCPT- cGMP	NaCl 0,9%	20 mM	1 µM- 2 mM
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin	Methanol, Ethanol	40 mM	0,1µM- 100µM

4.1.4 Antikörper

Erstantikörper:

- | | |
|---|---|
| - 10C6, Anti-VASP-Phospho-Serin 157, Monoklonal, Maus | NanoTools |
| - 16C2, Anti-VASP-Phospho-Serin 239, Monoklonal, Maus | NanoTools |
| - M4, polyklonaler VASP-AK, Kaninchen | von Prof. Eigenthaler
zur Verfügung gestellt |

Zweitantikörper:

- | | |
|---------------------------------|----------|
| - Ziege Anti-Maus IgG, HRP | Amersham |
| - Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP | Amersham |

4.1.5 Weitere Materialien und Geräte

- | | |
|--|-------------------|
| Thrombo Plus Speziallösung | Sarstedt |
| Neubauer Zählkammer | Marienfeld GmbH |
| Labor-Aggregometer | Fresenius |
| Chronolog-Aggregometer | Chrono-Log |
| Küvetten und Rührstäbchen: Makro und Mixer | Labor Fibrintimer |
| Küvetten (450µl), Distanzstücke und Mixer | Nobis |
| Lichtmikroskop D 65323 | Leitz |
| Megafuge 1.ORS | Heraeus |

Für SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting:

- | | |
|---|---------------------------|
| Vertikal-Gelelektrophorese Apparatur Protean II xi Cell | Biorad |
| Gießstand, Glasplatten (21,5cm x 18,5cm x 3mm), spacer | Biorad |
| Semi-Dry-Blotting Apparatur | LKB 2117,
Multiphor II |

Nitrozellulose-Membran Hybond-Super	Amersham
Filterpapier Novablot PKG/500	Pharmacia
	Biotech
SuperSignal Chemiluminescent Substrate	Pierce
Rainbow Protein-Marker	Amersham
ECL Hyperfilm	Amersham
Densitometer Pharmacia	LKB, Schweden

4.1.6 Versuchstiere

VASP^{-/-} - und VASP^{+/+} -Mäuse wurden uns freundlicherweise aus dem Labor von Herrn Prof. Eigenthaler und Herrn Prof. Walter vom Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie von der Universität Würzburg für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Der VASP-*knockout* basiert auf der Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette in das VASP-Gen. Diese macht die korrekte Expression des Gens nicht mehr möglich. Für die Experimente dieser Studie wurden 8- bis 12-Wochen alte männliche VASP-*knockout*- und VASP-Wildtyp-Mäuse mit C57BL/6/129sv-Hintergrund verwendet.

4.2 Methoden

4.2.1 Blutabnahme beim Menschen

Venöses Blut wurde durch Punktion der Vena cubiti media mittels einer 19 G-Butterflykanüle bei gesunden Spendern im Alter von 20–50 Jahren gewonnen. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Spender in den letzten 14 Tagen vor der Blutabnahme keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen hatten. Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13% w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in 50 ml Perfusor-Spritzen der Firma Braun mit entsprechend vorgelegter Natriumcitratlösung.

4.2.2 Blutabnahme bei VASP-Mäusen

Die Maus wird am Schwanz gepackt und in ein passendes Gefäß verbracht. In unserem Fall handelt es sich um ein hohlzylinderartiges Gefäß mit 2 verschließbaren Öffnungen. Ein Verschluss besitzt ein kleines Loch, durch das ein kleiner Schlauch in den Zylinder eingebracht werden kann. Es erfolgte die Begasung des Zylinders durch den Schlauch mit Isofluran-Gas (Forene®, Abott, Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Firma Eickmeyer, Tuttlingen) und es wurde Sauerstoff eingeleitet. Nach ca. 1 min ist die Maus vollständig anästhesiert, was anhand des in der Anästhesie üblicherweise benutzen Ramsay-Scores überprüft wird.

Die Maus wird aus dem Zylinder genommen und mit dem Kopf in die Öffnung einer 10 ml-Spritze gesteckt. An das andere Spritzenende wird der oben genannte Schlauch angeschlossen und somit die Maus weiterhin mit Isofluran begast. Nun werden die Extremitäten der Maus abgespreizt und mit Klebestreifen fixiert. Das Fell im Bereich des Sternums sollte mit etwas Desinfektionsspray befeuchtet werden. Dies verhindert, daß beim Sternumschnitt allzuviel Haare im Thoraxbereich ankleben. Nun werden die Hautschichten mit einer anatomischen Pinzette gepackt, etwas angehoben und man schneidet mit einer Schere ein Eröffnungsloch durch die Hautschichten. Dabei sollte die darunterliegende muskulär-knöchernen Schicht allerdings nicht verletzt werden. Das Eröffnungsloch wird nun erweitert bis der gesamte Thoraxbereich sauber freigelegt ist. Mit einer vorbereiteten 2 ml-Spritze (vgl. Punkt 4.2.4) mit vorgelegtem Acetylsalicylsäure-Elsevers-Gemisch und dem

Thrombininhibitor Refludan wird nun an der Stelle, wo das schlagende Herz durch den Thorax hindurch am besten zu erkennen ist, in das Herz gestochen. Dabei sollte die Kanüle ca. zu 2/3 ihrer Länge eingestochen werden. Liegt die Kanüle richtig wird durch leichte und vorsichtige Aspiration Blut in die Spritze fließen. Lässt sich kein Blut aspirieren, muß man zunächst den Aspirationszug etwas mindern und kann dann erneut vorsichtig versuchen, mit der Kanüle das Herz zu treffen.

Der Vorgang der Extraktion sollte nicht länger als ca. 1 min andauern. Je nach Art und Größe der Maus gewinnt man 0,8- 1,5 ml Mäuseblut. War die Blutextraktion erfolgreich, wird der Aspirationszug von der Spritze genommen und erst dann wird die Spritze herausgezogen. Die Nadel wird abgezogen und entfernt. Das eventuell darin noch befindliche Blut wird nicht mehr in die Spritze aspiriert. Das in der Spritzenöffnung befindliche Blut allerdings wird durch leichte Aspiration in die Spritze gezogen. Die Spritze wird verschlossen und unverzüglich vorsichtig mehrmals gekippt. Die Durchmischung der Spritzeninhalte wird dadurch gewährleistet. Die Aufarbeitung des Blutes erfolgt unverzüglich (vgl. Punkt 4.2.4).

4.2.3 Präparation humaner Thrombozyten

Zur Präparation humaner Thrombozyten wurde die folgende in unserem Labor als Standardmethode genutzte Präparation nach Negrescu (Negrescu et al., 1995) durchgeführt. Sie eignet sich besonders gut zur Messung des *shape change* der Thrombozyten. Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13% w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in 50 ml Perfusor-Spritzen mit entsprechend vorgelegter Natriumcitratlösung (vgl. Punkt 4.2.1). Das antikoagulierte Blut wurde auf 50 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt und bei 180g und 24°C für 20 min zentrifugiert.

Das plättchenreiche Plasma (PRP) im Überstand wurde abpipettiert und nach Hinzugabe von Acetylsalicylsäure (1 mM f.c.) und Apyrase, einer Phosphodiesterase die ADP abbaut (0,3 U/ml f.c.), für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von Zitronensäure (9 mM f.c.) und EDTA (5 mM f.c.) erfolgte die Pelletierung der Thrombozyten durch Zentrifugation bei 800g und 24°C für 20 min. Der Überstand (plättchenfreies Plasma) wurde abgenommen und verworfen. Die Resuspension der Thrombozyten erfolgte dann in 37°C vorgewärmtem Puffer B mit vorgelegter Apyrase (f.c. 0,3 U/ml) in 10% des Volumens des Vollblutes. Hierfür wurde dann 1 ml Puffer B

mit 3 U/ml Apyrase vorgelegt und sehr sorgsam mit der Resuspension der Plättchen begonnen. Die restliche Menge Puffer B mit errechneter Apyrase-Menge wurde anschließend hinzugegeben.

Die Zählung der Thrombozyten erfolgte, nach Entnahme eines Aliquots und Verdünnung in Thrombo-Plus-Spezialzähllösung der Firma Sarstedt, mittels Neubauer-Zählkammer und Phasen-Kontrast-Mikroskopie. Nach erneuter Durchführung einer Zentrifugation bei 800g und 24°C für 20 min erfolgte die entsprechende Resuspension in Puffer C mit erneut vorgelegter Apyrase (0,3 U/ml f.c.). Das Resuspensionsvolumen wurde so gewählt, dass zuletzt eine Thrombozytenkonzentration von 400.000/ μ l erreicht wurde. Abschliessend wurde Glucose (f.c. von 5 mM) zugegeben.

Die Thrombozyten ruhten nun für mindestens 30 min bei Raumtemperatur, damit voraktivierte Formen wieder zum diskoiden Ausgangszustand zurückkehren konnten. Dann konnten die Plättchen ca. 2 Stunden verwendet werden. Danach kam es zu einer deutlichen Abnahme der Sensitivität. Diese Präparation erfordert ein besonders sorgsames Vorgehen, da es durch freigesetztes ADP leicht zu einer artifiziellen Aktivierung und auch Aggregation der Thrombozyten während der Wasch- und Resuspensionsvorgänge kommen kann.

4.2.4 Präparation muriner Thrombozyten

Zur Präparation muriner Thrombozyten wurde nach eingehenden Vortestungen die folgende Präparation entwickelt und als eingeführte Standardmethode angewendet. Sie eignete sich, wie die oben beschriebene Präparationsmethode für humane Thrombozyten, besonders gut zur Messung des *shape change* der murinen Thrombozyten. Wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben, erfolgte die Blutentnahme am narkotisierten Tier.

Zur Antikoagulation wurde eine Mischung aus Acetylsalicylsäure (f.c. 1 mM) und 200 μ l saures Natriumzitat mit einem pH von 6,2 in eine 2 ml-Spritze vorgelegt. Bei einer zu erwartenden Blutmenge von 800-1000 μ l sollte so ein Mischungsverhältnis von ca. 10:2 v/v erreicht werden. Bei grösserer gewonnener Blutmenge wurde das Antikoagulans im angestrebten Mischungsverhältnis nachgelegt. Ebenfalls vorgelegt wurde Refludan mit einer gewünschten Konzentration von 200 U/ml.

Nach oben beschriebener Blutentnahme wurden die Substanzen durch vorsichtiges Kippen gemischt. Die Vollblutproben wurden dann in jeweils ein spezielles Polypropylen-Reaktionsgefäß in 0,5 ml Puffer B aufgenommen. Zunächst wurde 5 min abgewartet, um bei einer eingetretenen Koagulationsreaktion die entsprechende Probe zu verwerfen. Das Blut-Puffer-Gemisch wurde bei 24°C und 70 g für 15 min zentrifugiert. Das hierbei durch Auftrennung entstandene plättchenreiche Plasma (PRP) wurde anschließend vorsichtig abpipettiert. Apyrase mit einer Konzentration von 0,3 U/ml wurde zugesetzt. Nach 5 min Inkubationszeit erfolgte eine erneute Zentrifugation zur Pelletierung bei 24°C mit 600g über 5 min. Der Überstand (plättchenfreies Plasma) wurde abgenommen und verworfen. Die Resuspension der Thrombozyten erfolgte dann in 1 ml auf 37°C vorgewärmtem Puffer C und Apyrase (f.c. von 0,3 U/ml). Bei Abnahme mehrerer Blutproben wurde nun ein Pooling der Thrombozytensuspensionen durchgeführt. Die Zählung der Thrombozyten erfolgte dann wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben. Das Resuspensionsvolumen wurde so gewählt, dass eine Thrombozytenkonzentration von 150.000/ μ l erreicht wurde. Abschliessend wurde Glucose (f.c. von 5 mM) zugegeben. Nach 30 min Ruhen bei Raumtemperatur konnten die Thrombozyten für etwa 2 Stunden verwendet werden.

4.2.5 Die Methode der Aggregometrie mit Messung von Formwandel und Aggregation

Seit der Erstbeschreibung der Methode der Aggregometrie durch Born 1963 (Born et al., 1963) ist die Untersuchung der Thrombozytenaktivierung (*shape change* und Aggregation) ein wichtiges Instrument zur Erfassung angeborener, erworbener und auch medikamentös induzierter Funktionsstörungen der Thrombozyten. Bei der Untersuchung zur Wirksamkeit von Agonisten und Antagonisten (z.B. Aggregationshemmern) ist die Methode gut einsetzbar.

Die Messungen erfolgten mittels eines LABOR-Aggregometers der Firma Fresenius und für die Messungen an Mäuse-Thrombozyten wurde ein Chronolog-Aggregometer der Firma Chrono-Log benutzt. Beide Geräte verwenden Weißlicht einer Wolframlampe und eine Photoelektrode zur Transmissionsmessung.

Das Messprinzip

Hierbei handelt es sich um eine Methode, die die Lichttransmission einer gerührten Thrombozytensuspension oder von gerührtem PRP misst. Die Thrombozytensuspension, die zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle platziert wird, wird bei 37°C und definierter Geschwindigkeit in einer Küvette gerührt. Nach Zugabe von Agonisten (z.B. ADP, Thromboxan A₂, Lysophosphatidsäure oder Thrombin) werden die Plättchen aktiviert und reagieren mit einem initialen Gestaltwandel und eventuell bis zur Ausbildung einer vollständigen Aggregation. Durch Sphärisierung (*shape change*) der initial diskoiden Blutplättchen kommt es zu einer Minderung der Lichttransmission und Abnahme der Basal-Oszillationen. Dabei nimmt die Lichtdurchlässigkeit durch die Küvette ab. Diese Änderung der Lichtdurchlässigkeit wird von einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Durch Aggregation nimmt die Anzahl der korpuskulären Bestandteile der Suspension ab und folgend die Lichttransmission zu.

Nach fünfminütiger Inkubation im eingebauten Thermoblock bei 37°C und, falls das Experiment dies vorsah, Inkubation mit Antagonisten der Thrombozytenaktivierung (Dauer zwischen 5-20 min), wurde die Küvette mit mindestens 0,4 ml (bzw. 0,2 ml beim Chronolog-Aggregometer) der Thrombozytensuspension in den Strahlengang gebracht. Das Rühren erfolgte durch ein kleines, 4 bzw. 7 mm langes, Magnetrührstäbchen mit einer Geschwindigkeit von 1100 rpm. Mittels eines speziellen 2-Kanal-Schreibers erfolgte die Dokumentation der Lichttransmission. Die Quantifizierung von *shape change* oder Aggregation erfolgte durch Ausmessen der Abweichung der Lichttransmission von der Basallinie in mm. Die maximale Abnahme der Lichttransmission bei vollständigem Gestaltwandel bzw. maximale Zunahme der Lichttransmission bei Aggregation (durch einen bestimmten Agonisten) wurden hierbei als 100% Wert definiert und die weiteren Messwerte dazu ins relative Verhältnis gesetzt. Zur Bestimmung der Veränderung der Lichttransmission wurde die Basallinie der Thrombozyten- Suspension als Nullwert und das Suspensionsmedium Puffer C als 100% Wert der Lichttransmission definiert. Desweiteren erfolgte die Abnahme entsprechender Proben und Überführung in vorgelegte Puffer zur Bestimmung der VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten bzw. für die Elektronenmikroskopie (siehe Punkte 4.2.7 und 4.2.9).

4.2.6 Messung des Formwandels bei Human- und Mäusethrombozyten

Protokoll zur Messung mit Humanthrombozyten:

Einstellungen Labor-Aggregometer:

- Rührer auf 550 (x2) rpm, entspricht 1100 rpm
- Verstärkerknopf (*balance*) ganz nach links und dann 3,5 Umdrehungen im Uhrzeigersinn nach rechts (optimal für *shape change*-Messungen)
- Oszillationsknopf auf Position 2 Uhr
- Küvetten und Rührstäbchen in Anwärmeblock geben
- Anwärmzeit für Aggregometer ca. 10 min

Einstellungen am Chronolog-Schreiber:

- Kontakte checken, Rec-Knopf drücken
- Millivolteinstellung: für *shape change* auf 20 mV, für Aggregation auf 50 mV
- *Chart*-Knopf drücken für Papiervorlauf, Geschwindigkeit 2 cm/ min

Messung:

- 400 µl Thrombozytensuspension (400.000 Tz/µl) in Küvetten vorlegen
- 5 min im Aggregometer bei 37°C anwärmen
- falls Experiment dies vorsieht Vorinkubation mit Antagonist der Tz-Aktivierung
- Küvette in die Messkammer stellen, vorher noch Prüfung auf eventuelle Luftblasen am Küvettenboden, notfalls durch leichtes Klopfen auf Unterlage diese entfernen
- Schreiberknopf einstellen mit Voltfeineinstellungs- und Zero-Knopf
- Agonist zugeben

Protokoll zur Messung mit Mäusethrombozyten:

Chronolog-Aggregometer:

- Vorwärmzeit ca. 15 min
- Rührer auf 700-800 rpm
- Anschluß an Chronolog-Schreiber von Aggregometeranschluß „*Optical*“ zu Schreiberanschluß „*Lower Pen*“
- Hintere Küvette mit ca. 300 µl Puffer C füllen, eventuell zur besseren Anzeige der Grundoszillation mit Tz-Suspension versetzen

- Küvette mit 200 µl Tz-Suspension füllen (150.000 Tz/µl), für 5 min in Vorwärmkammer bei 37°C stellen, eventuell mit Antagonisten vorinkubieren falls Experiment dies vorsieht
- Küvettendistanzstück unten an die Küvette kleben
- Küvette in vordere Messkammer stellen
- *Baseline*-Knopf drücken, um von der vorderen Kammer den Leerwert der hinteren Kammer abzuziehen
- Agonist zugeben

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen im Polyacrylamidgel wird der Siebeffekt des Gels und die Ladung der Polypeptide ausgenutzt. In der hier durchgeführten SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) unter Anwendung eines 12%igen Polyacrylamid-Gels wird die Ladung der Polypeptide durch die Bindung des anionischen SDS nahezu ausgeschaltet. Dadurch hängt die elektrophoretische Wanderung der Proteine zur Anode allein von der Grösse des Proteins und der Porengrösse des Gelnetzwerkes ab. Schwefelbrücken werden durch die Erhitzung auf 95°C in Anwesenheit von Beta-Mercaptoethanol reduziert und dadurch wird eine Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur bewirkt. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gels erfolgt vor der eigentlichen Trennung die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel.

Tabelle 4-3: Herstellung eines 12%igen Polyacrylamid-Gels, Größe 21,5cm x 18,5cm.

Pipettierschema für Trenngel und Sammelgel aus angegebenen Lösungen.

	Trenngel (T=12%)	Sammelgel (T=4,6%)
Acrylamid-Stammlösung	15 ml	2,5 ml
Trenn-/Sammelgel-Puffer	12,5 ml	5 ml
H ₂ O bidest	21,7 ml	13,9 ml
SDS-Lösung	0,5 ml	0,2 ml
APS-Lösung	0,3 ml	0,06 ml
TEMED	40 µl	20 µl

Tabelle 4-4: Trenngel-Lösung für 1 Gradientengel.

Pipettierschema aus angegebenen Lösungen.

	Leichte Lösung (T=5,2%)	Schwere Lösung (T=20,6%)
Acrylamid-Stammlösung	3 ml	12 ml
Trenngel-Puffer	6 ml	6 ml
H ₂ O bidest	14,7 ml	
Glycerin		5,7 ml
SDS-Lösung	0,24 ml	0,24 ml
TEMED	15 µl	15 µl

Durchführung:

- Die Glasplatten mit Wasser spülen, mit Aceton entfetten
- Gelkammer zusammenbauen und auf Dichtheit prüfen
- Trenngel- Lösung mit wasser-gesättigtem Butanol überschichten und 2 h polymerisieren lassen
- Butanol mit Filterpapierstreifen abnehmen, Trenngelkante mit H₂O spülen, Gel gründlich mit Filterpapier von Wasser befreien
- Zur Sammelösung wird Ammoniumperoxidisulfat (APS) und TEMED zugegeben, bis zum oberen Rand der Gelkammer eingiessen. Kamm mit Probestaschen einsetzen und Luftblasen entfernen. Sammelgel polymerisieren lassen.

-
- Glasplatten in feuchte Tücher wickeln um Austrocknung vorzubeugen, dann in Folie packen und über Nacht im Kühlraum aufbewahren
 - Kamm entfernen, Probenaschen mit Elektrophoresepuffer ausspülen
 - Gelkammer in Elektrophoreseapparatur einsetzen, obere und untere Elektrodenkammer mit Elektrophoresepuffer füllen, Luftblasen beseitigen
 - Die Proben werden nach Durchführung der Inkubation mit den Antagonisten des *shape change* in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und sofort 5 min bei 95°C gekocht. Unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 15.000g für 5 min pelletieren, Proben abkühlen lassen
 - Proben vorsichtig in Geltaschen pipettieren, Protein-Marker-Lösung in eine Geltasche
 - Elektrophorese über Nacht bei 15 mA durchführen

4.2.8 Immunologische Techniken: Western Blotting

Um die Expression der VASP-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde die Western-Blot Methode angewandt. Bei diesem Verfahren werden Proteine, die durch Gelelektrophorese getrennt wurden, auf eine Membran transferiert und dann mit Hilfe von speziellen Antikörpern nachgewiesen. Die Trennung der Proteinproben nach der Methode von Laemmli wurde unter 4.2.7 bereits beschrieben. Der folgende Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch elektrophoretische Elution im Semi-Dry-Verfahren (Towbin et al., 1979). Die benötigten Materialien und Puffer sind unter Punkt 4.1 aufgeführt.

Elektroblotting:

- Nitrozellulose-Membran und 15 Filterpapiere auf entsprechende Grösse zurechtschneiden (Standardgrößen 12,5cm x 16cm).
- Nitrozellulose-Membran tränken in Milli Q-Wasser, 4 Filterpapiere in den Anodenpuffer I, 4 in Anodenpuffer II und 7 in den Kathodenpuffer einlegen. Bildung von Luftblasen vermeiden.
- Nachdem die Gel-Elektrophorese beendet ist den zum Transfer vorgesehenen Teil ausschneiden
- Elektrodenplatten der Blotting-Apparatur mit H₂O bidest benetzen

- Zunächst die in Anodenpuffer I getränkten Filterpapiere nacheinander auf die Anode legen (generell zu beachten ist: nach jeder der nun folgenden Lagen Luftblasen durch vorsichtiges Rollen mit einer Walze entfernen, überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier entfernen)
- Im Anschluss die in Anodenpuffer II getränkten Filterpapiere nacheinander auf die Anode legen
- Nitrozellulose-Membran auf den Filterpapierstapel legen
- Dann vorsichtig das Gel auf Nitrozellulose-Membran legen
- Nacheinander die in Kathodenpuffer getränkten 7 Filterpapiere auf das Gel geben
- Die obere Elektrodenplatte parallel auflegen und mit Metallplatte (1,5 kg) beschweren
- Stromstärke von 195 mA einstellen
- Transfer durchführen für ca. 2 h

Tabelle 4-5: Eingesetzte Antikörper und Antikörperkonzentrationen.

	Name	Gegen	Konzentration/ Verdünnung
1. AK	10C6, Anti-VASP-Phospho-Serin 157	Anti-Maus	0,5 µg/ml
	16C2, Anti-VASP-Phospho-Serin 239	Anti-Maus	0,5 µg/ml
	M4, polyklonaler VASP-AK	Anti-Kaninchen	1: 2000
2. AK	Ziege Anti-Maus IgG, HRP	Anti-Maus	1: 5000
	Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP	Anti-Kaninchen	1: 5000

Immundetektion:

Vor der Antikörpernachweisreaktion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit der Block-Lösung für 1 h bei RT blockiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (vgl. Tab. 4-5) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurde die Reaktion mit dem entsprechenden 2. Antikörper durchgeführt. Die folgenden Schritte wurden in einer Metallschale auf einem Horizontal-Schüttler durchgeführt.

-
- Nachdem der Transfer auf die Membran beendet war, wurde die Membran mit einer stumpfen Pinzette entnommen und mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine Schale mit 50 ml Block-Lösung gegeben
 - Dort verblieb die Membran mind. für 1 h bei RT
 - Dann folgte 2x ein Waschschrift mit TBST-Puffer über jeweils 5 min
 - Zugabe von 50ml der Erst-Antikörper-Lösung, 1 h bei RT inkubieren
 - Membran im Anschluss 3x 10 min mit TBST-Puffer waschen
 - Zugabe von 50ml der Zweit-Antikörper-Lösung, 1 h bei RT inkubieren
 - Membran im Anschluss 3x 10 min mit TBST-Puffer waschen
 - Für die nun folgende Chemilumineszenz-Detektion Zugabe eines 1:1 Gemisches aus Luminol/Enhancer und Peroxid-Lösung, 5 min inkubieren lassen
 - Membran kurz in TBST-Puffer waschen
 - Membran in Frischhaltefolie wickeln, Luftblasen mit einer Walze entfernen
 - Anbringung des Markerstreifens (Stratagene)
 - Membran mit der geblotteten Seite nach oben auf einen Karton kleben, in Filmkassette legen
 - In der Dunkelkammer Exposition auf ECL Hyperfilm und Entwicklung bis zur gewünschten Signalstärke. Emittiertes Licht der Wellenlänge 466 nm wurde mit geeigneten Filmen (Hyperfilm ECL, Firma Amersham) detektiert.

Densitometrische Auswertung des Western Blots:

Die quantitative Auswertung der Schwärzung der Banden auf dem Film wurde densitometrisch mit der Software GelScanTMXL von Pharmacia LKB Biotechnology (Scanner SHARP JX-325, Pharmacia Biotech) durchgeführt. Gemessen wurde die Absorption der gesamten Bande in Bezug auf einen Hintergrund-Parameter. Die gemessene Absorption pro Flächeneinheit wurde nach Integration in Absorptionseinheiten $\times \text{mm}^2$ angegeben.

4.2.9 Elektronenmikroskopie

Die Präparation der für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen benötigten Thrombozyten wurde nach dem in unserem Labor gängigen Standard durchgeführt (siehe Punkte 4.2.3 und 4.2.4 und Siess et al., 1983 und Maschberger et al., 2000).

Zur Probengewinnung für die Elektronenmikroskopie wurden die Thrombozyten zunächst mit dem jeweiligen Antagonisten inkubiert. Mit PGE₁ und SNAP jeweils 5 min bei RT, mit cBIMPS und 8-pCPT-cGMP jeweils 20 min bei RT. Danach wurden die Proben bei 37°C unter Rühren in Aggregometer-Küvetten 5 min erwärmt. Nun wurden zunächst Aliquots als Kontrollen vor Aktivierung durch Agonisten entnommen. Nach Zugabe der Agonisten bzw. Kontroll-Puffer wurden Aliquots von 0,05 ml in 0,5 ml Fixier-Puffer bestehend aus Glutaraldehyd (2,5-3%) und Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,3) überführt. Die Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

Im Verlauf wurden die Thrombozyten auf Glasplättchen zentrifugiert. Dazu wurden Glasplättchen in eine 24-well Schale gegeben und mit 100 µl poly-(L)-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet. Poly-(L)-Lysin diente der besseren Haftung der zu fixierenden Zellen. Dann erfolgten 2 Waschschriffe mit PBS-Puffer und die Trocknung an der Luft. Auf die beschichteten Glasplättchen wurden dann 100 µl Plättchen-Puffer-Gemisch (Konzentration 15.000 Tz/µl) aufgebracht. Zur Beschleunigung der Adhäsion an die Glasoberfläche erfolgte die Zentrifugation der 24-well Platte für 5 min bei 250g. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Plättchen mit 1%iger Glutaraldehyd-Lösung benetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Im Verlauf wurden die Plättchen in einer graduellen Serie einer Ethanolreihe dehydriert und mit Gold beschichtet (dies erfolgte wie die anschliessenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Institut für Anatomie der LMU München). Es wurden Vergrößerungsstufen zwischen 2.000-fach bis 5.000-fach gewählt und relevante Ausschnitte durch abfotographieren dokumentiert.

4.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft. Die folgenden Ergebnisse sind, sofern nicht anders vermerkt, Mittelwert und Standardabweichung (SD). Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde der Student-t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Die p-Werte <0,05 wurden als signifikant bezeichnet und sind in den Abbildungen mit * gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zum *shape change* von Humanthrombozyten und Hemmwirkung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen

Im Rahmen der Untersuchungen zur Thrombozytenaktivierung von humanen und murinen Thrombozyten wurden zunächst bekannte Agonisten des *shape change*, nämlich ADP und das Thromboxan A₂-Analogon U46619 an gewaschenen Humanthrombozyten getestet.

5.1.1 Induktion von *shape change* durch ADP und U46619 bei Humanthrombozyten

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden zunächst mittels Aggregometrie zur Bestimmung des *shape change* und der Bestimmung der Konzentration der halbmaximalen Agonistenwirkung (EC₅₀) durchgeführt.

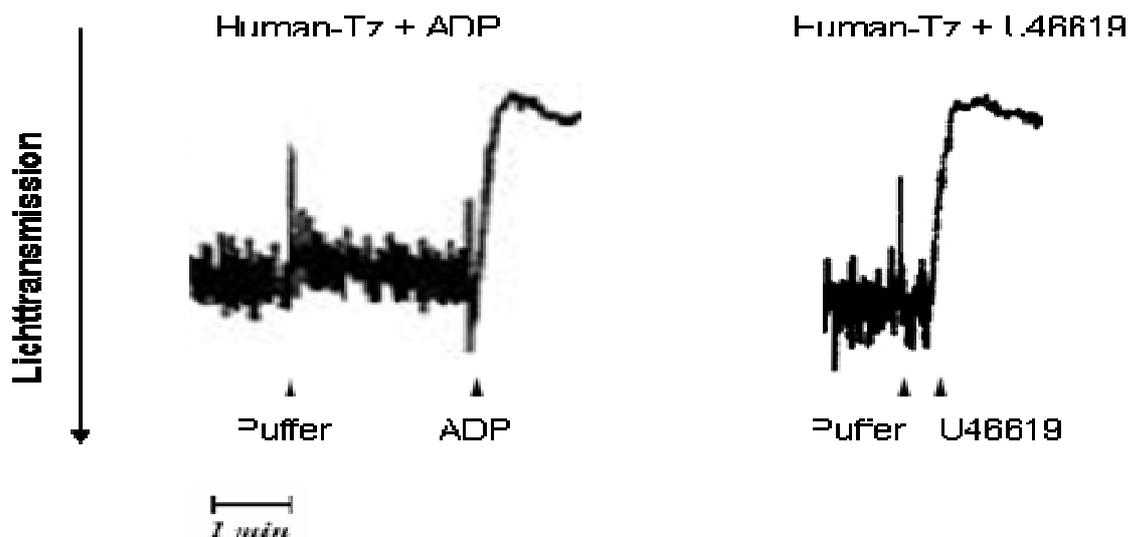


Abbildung 5-1: Induktion des *shape change* von Human-Thrombozyten (Tz) durch ADP oder U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden in einer Küvette entweder mit Puffer als Kontrolle oder mit ADP (0,25 μ M) oder U46619 (50 nM) versetzt. *Shape change* wurde als Abnahme der Lichttransmission gemessen. Das Experiment ist repräsentativ für jeweils n= 20 Experimente.

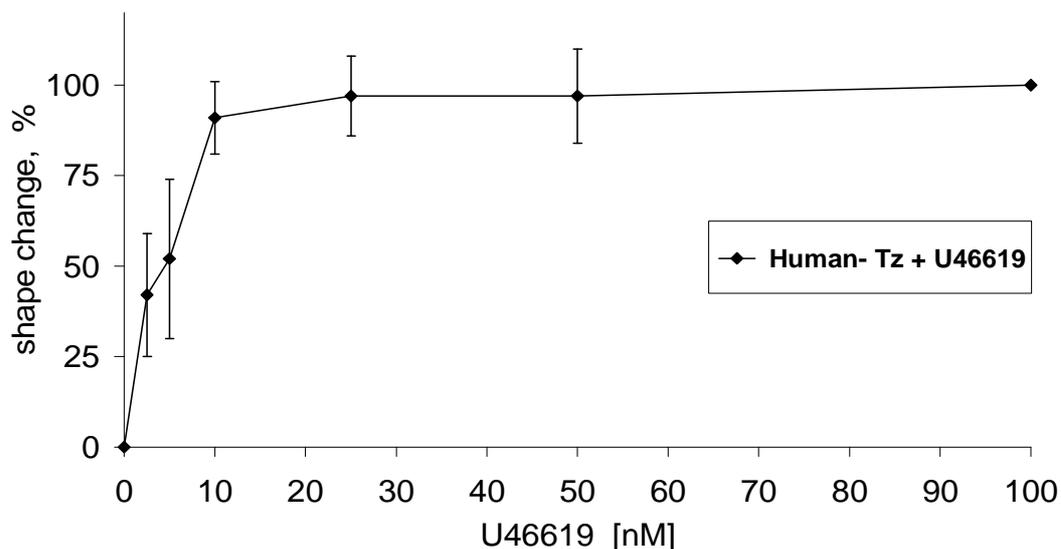
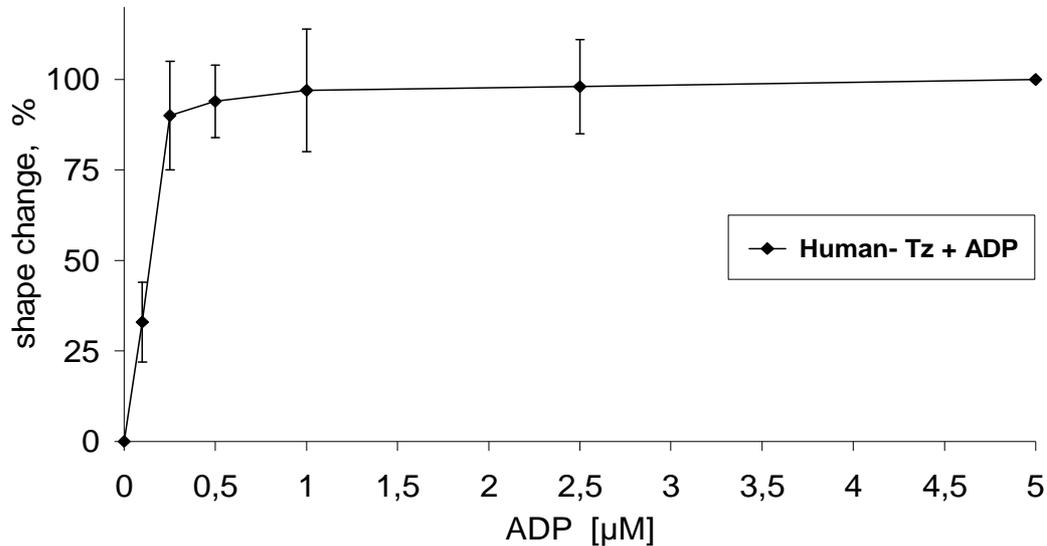


Abbildung 5-2: Induktion von *shape change* durch U46619 oder ADP. Suspensionen von gewaschenen Human-Tz wurden entweder mit Puffer als Kontrolle oder verschiedenen Konzentrationen von ADP (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 und 5 μM) oder U46619 (2,5; 5; 10; 25; 50 und 100 nM) versetzt. *Shape change* wurde als Abnahme der Lichttransmission gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n= 20).

Nach Zugabe von ADP und des Thromboxan A_2 -Analogon U46619 bildete sich umgehend ein *shape change* aus (Abb. 5-1). ADP induzierte in Human-Thrombozyten ab einer Konzentration von ca. 50 nM einen Formwandel. Der maximale *shape change* wurde bei einer Konzentration von im mittel 250 nM

erreicht. Durch ADP konnte ein maximaler *shape change* (also Abnahme der Lichttransmission) von 44 mm gemessen werden und wurde als 100%-Wert gesetzt. Der EC_{50} -Wert betrug 130 ± 53 nM (Abb. 5-2). Das Thromboxan A_2 -Analogon U46619 induzierte ab einer Konzentration von 2,5 nM einen Gestaltwandel. Der maximale *shape change* wurde im Mittel bei einer Konzentration von 25-50 nM erreicht. Durch U46619 konnte ein maximaler *shape change* von 47 mm gemessen werden und wurde ebenfalls als 100%-Wert gesetzt. Der Wert der EC_{50} lag bei ca. 5 nM (Abb. 5-2). Der EC_{50} -Wert für U46619 lag damit ca. um den Faktor 25 niedriger als der EC_{50} -Wert für ADP.

5.1.2 Untersuchungen zur Hemmung des *shape change* durch cAMP-erhöhende Substanzen

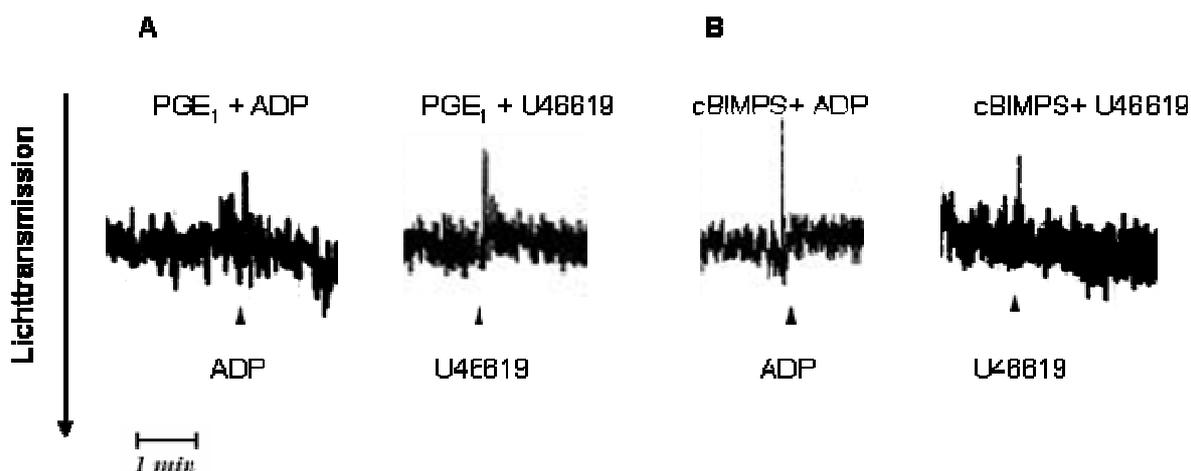
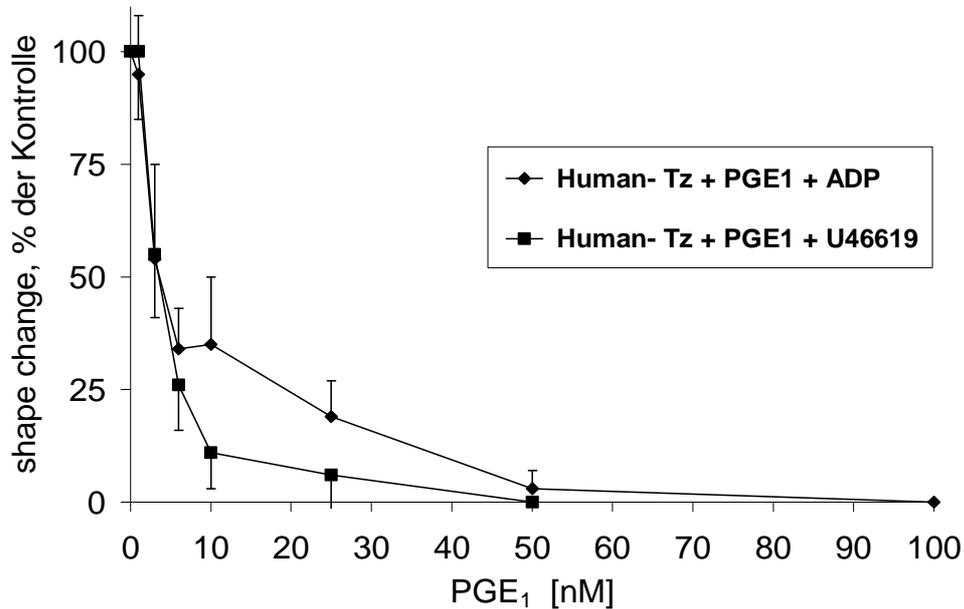


Abbildung 5-3: Hemmung des *shape change* von Human-Tz durch PGE_1 oder cBIMPS nach Stimulation mit ADP oder U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit A) PGE_1 (100 nM, 5 Minuten), B) cBIMPS (100 μ M, 20 Minuten) bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) ADP (0,25 μ M) oder U46619 (50 nM) zugegeben. Beide Substanzen hemmten komplett den *shape change* (jeweils $n=10$).

Die gewaschenen Tz wurden mit cAMP-erhöhenden Substanzen vorinkubiert und dann, nach Zugabe von ADP oder U46619, deren Hemmwirkung auf den *shape change* dokumentiert. Als Substanzen zur Erhöhung der Konzentration von cAMP wurden Prostaglandin E_1 und Sp-5,6-DCI-cBIMPS verwendet (Sandberg et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass PGE_1 und cBIMPS den sowohl durch ADP als auch U46619 induzierten Formwandel vollständig hemmen (siehe Abb. 5-3). Der Wert der Konzentration der halbmaximalen Hemmstoffwirkung (IC_{50}) für PGE_1 lag für ADP bei $5 \pm 2,8$ und für U46619 bei $5 \pm 3,5$ nM. Für cBIMPS waren die IC_{50} -Werte für ADP bei 13 ± 4 und für U46619 bei 10 ± 5 μ M (siehe Abb. 5-4).

A)



B)

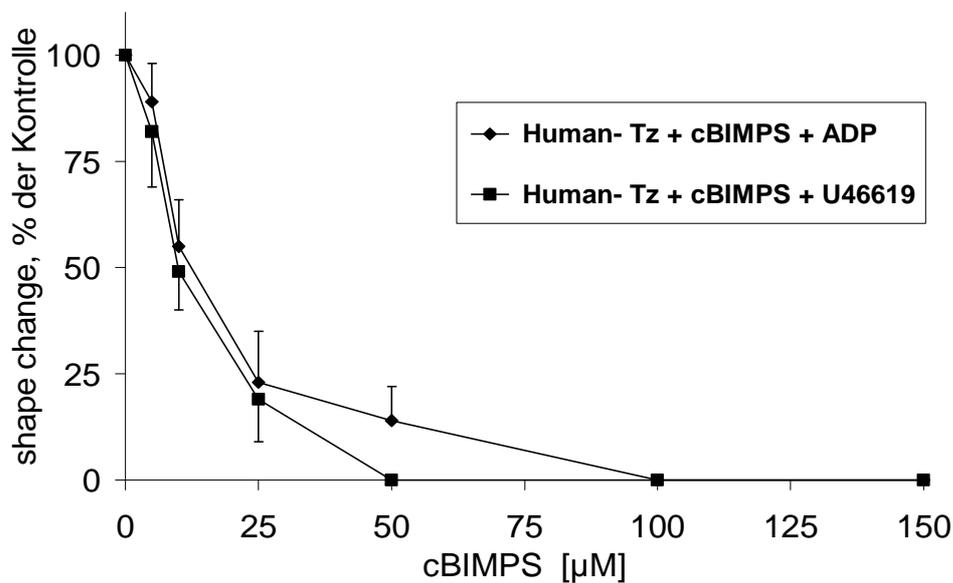


Abbildung 5-4: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von Human-Tz durch PGE₁ (A) und cBIMPS (B) nach Stimulation mit ADP oder U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden mit PGE₁ (1;2,5; 5; 10; 25, 50 und 100 nM) oder cBIMPS (5; 10; 25; 50; 100 und 150 µM) oder mit Puffer als Kontrolle bei 37 °C für jeweils 5 bzw. 20 Minuten vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (jeweils n= 10).

5.1.3 Untersuchungen zur Hemmung des *shape change* durch cGMP-erhöhende Substanzen

Analog den oben durchgeführten Experimenten folgte die Untersuchung der möglichen Hemmung des Tz-*shape change* durch cGMP-erhöhende Substanzen. Die gewaschenen Tz wurden mit cGMP-erhöhenden Substanzen vorinkubiert und dann, nach Zugabe von ADP und U46619, deren Hemmwirkung auf den *shape change* analysiert. Als Substanzen zur Erhöhung der Konzentration von cGMP wurden der NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (=SNAP) und 8-pCPT- cGMP verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass SNAP in der Lage ist, den *shape change* vollständig zu hemmen (siehe Abb. 5-5). Der IC_{50} -Wert von SNAP lag für die Stimulation mit ADP und U46619 im Bereich von 100 nM (siehe Abb. 5-6). Im Gegensatz hierzu konnte durch eine Inkubation mit dem Antagonisten 8-pCPT-cGMP keine signifikante Hemmung des durch ADP oder U46619 induzierten *shape change* der Tz gezeigt werden. Auch bei einer maximalen Konzentration von 2 mM 8-pCPT-cGMP ließ sich keine signifikante Hemmwirkung erzielen (siehe Abb. 5-5 und 5-6).

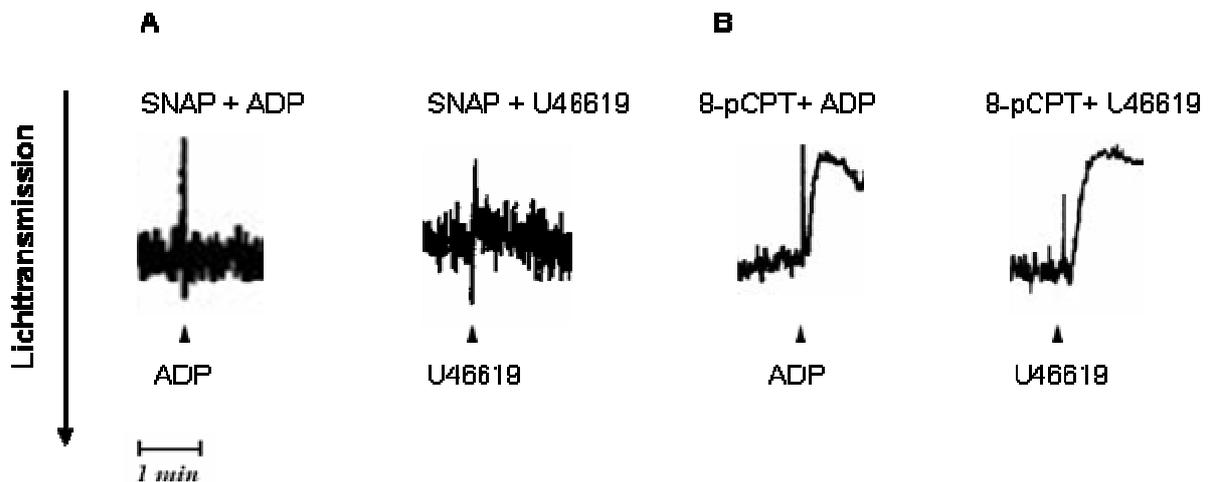
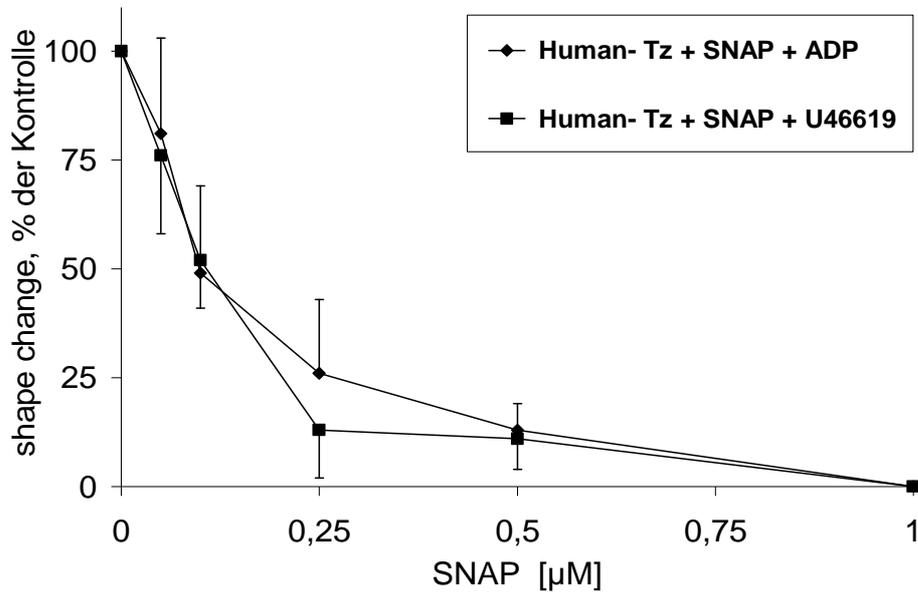


Abbildung 5-5: Hemmung des *shape change* von Human-Tz durch SNAP oder 8-pCPT-cGMP nach Stimulation mit ADP oder U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit A) SNAP (10 μ M, 5 Minuten), B) 8-pCPT- cGMP (2 mM, 20 Minuten) für jeweils 5 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C vorinkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) ADP (0,25 μ M) oder U46619 (50 nM) zugegeben. SNAP hemmte komplett den *shape change*, durch 8-pCPT-cGMP konnte keine signifikante Hemmung erzielt werden (jeweils n= 10).

A)



B)

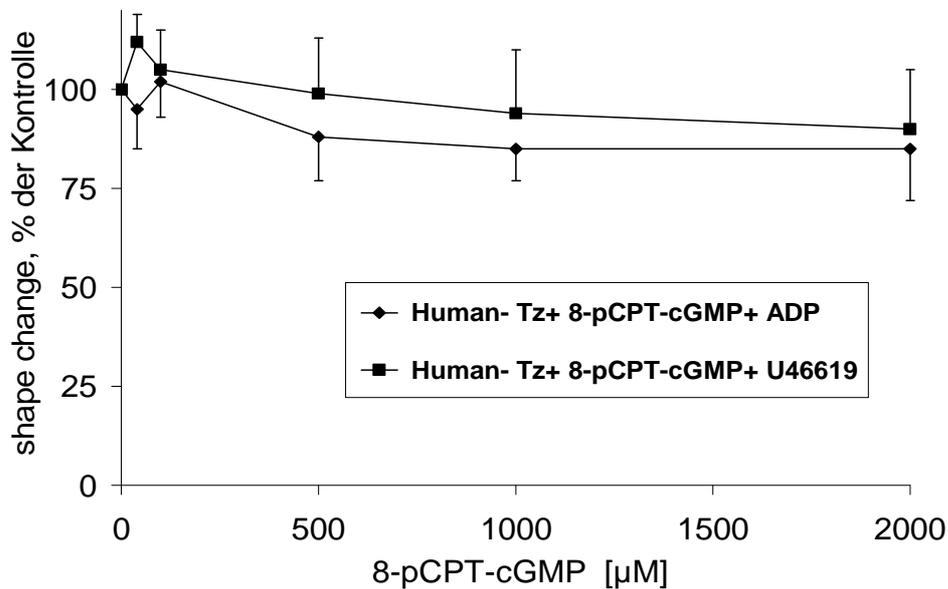


Abbildung 5-6: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von Human-Tz durch SNAP (A), aber nicht durch 8-pCPT- cGMP (B) nach Stimulation mit ADP oder U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden mit SNAP (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 µM) oder 8-pCPT- cGMP (10; 100; 500; 1000 und 2000 µM) oder mit Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 10). 8-pCPT-cGMP zeigte weder nach Aktivierung durch ADP noch durch U46619 eine statistisch signifikante Hemmung des *shape change*.

5.1.4 VASP-Phosphorylierung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen

Im Rahmen der oben dargestellten Experimente mit Humanthrombozyten wurden jeweils Aliquots zur Analyse der VASP-Phosphorylierung entnommen. Die Phosphorylierungsmuster durch die monoklonalen Antikörper 10C6 und 16C2 sind in den Abb. 5-7 bis 5-10 dargestellt. Laut Literatur wird durch die beiden monoklonalen Antikörper eine spezifische Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 angezeigt (Halbrügge et al., 1990; Smolenski et al., 1998; Butt et al., 1994; Eigenthaler et al., 1992). Beschrieben wird, dass an Serin 157 phosphoryliertes VASP einen Shift im Gel von 46 auf 50 kDa aufweist (Smolenski et al., 1998). Für den monoklonalen Antikörper gegen Serin 239, der eine Phosphorylierung von VASP an Serin 239 anzeigt, wird in der Literatur von einigen Autoren die Ausbildung einer Doppelbande beschrieben (Smolenski et al., 1998; Eigenthaler et al., 1992). Die Ausbildung einer Bande bei 50 kDa wird hierbei durch eine VASP-Phosphorylierung an Serin 157 ausgelöst. Beide Banden zeigen aber spezifisch nur die VASP-Phosphorylierung von Serin 239 an (Eigenthaler et al., 1992; Butt et al., 1994; Smolenski et al., 1998). Hier muss man zur Quantifizierung der VASP-Phosphorylierung die Banden an 46 und 50 kDa addieren.

Nach Inkubation der Tz mit einer eingesetzten Konzentration von 100 nM Prostaglandin E₁ ist nach ca. 5 Minuten die stärkste Bandenschwärzung und damit Phosphorylierung von VASP an Serin 157 und Serin 239 durch den 10C6-AK und den 16C2-AK nachweisbar (siehe Abb. 5-7 und 5-8). Auch nach längerer Inkubationszeit mit Prostaglandin E₁ zeigte sich keine stärkere Bandenschwärzung. Der 10C6-AK zeigt hier die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 mit dem typischen Shift auf 50 kDa an. Der 16C2-AK für phosphoryliertes VASP an Serin 239 weist in einigen, aber nicht allen, meiner Experimente eine Doppelbande bei 46 und 50 kDa auf. Das auftreten einer Doppelbande ist auch in der Literatur als inkonsistent beschrieben (Butt et al., 1994, Smolenski et al., 1998).

Für cBIMPS (100 µM) war die stärkste Bandenschwärzung und damit VASP-Phosphorylierung nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten nachweisbar (siehe Abb. 5-7 und 5-8). Der 10C6-AK zeigte auch hier einen typischen Shift auf 50 kDa durch die Phosphorylierung an Serin 157 an. Wiederum stellte sich durch den 16C2-

AK in einigen aber nicht in allen meiner Experimente die Ausbildung einer Doppelbande bei 46 und 50 kDa dar.

Der NO-Donor SNAP erzielte nach 5 minütiger Inkubationsphase (10 μ M) eine maximale Bandenschwärzung und damit VASP-Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239. Der 10C6-AK zeigte wiederum den typischen Shift auf 50 kDa als Zeichen der VASP-Phosphorylierung an Serin 157 an. Der 16C2-AK detektierte in meinen Experimenten nur eine Bande als Zeichen einer VASP-Phosphorylierung an Serin 239. Smolenski et al. beschreiben jedoch teilweise auch das Auftreten von Doppelbanden (Smolenski et al., 1998).

Das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP erreicht nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten durch eingesetzte Konzentrationen von 100 bis 1000 μ M eine maximale Bandenschwärzung (siehe Abb. 5-9 und 5-10). Die stärkste Phosphorylierung wird in meinen Experimenten also durch teilweise grössere Konzentrations-Unterschiede von 8-pCPT-cGMP erreicht. Auch hier stellen sich für die VASP-Phosphorylierung an Serin 239 durch den 16C2-AK in einigen Experimenten Doppelbanden bei 46 und 50 kDa dar.

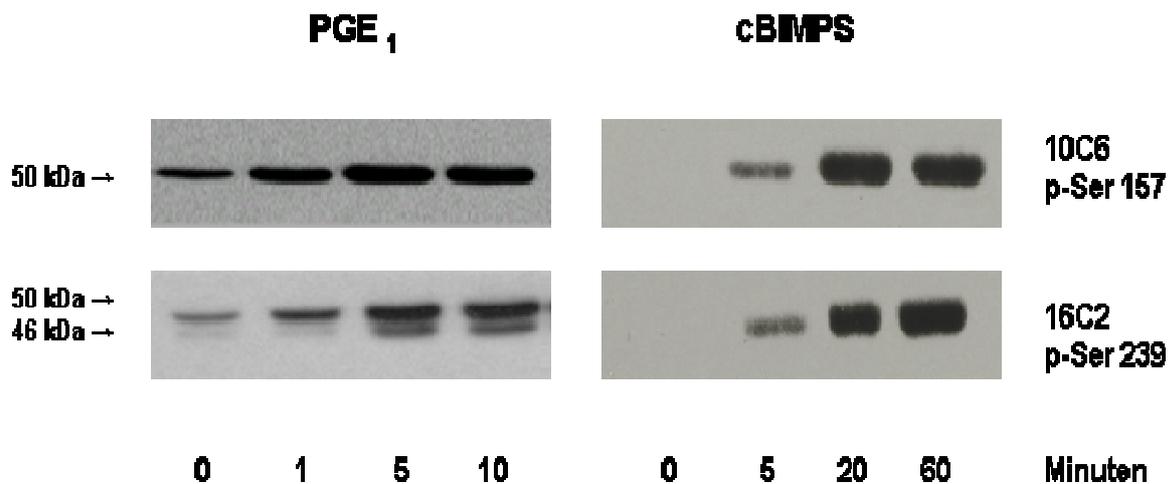


Abbildung 5-7: Untersuchung der VASP-Phosphorylierung durch PGE₁ und cBIMPS zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten durch die Antikörper 10C6 und 16C2. Dargestellt sind die Ausprägung der Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Vor der Stimulation (Zeitpunkt 0 min) und nach 1, 5 und 10 min Inkubation (ohne Rühren) mit PGE₁ (100 nM) bzw. 5, 20 und 60 min mit cBIMPS (100 μM) wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den AK 10C6 und 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen (jeweils n= 3).

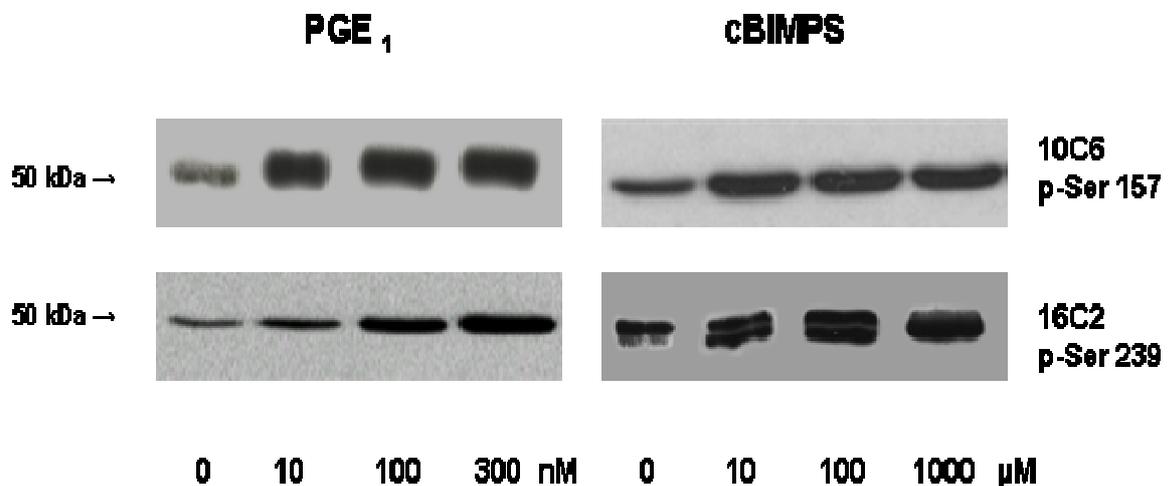


Abbildung 5-8: Untersuchung der konzentrationsabhängigen VASP-Phosphorylierung durch PGE₁ und cBIMPS durch die VASP-Antikörper 10C6 und 16C2. Dargestellt sind die Ausprägung der Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch verschiedene Konzentrationen von PGE₁ und cBIMPS. Nach Inkubation (ohne Rühren) mit 10, 100 und 300 nM PGE₁ (5 min) oder 10, 100 und 1000 μM cBIMPS (20 min) wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS unterbrochen. Als Kontrolle diente eine unstimulierte Tz-Probe. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den AK 10C6 und 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen (jeweils n= 3).

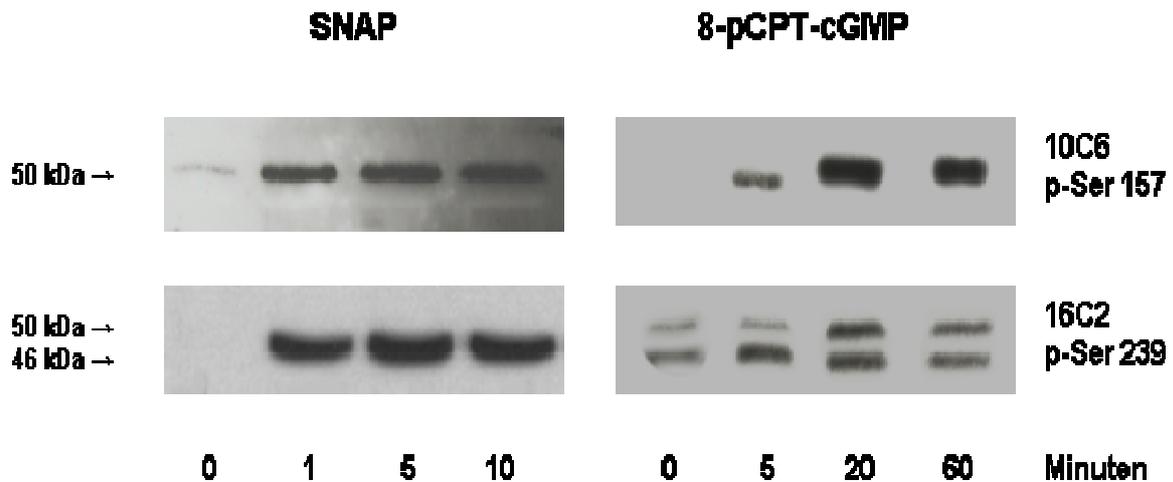


Abbildung 5-9: Untersuchung der VASP-Phosphorylierung durch SNAP und 8-pCPT-cGMP zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten durch die Antikörper 10C6 und 16C2. Dargestellt sind die Ausprägung der Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Vor der Stimulation (Zeitpunkt 0 min) und nach 1, 5 und 10 min Inkubation (ohne Rühren) mit SNAP (10 μ M) bzw. 5, 20 und 60 min mit 8-pCPT-cGMP (2 mM) wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den AK 10C6 und 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen (jeweils n= 3).

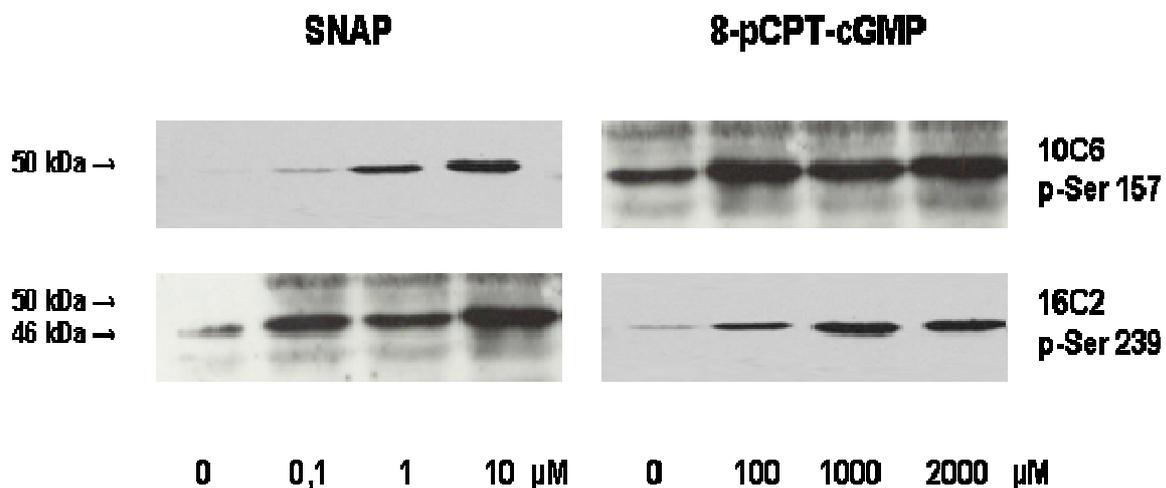
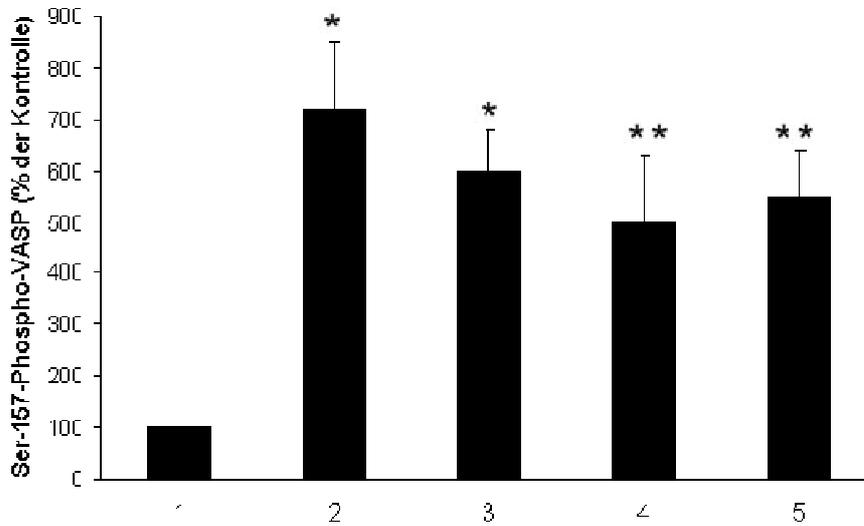


Abbildung 5-10: Untersuchung der konzentrationsabhängigen VASP-Phosphorylierung durch SNAP und 8-pCPT-cGMP durch die Antikörper 10C6 und 16C2. Dargestellt sind die Ausprägung der Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch verschiedene Konzentrationen von SNAP und 8-pCPT-cGMP. Nach Inkubation (ohne Rühren) mit 0,1, 1 und 10 μ M SNAP (5 min) oder 100, 1000 und 2000 μ M 8-pCPT-cGMP (20 min) wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS unterbrochen. Als Kontrolle diente eine unstimulierte Tz-Probe. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den AK 10C6 und 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen (jeweils n= 3).

Quantitative Phosphorylierung an Serin 157



Quantitative Phosphorylierung an Serin 239

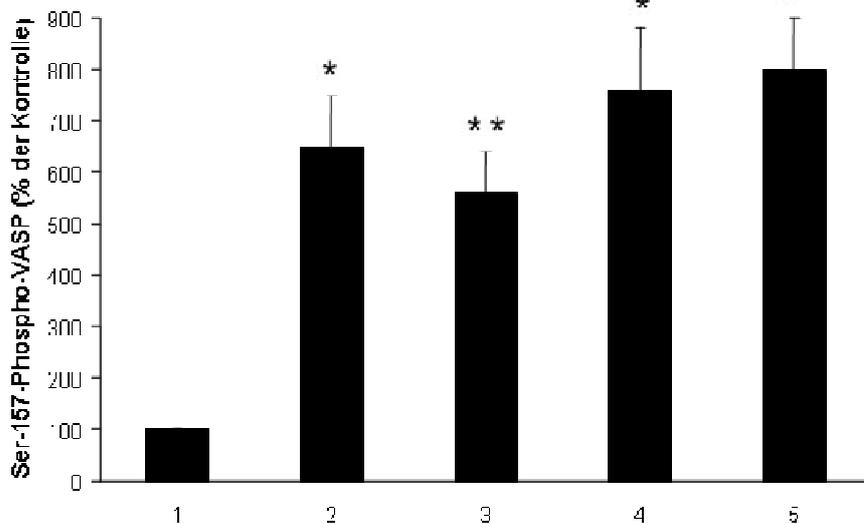


Abbildung 5-11: Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch PGE₁, cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der densitometrisch erfassbaren Bandenschwärzungen. Gemessen wurde die Absorption der spezifischen Bande in Bezug zur Kontrolle (Puffer; Bahn 1). Eine Inkubation erfolgte mit PGE₁ (100 nM, 5 min, Bahn 2), cBIMPS (100 μM, 20 min, Bahn 3), SNAP (10 μM, 5 min, Bahn 4) und 8-pCPT-cGMP (2 mM, 20 min, Bahn 5). Die VASP-Phosphorylierung an Position Serin 157 wurde mit dem AK 10C6 und an Serin 239 mit dem AK 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± SD (jeweils n= 3). * p < 0,01, ** p < 0,05 für Kontrolle vs eingesetzter Substanz.

5.2 Untersuchungen zum *shape change* von VASP ^{+/+}- und VASP ^{-/-}-Mausthrombozyten und Hemmwirkung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen

Nach Etablierung der Methode zur Präparation und der Messung des *shape change* gewaschener muriner Thrombozyten wurde die Thrombozytenantwort von VASP-Wildtyp- und VASP-*Knockout*-Mäusen verglichen.

5.2.1 Induktion von *shape change* durch ADP und U46619 bei VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Thrombozyten

ADP und das Thromboxan A₂-Analogon U46619 induzierten in gewaschenen Mäuse-Thrombozyten einen Formwandel. Nach Zugabe dieser Agonisten bildete sich sowohl bei Tz von VASP ^{+/+} - als auch VASP ^{-/-} -Mäusen umgehend ein Formwandel aus. Ein Unterschied in der Kinetik des *shape change* war nicht festzustellen (Abb. 5-12).

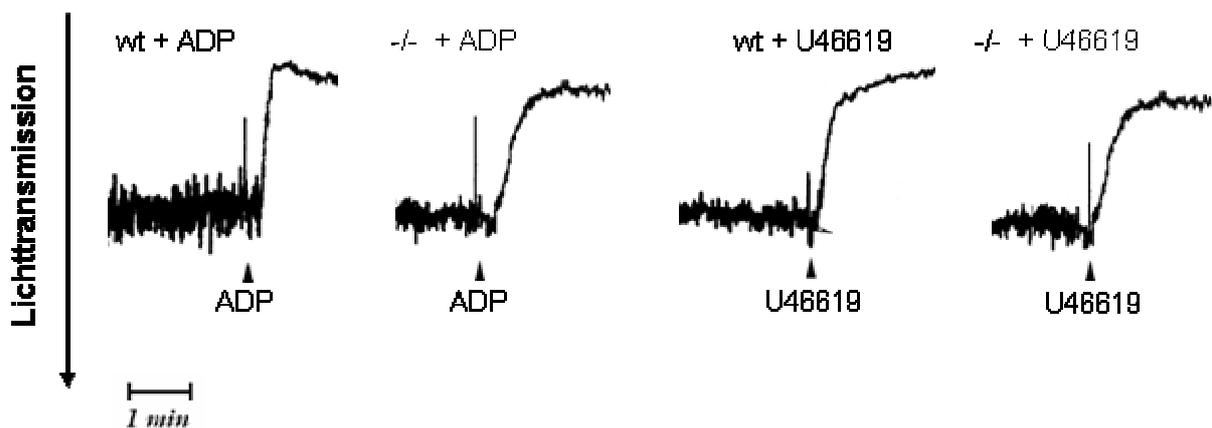


Abbildung 5-12: Induktion von *shape change* durch ADP oder U46619 von VASP ^{+/+}- und VASP ^{-/-}-Maus-Tz. Suspensionen von gewaschenen Maus-Tz wurden mit ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) versetzt (jeweils n= 10).

ADP induzierte ab einer Konzentration von 50 nM den Formwandel. Der maximale *shape change* wurde sowohl in VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz bei einer Konzentration von im Mittel 250 nM (= 0,25 µM) erreicht. Durch ADP konnte ein maximaler *shape change* (also Abnahme der Lichttransmission) von 22 mm für VASP^{+/+}-Tz und von 21 mm für VASP^{-/-}-Tz gemessen werden und diese Werte wurden als 100%-Werte gesetzt. Der EC₅₀ Wert lag bei 100 nM (Abb. 5-13).

Der *shape change* wurde durch das Thromboxan A₂-Analogon U46619 in Mäuse-Thrombozyten ab einer Konzentration von 2,5 nM induziert. Der maximale *shape change* wurde im Mittel in VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz bei einer Konzentration von 25-50 nM erreicht. Durch U46619 konnte ein maximaler *shape change* von 24 mm für VASP^{+/+}-Tz und 25 mm für VASP^{-/-}-Tz gemessen werden und diese Werte wurden als 100%-Werte gesetzt. Der EC₅₀ Wert lag bei 10 nM. (Vgl. Abb. 5-12 und 5-14). Die EC₅₀-Werte für U46619 lagen damit um den Faktor 10 niedriger als die EC₅₀-Werte für ADP.

Zusammenfassend zeigte sich im Vergleich zu den bereits aufgeführten Ergebnissen mit ADP und U46619 sowohl bei Human- als auch Mäusethrombozyten (VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}) eine umgehende Ausbildung des thrombozytären *shape change*. Die EC₅₀-Werte nach Stimulation mit ADP sind bei Human-Tz um den Faktor 1,3 über den Werten der Mäuse-Tz. Für U46619 lagen die EC₅₀-Werte bei Human-Tz dagegen um den Faktor 0,5 unter den Werten für Mäuse-Tz.

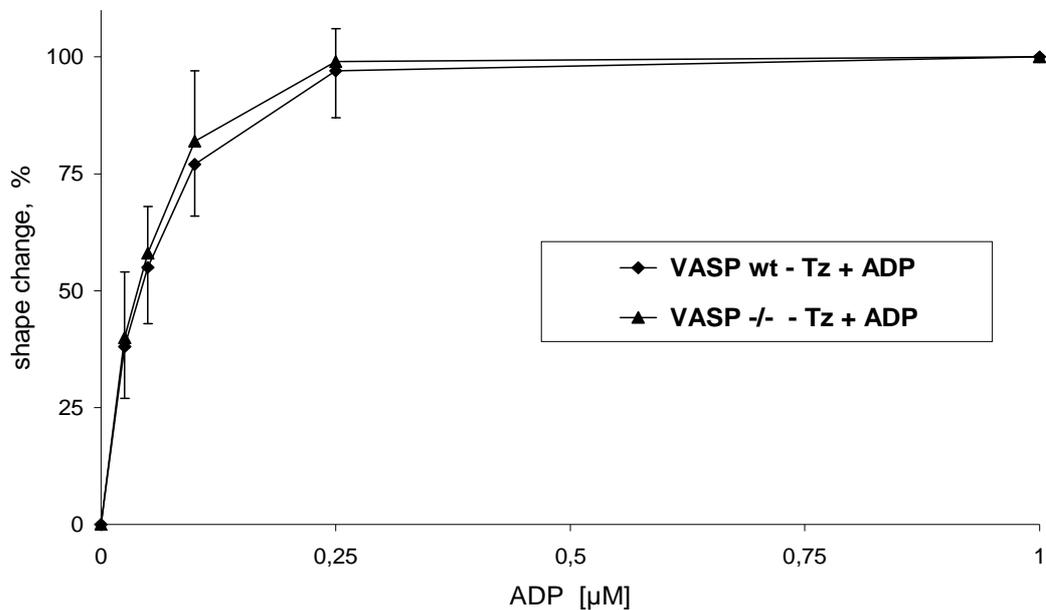


Abbildung 5-13: Konzentrationsabhängige Induktion des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch ADP. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit Puffer als Kontrolle oder verschiedenen Konzentrationen von ADP (0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 1,0 μM) versetzt. *Shape change* wurde als Abnahme der Lichttransmission gemessen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 10).

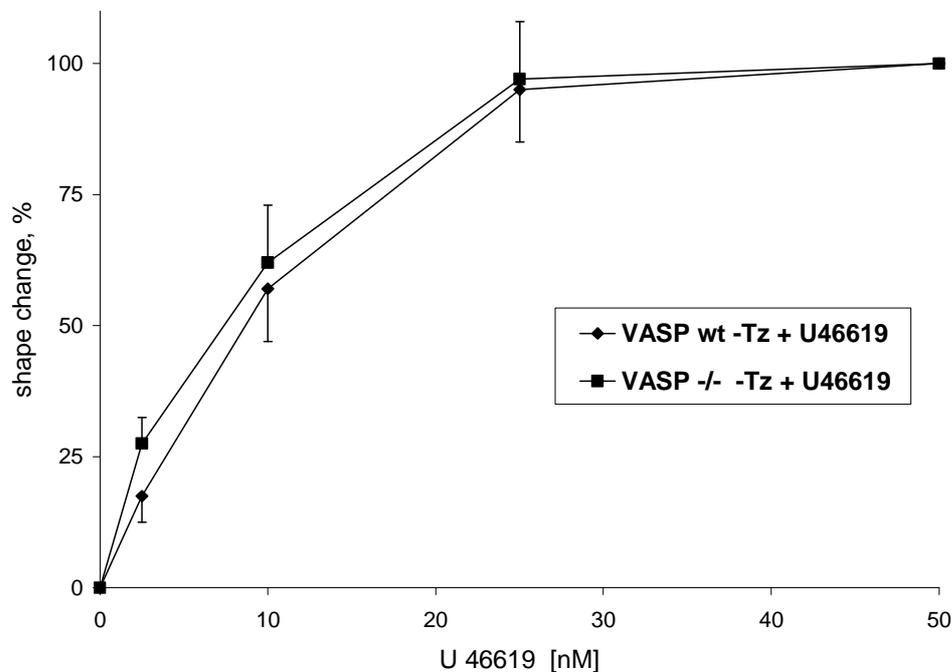


Abbildung 5-14: Konzentrationsabhängige Induktion des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden in einer Küvette entweder mit Puffer als Kontrolle oder verschiedenen Konzentrationen von U46619 (2,5; 10; 25; 50 nM) versetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 10).

5.2.2 Untersuchungen zur Hemmung des *shape change* durch cAMP-erhöhende Substanzen

Nach Untersuchungen zur Aktivierbarkeit von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz wurden nun spezifische Ansätze zur Hemmung des *shape change* experimentell untersucht. Die gewaschenen Tz wurden mit cAMP-erhöhenden Substanzen vorinkubiert und dann nach Zugabe der zuvor getesteten Agonisten ADP und U46619 deren Hemmwirkung auf den *shape change* dokumentiert. Es fand erneut ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp- und VASP^{-/-}-*Knockout*-Tz statt. Als Substanzen zur Erhöhung der Konzentration von cAMP wurden Prostaglandin E₁ und Sp-5,6-DCI- cBIMPS verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass PGE₁ und cBIMPS den sowohl durch ADP als auch U46619 induzierten Gestaltwandel bei VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz vollständig hemmen (siehe Abb. 5-15 und 5-18). Der IC₅₀ Wert für PGE₁ lag nach Stimulation mit ADP (siehe Abb. 5-16) von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten bei 10 ± 4,8 bzw. 13 ± 6 nM und nach Stimulation mit U46619 (siehe Abb. 5-17) von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten bei 10 ± 5,6 bzw. 11 ± 4 nM. Für cBIMPS konnte gezeigt werden, dass der IC₅₀ Wert nach ADP Stimulation (siehe Abb. 5-19) von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten bei 13 ± 3 bzw. 9 ± 3 µM, und nach U46619 Stimulation (siehe Abb. 5-20) von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten bei 11 ± 3 bzw. 14 ± 4 µM lag.

Als Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist festzuhalten, dass der *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten gleichermaßen durch cAMP-erhöhende Substanzen gehemmt wurde. Da also der *shape change* auch bei den VASP^{-/-}-Thrombozyten nach Inkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen komplett gehemmt werden konnte, kann die VASP-Phosphorylierung nicht die hemmende Wirkung von cAMP auf den *shape change* vermitteln.

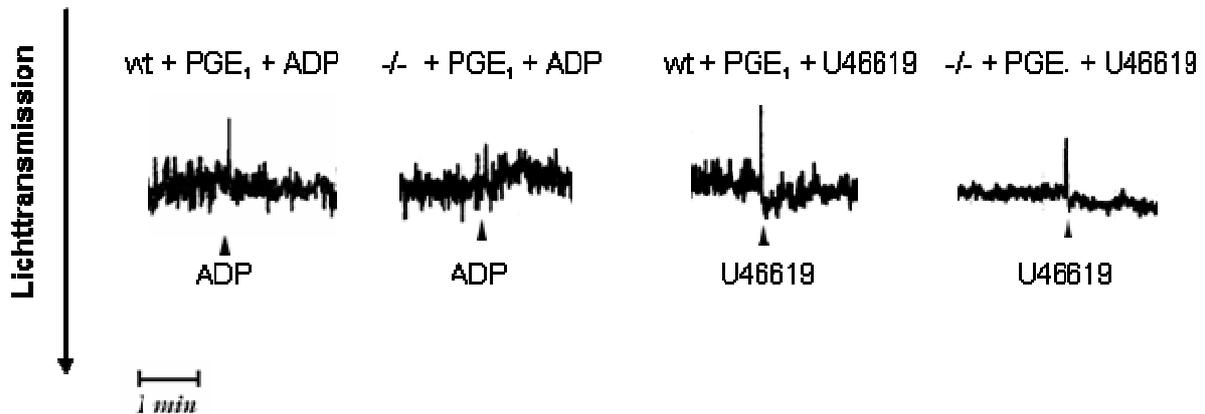


Abbildung 5-15: Hemmung des *shape change* durch PGE₁ nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit PGE₁ (100 nM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) zugegeben. PGE₁ hemmte komplett den *shape change* (jeweils n= 5).

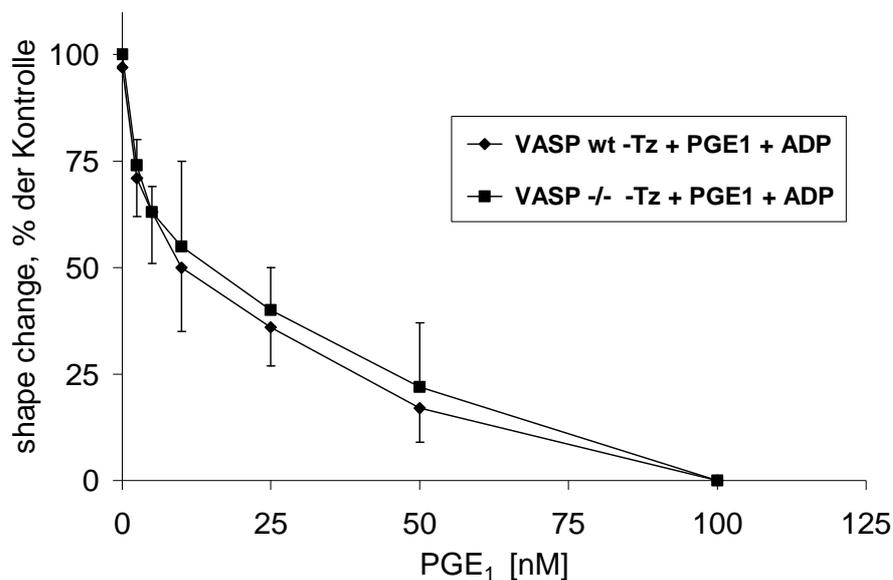


Abbildung 5-16: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch PGE₁ nach Stimulation mit ADP. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit PGE₁ in verschiedenen Konzentrationen (2,5; 5; 10; 25; 50 und 100 nM) versetzt oder mit Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 µM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5).

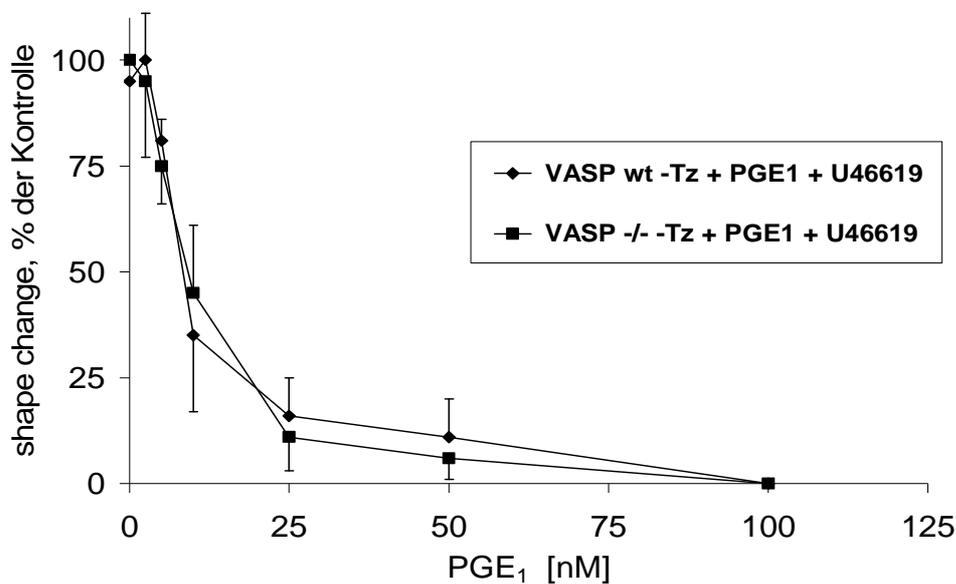


Abbildung 5-17: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch PGE₁ nach Stimulation mit U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit PGE₁ in verschiedenen Konzentrationen (2,5; 5; 10; 25; 50 und 100 nM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5).

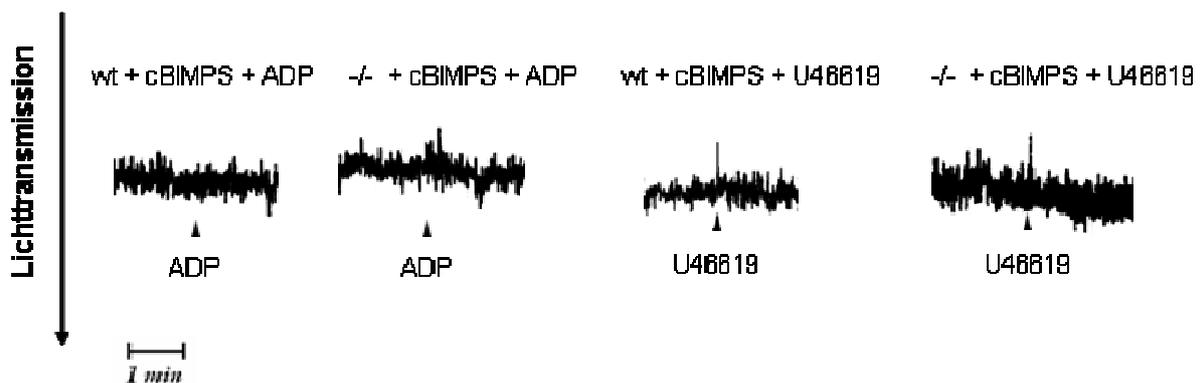


Abbildung 5-18: Hemmung des *shape change* durch cBIMPS nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden in einer Küvette mit cBIMPS (100 µM) für jeweils 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) zugegeben. cBIMPS hemmte komplett den *shape change* (jeweils n= 5).

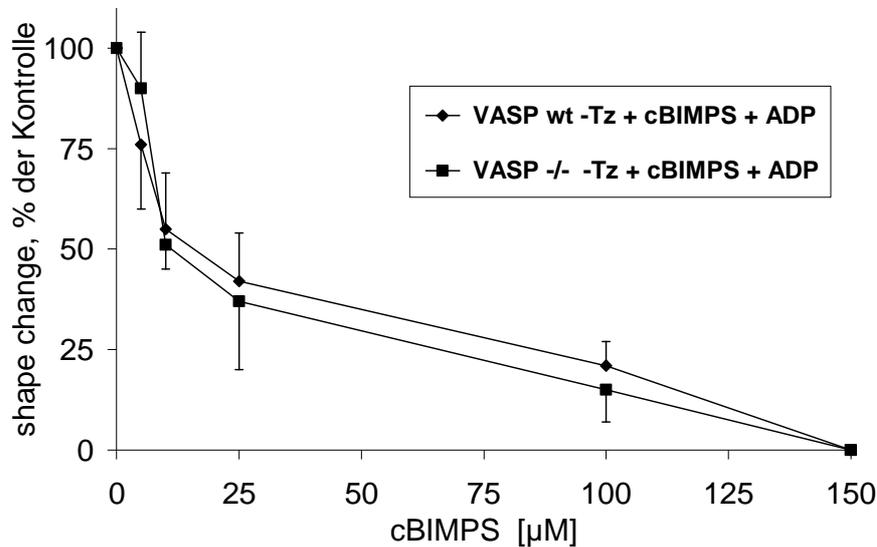


Abbildung 5-19: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch cBIMPS nach Stimulation mit ADP. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit cBIMPS in verschiedenen Konzentrationen (5; 10; 25; 100 und 150 µM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 µM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5).

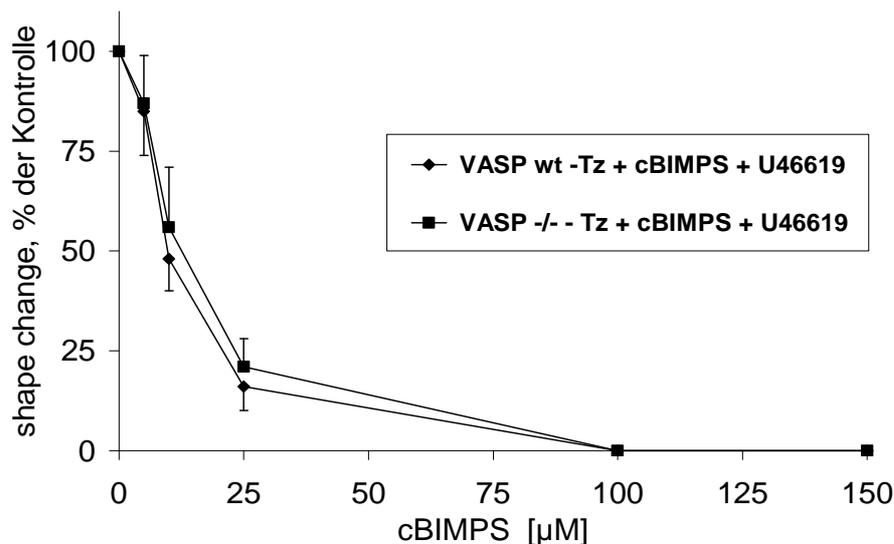


Abbildung 5-20: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz durch cBIMPS nach Stimulation mit U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit cBIMPS in verschiedenen Konzentrationen (5; 10; 25; 100 und 150 µM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5).

5.2.3 Untersuchungen zur Hemmung des *shape change* durch cGMP-erhöhende Substanzen

Wie bei den oben durchgeführten Experimenten folgte die Untersuchung der möglichen Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz durch cGMP-erhöhende Substanzen. Die gewaschenen Tz wurden daher mit cGMP-erhöhenden Substanzen vorinkubiert und dann nach Zugabe von ADP und U46619 deren Hemmwirkung auf den *shape change* analysiert. Als Substanzen zur Erhöhung der Konzentration von cGMP wurden der NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (=SNAP) und 8-pCPT-cGMP verwendet.

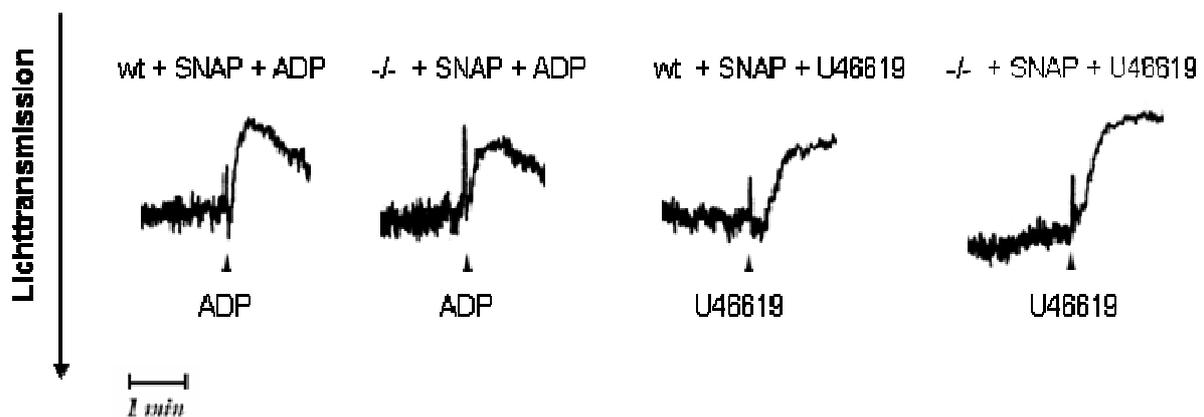


Abbildung 5-21: Wirkung von SNAP auf den *shape change* nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden in einer Küvette entweder mit SNAP (10 µM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) der Agonist ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) zugegeben. Durch SNAP konnte keine signifikante Hemmung des *shape change* erzielt werden (jeweils n= 5).

Wie aus den *shape change* Kurven in Abbildung 5-21 und 5-24 ersichtlich, war der durch ADP oder U46619 induzierte *shape change* durch SNAP und 8-pCPT-cGMP nicht hemmbar.

Durch SNAP und 8-pCPT-cGMP konnte also, trotz maximal eingesetzter Konzentrationen, der durch ADP (siehe Abb. 5-21, 5-22, 5-24 und 5-25) als auch U46619 (siehe Abb. 5-21, 5-23 und 5-26) induzierte Formwandel bei VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz nicht signifikant gehemmt werden und ein Unterschied zwischen den VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Tz war hierbei nicht festzustellen (siehe Abb. 5-22, 5-23).

Da durch das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP keine Hemmung des *shape change* in VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz und auch in Human-Tz messbar war, liegt die Vermutung nahe, dass das Protein VASP auf den *shape change* von humanen und murinen Thrombozyten keinen negativen Einfluss besitzt. Im Gegensatz hierzu konnte durch den NO-Donor SNAP in den Human-Tz der *shape change* komplett gehemmt werden, bemerkenswerterweise aber nicht in den Mäusethrombozyten von VASP ^{+/+} und VASP ^{-/-} .

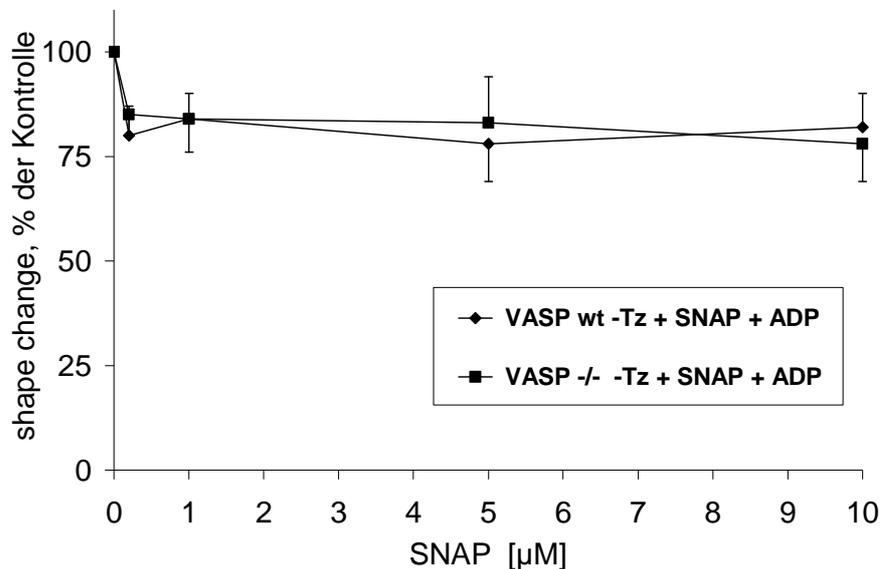


Abbildung 5-22: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch SNAP nach Stimulation mit ADP. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit SNAP in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 1; 5 und 10 µM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 µM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5). SNAP zeigte nach Aktivierung durch ADP weder bei VASP ^{+/+} - noch bei VASP ^{-/-} -Maus-Tz eine statistisch signifikante Hemmung des *shape change*.

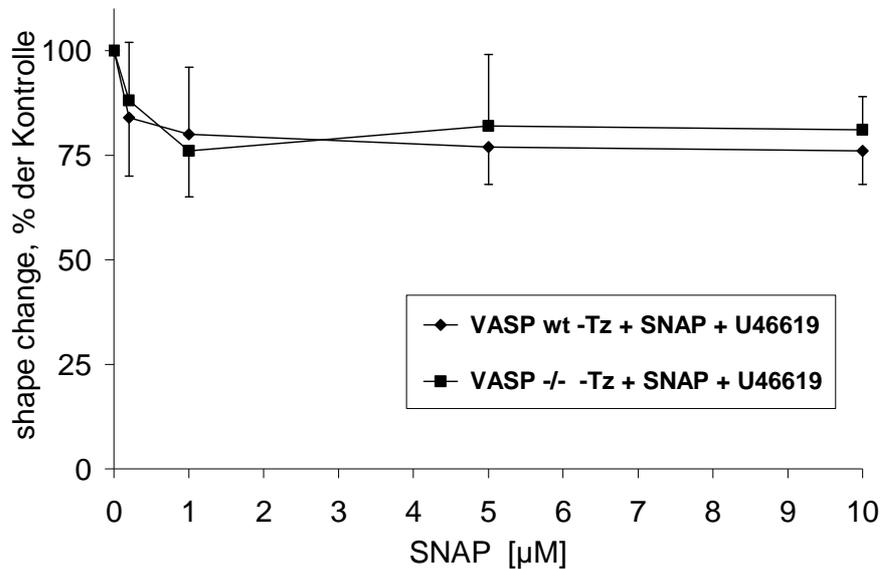


Abbildung 5-23: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch SNAP nach Stimulation mit U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit SNAP in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 1; 5 und 10 µM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n= 5). SNAP zeigte nach Aktivierung durch U46619 weder bei VASP^{+/+}- noch bei VASP^{-/-}-Maus-Tz eine statistisch signifikante Hemmung des *shape change*.

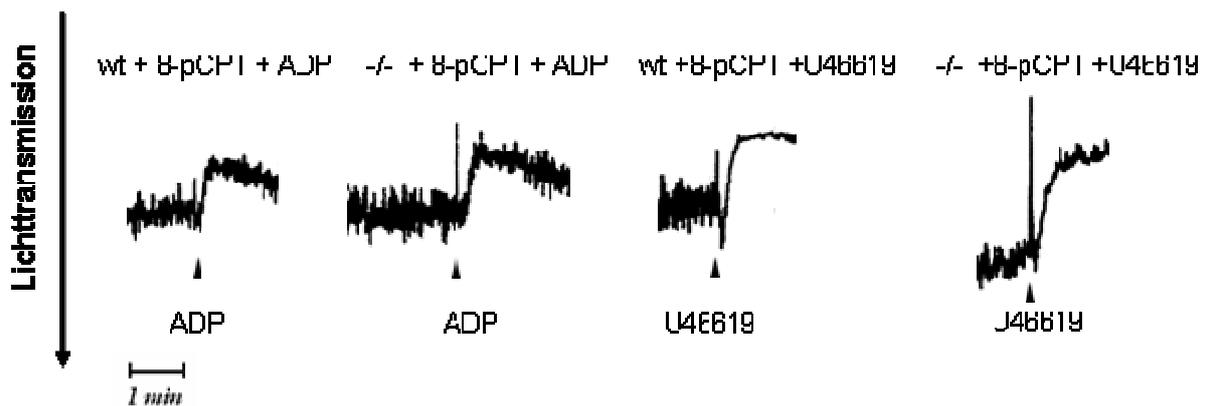


Abbildung 5-24: Wirkung von 8-pCPT- cGMP auf den *shape change* nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden in einer Küvette entweder mit 8-pCPT- cGMP (2 mM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde unter Rühren (1100 rpm) der Agonist ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) zugegeben. Durch 8-pCPT-cGMP konnte keine signifikante Hemmung des *shape change* erzielt werden (jeweils n= 5).

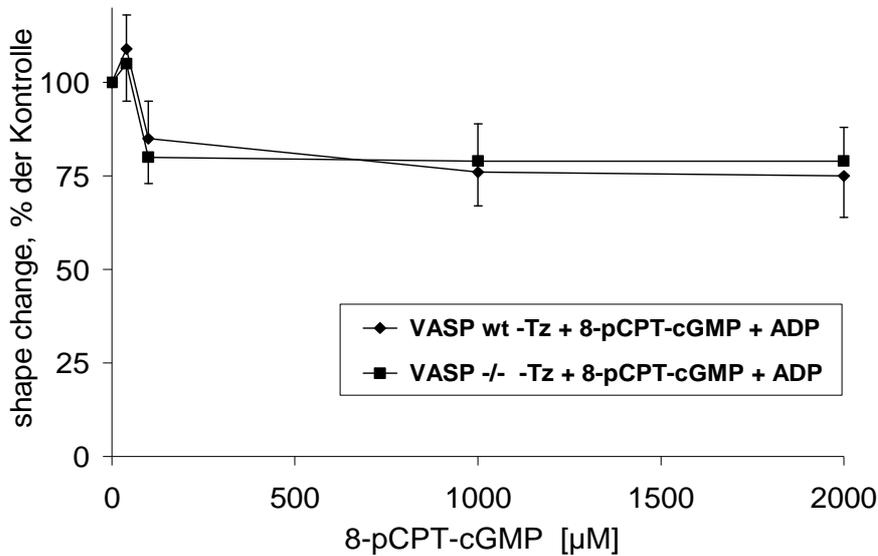


Abbildung 5-25: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch 8-pCPT- cGMP nach Stimulation mit ADP. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit 8-pCPT- cGMP in verschiedenen Konzentrationen (50; 100; 1000 und 2000 μM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit ADP (0,25 μM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n= 5). 8-pCPT-cGMP zeigte nach Aktivierung durch ADP bei VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz keine statistisch signifikante Hemmung des *shape change*.

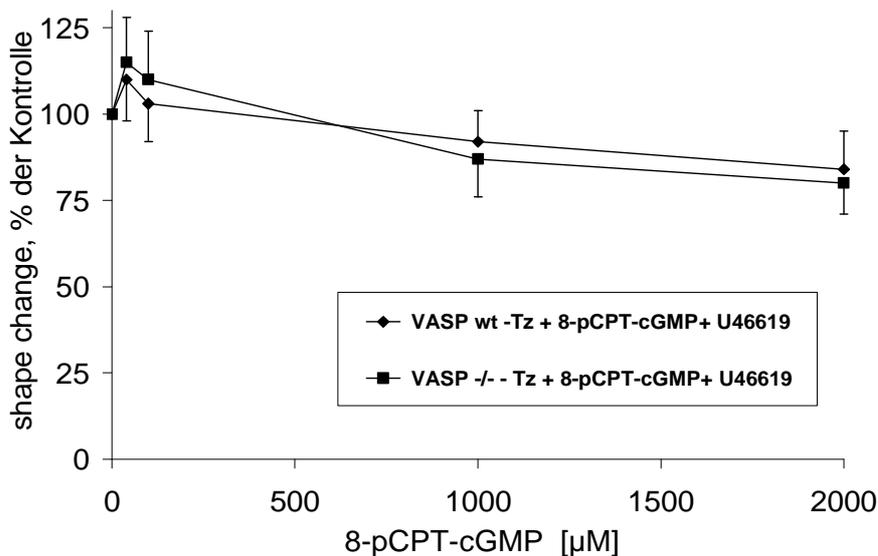


Abbildung 5-26: Konzentrationsabhängige Hemmung des *shape change* von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch 8-pCPT- cGMP nach Stimulation mit U46619. Suspensionen von gewaschenen Tz wurden entweder mit 8-pCPT- cGMP in verschiedenen Konzentrationen (50; 100; 1000 und 2000 μM) oder mit dem Puffer als Kontrolle für jeweils 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und dann mit U46619 (50 nM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n= 5). 8-pCPT-cGMP zeigte nach Aktivierung durch U46619 bei VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz keine statistisch signifikante Hemmung des *shape change*.

5.2.4 VASP Phosphorylierung der wt - Mausthrombozyten durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen

Wie bei den an Humanthrombozyten durchgeführten Phosphorylierungsexperimenten (siehe Punkt 5.1.4) wurden jeweils Aliquots zur Bestimmung der VASP- Phosphorylierung entnommen. Die Phosphorylierungsmuster durch cAMP- und cGMP- erhöhende Substanzen, nachgewiesen durch die monoklonalen Antikörper 10C6, 16C2 und den polyklonalen Antikörper M4, sind in der Abb. 5-27 dargestellt. Bezüglich des in der Literatur beschriebenen Nachweises der VASP- Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch die Antikörper vgl. die Ausführungen unter Punkt 5.1.4.

In Abbildung 5-27 sieht man zunächst, dass die VASP^{-/-} -Tz Kontrolle bei nicht vorhandenem VASP-Protein erwartungsgemäss keine Bandenschwärzung anzeigt. Daneben ist die VASP-Phosphorylierung einer VASP^{+/+} -Tz-Kontrolle dargestellt. Der 10C6-AK zeigt hier in der unstimulierten Probe bereits eine Bande bei 46 kDa an. Dies zeigt bereits eine geringe VASP-Phosphorylierung der Tz an. Diese Bande war jedoch nicht in allen meinen Experimenten nachweisbar. Das gleiche gilt für die Bande durch den 16C2-AK. Auch hier war nicht immer eine Bande bei unstimulierten Tz nachweisbar. Die durch den M4-AK nachweisbare Bande bei 46 kDa detektiert unphosphoryliertes VASP. Diese Ergebnisse decken sich auch mit der Literatur (Smolenski et al., 1998; Eigenthaler et al., 1992).

Die VASP-Phosphorylierung mit PGE₁ zeigt beim 10C6-AK eine deutliche Bandenschwärzung und Ausbildung eines Shift auf 50 kDa (laut Literatur durch eine Phosphorylierung an Serin 157 bedingt, Smolenski et al., 1998). Der 16C2-AK zeigt hier eine Doppelbande (laut Literatur Nachweis einer Phosphorylierung an Serin 239 an beiden Banden). Der polykonale M4-AK bildet ebenfalls eine Doppelbande aus, wobei hier nur die Bande bei 50 kDa das phosphorylierte VASP und die Bande bei 46 kDa das unphosphorylierte VASP anzeigt. Vergleichbare Ergebnisse stellen sich auch durch die Phosphorylierung mit cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP dar.

Zusammenfassend ist die durch den 10C6-AK dargestellte Phosphorylierung durch PGE₁ und cBIMPS etwas ausgeprägter als durch SNAP und 8-pCPT-cGMP (siehe hierzu auch die densitometrischen Auswertungen in Abb. 5-28). Dieses

Phosphorylierungsmuster entspricht auch dem in der Literatur genannten (Smolenski et al., 1998). Bezüglich der durch den 16C2-AK angezeigten Phosphorylierung stellte sich in meinen Experimenten insgesamt eine etwas verstärkte Phosphorylierung durch SNAP und 8-pCPT-cGMP im Vergleich zu PGE₁ und cBIMPS dar. Im hier gezeigten Blot des 16C2-AK sind die Bandenschwärzungen allerdings insgesamt jedoch nahezu gleichstark ausgeprägt.

VASP- Phosphorylierung bei Mäuse- Tz

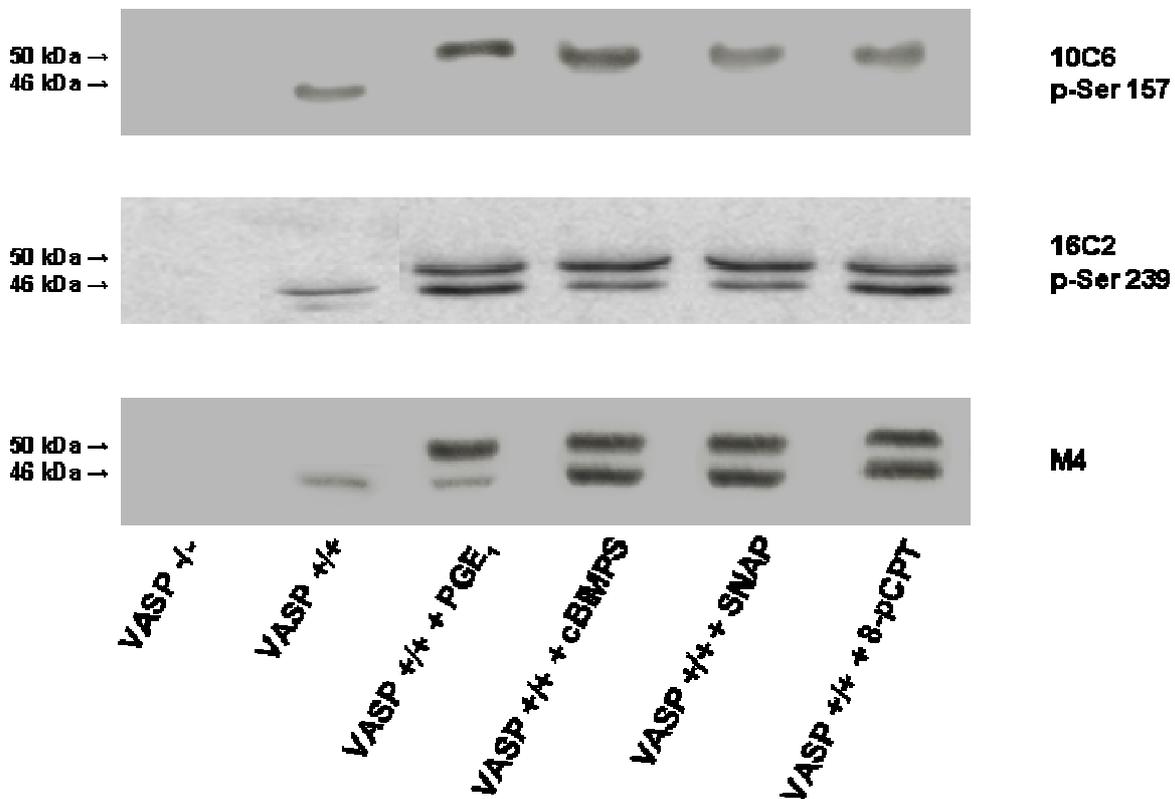
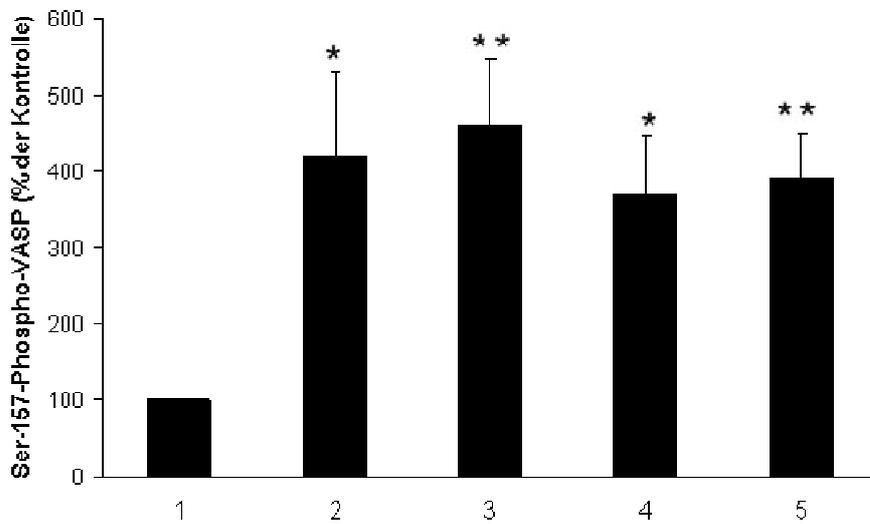


Abbildung 5-27: Untersuchung der VASP-Phosphorylierung der VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz durch PGE₁, cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP durch die Antikörper 10C6, 16C2 und M4. Dargestellt sind die Ausprägung der Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 nach Inkubation (ohne Rühren) mit PGE₁ (100 nM, 5 min), cBIMPS (100 µM, 20 min), SNAP (10 µM, 5 min) und 8-pCPT-cGMP (2 mM, 20 min). Als Kontrolle dienen unstimulierte Thrombozyten. Aufgetragen sind die Ergebnisse für VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Tz. Zu den beschriebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den AK 10C6, 16C2 und M4 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen (jeweils n= 3).

Phosphorylierung an Serin 157 von VASP^{+/+}



Phosphorylierung an Serin 239 von VASP^{+/+}

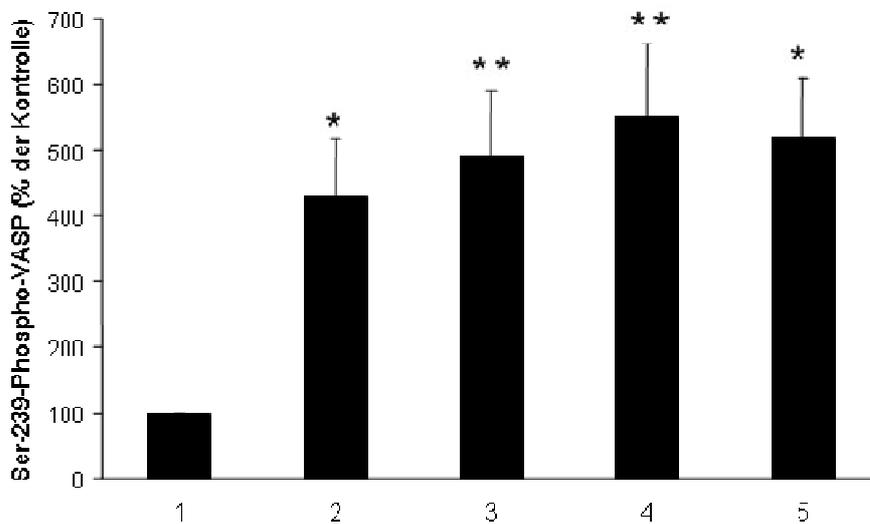


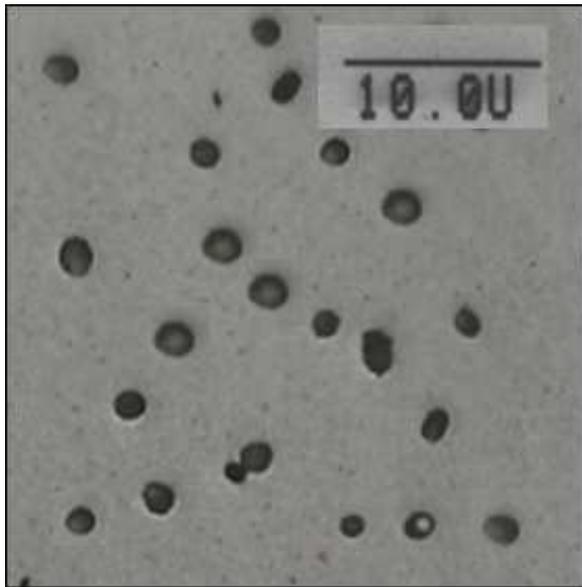
Abbildung 5-28: Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung von VASP^{+/+}-Maus-Tz an Serin 157 und Serin 239 durch PGE₁, cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der densitometrisch erfassbaren Bandenschwärzungen. Gemessen wurde die Absorption der spezifischen Bande in Bezug zur Kontrolle (Puffer; Bahn 1). Eine Inkubation erfolgte mit PGE₁ (100 nM, 5 min, Bahn 2), cBIMPS (100 μM, 20 min, Bahn 3), SNAP (10 μM, 5 min, Bahn 4) und 8-pCPT-cGMP (2 mM, 20 min, Bahn 5). Die VASP-Phosphorylierung an Position Serin 157 wurde mit dem AK 10C6 und an Serin 239 mit dem AK 16C2 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± SD (jeweils n= 3). * p < 0,001, ** p < 0,01 für Kontrolle vs eingesetzter Substanz.

5.3 Vergleichende Untersuchungen der Aktivierung von Thrombozyten bei VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Mäusen mittels Rasterelektronenmikroskopie

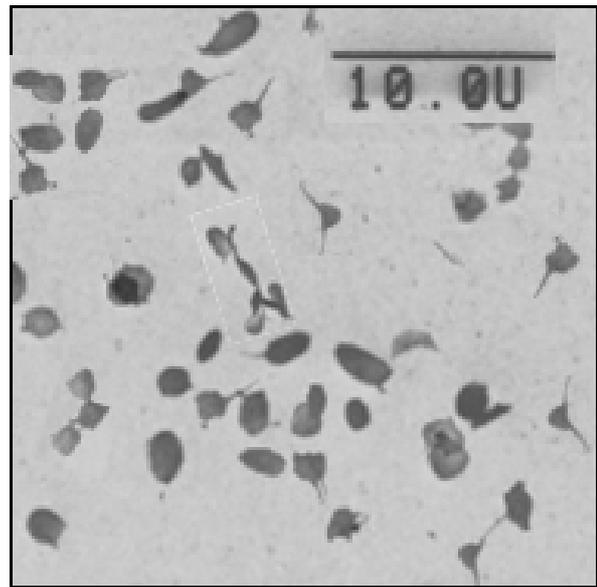
Der Thrombozyten *shape change* war in den bisher gezeigten Untersuchungen mittels Aggregometrie indirekt analysiert und quantifiziert worden. Da der Tz-Formwandel jedoch primär eine morphologische Veränderung der Thrombozyten darstellt, war es wichtig, bestimmte Ergebnisse anhand morphologischer Kriterien zu verifizieren. Es wurden daher Untersuchungen mit der Raster-Elektronenmikroskopie durchgeführt.

5.3.1 Nachweis des morphologischen Aktivierungsgrades stimulierter Thrombozyten nach Aktivierung durch ADP und U46619

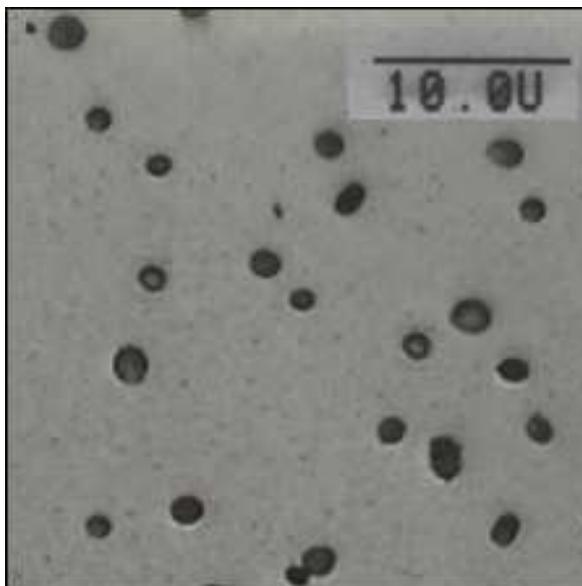
Der Vergleich von VASP ^{+/+} -Tz und VASP ^{-/-} -Tz zeigte nach Stimulation mit ADP oder U46619 keine morphologischen Unterschiede: der typische *shape change* mit unregelmäßiger Thrombozytenoberfläche und Ausbildung von Pseudopodien und Filopodien war gleichermaßen in VASP ^{+/+} -Tz und VASP ^{-/-} -Tz sichtbar (siehe Abb. 5-29 und Abb. 5-30). Dies entspricht den in der Aggregometrie erhobenen *shape change*-Kurven mit einer nahezu identischen Ausbildung des Formwandels bei den VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz.

VASP ^{+/+}

Tz- Kontrolle



Tz + ADP

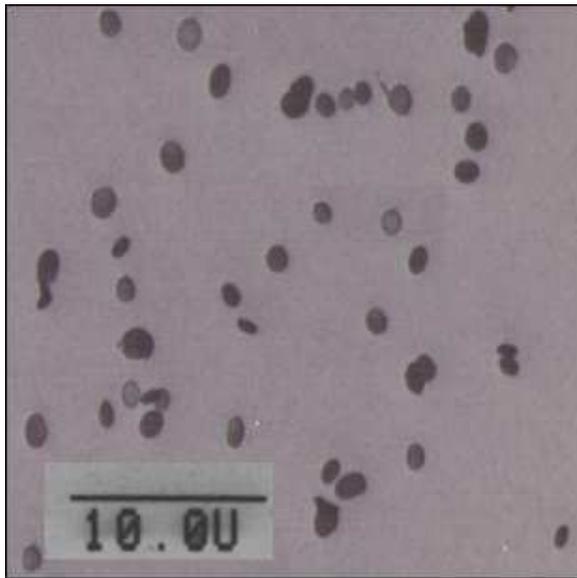
VASP ^{-/-}

Tz- Kontrolle

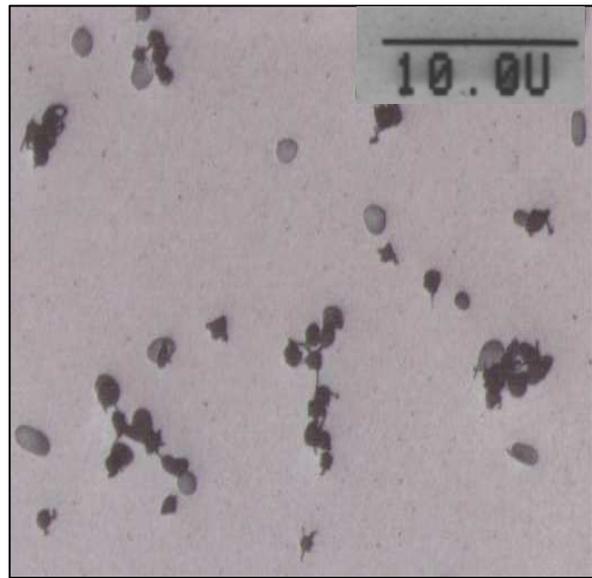


Tz + ADP

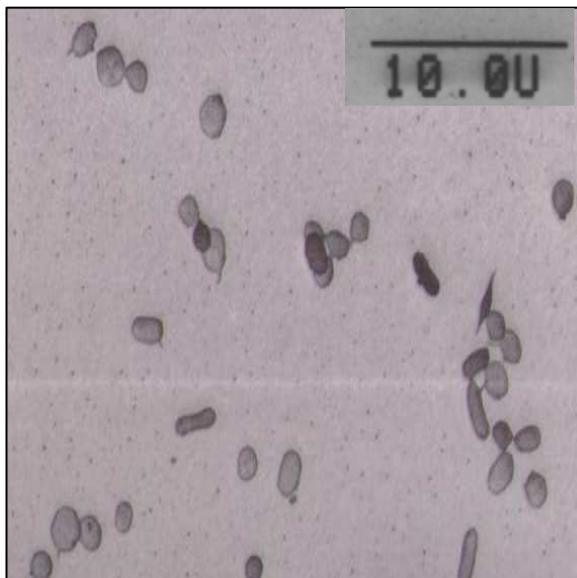
Abbildung 5-29: Untersuchung der Morphologie von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz mittels Raster-Elektronenmikroskopie nach Induktion des *shape change* durch ADP. Suspensionen von gewaschenen VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz wurden unter Rühren Proben als Kontrollen für nicht stimulierte Tz entnommen. Jeweils rechts im Bild sind Tz nach Zugabe des Agonisten ADP (0,25 μ M) dargestellt. Die aktivierten Formen der Tz mit teilweise Ausbildung des *shape change* und Pseudopodien sind dargestellt. 2000-fache Vergrößerung, Referenzmarke= 10 μ m.

VASP ^{+/+}

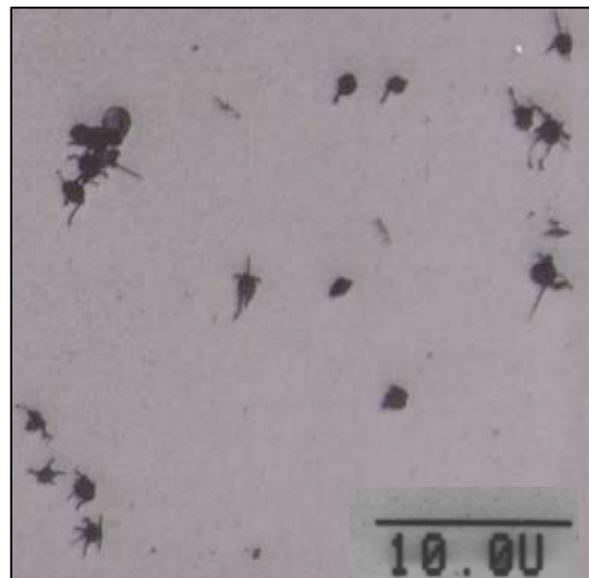
Tz- Kontrolle



Tz + U46619

VASP ^{-/-}

Tz- Kontrolle



Tz + U46619

Abbildung 5-30: Untersuchung der Morphologie von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz mittels Raster-Elektronenmikroskopie nach Induktion des *shape change* durch U46619. Suspensionen von gewaschenen VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz wurden unter Rühren Proben als Kontrollen für nicht stimulierte Tz entnommen. Jeweils rechts im Bild sind Tz nach Zugabe des Agonisten U46619 (50 nM) dargestellt. Die aktivierten Formen der Tz mit teilweise Ausbildung des *shape change* und Pseudopodien sind dargestellt. Rasterelektronenmikroskopie, 2000-fache Vergrößerung. Referenzmarke= 10 μm.

5.3.2 Morphologie der Thrombozyten nach Hemmung durch cAMP- und cGMP-erhöhende Substanzen

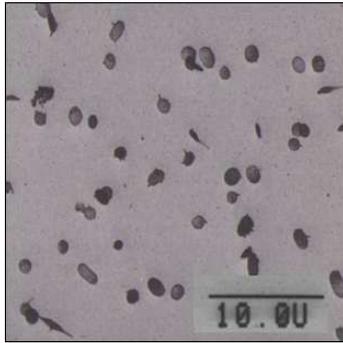
Nach Inkubation mit PGE₁ (100 nM, 5 min), cBIMPS (100 µM, 20 min), SNAP (10 µM, 5 min) und 8-pCPT-cGMP (2 mM, 20 min) wurden Aliquots entnommen und als Vergleichskontrollen gesetzt. Nach dann folgender Stimulation durch ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) wurden erneut Aliquots zum Vergleich der Morphologie und der Aktivierungsstufen von VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Tz entnommen. Hier zeigten sich im Vergleich zur Aggregometrie vergleichbare Ergebnisse. Durch Vorinkubation mit PGE₁ ließ sich eine morphologisch sichtbare Aktivierung (*shape change*, Pseudopodienbildung) der Tz nahezu verhindern. Auch war kein Unterschied zwischen VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Tz festzustellen. Ähnlich verhielt es sich nach Vorinkubation mit cBIMPS, was bei VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Tz den *shape change* ebenfalls hemmte (siehe Abb. 5-31). Diese Ergebnisse verifizieren die durch die Aggregometrie gewonnenen Daten einer vollständigen Hemmung des *shape change* nach Inkubation mit PGE₁ oder cBIMPS sowohl bei Humanthrombozyten als auch Mäusethrombozyten.

Für den NO-Donor SNAP und das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP konnte bei nahezu identischen Kurven sowohl durch VASP^{+/+} - als auch VASP^{-/-} -Mäuse-Tz in der Aggregometrie keine signifikante Hemmung des *shape change* beobachtet werden. In der Raster-Elektronenmikroskopie stellen sich bei den VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Mäuse-Tz bei beiden Inhibitoren signifikant vermehrt aktivierte Formen mit Ausbildung von Pseudopodien nach Aktivierung durch ADP oder U46619 dar (siehe Abb. 5-31).

Zusammenfassend liessen sich durch die Raster-Elektronenmikroskopie die durch die Aggregometrie erhobenen Ergebnisse der Aktivierung und Hemmung des *shape change* bei VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Mäuse-Tz bestätigen.

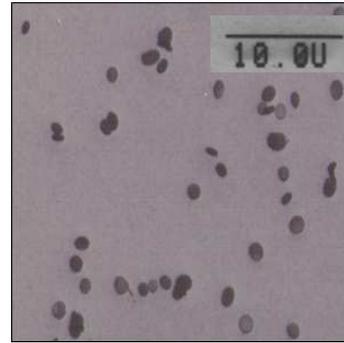
Abbildung 5-31: In der folgenden Abbildung ist ein Vergleich der Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie von VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} - Maus-Tz nach Inkubation mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen und Induktion des *shape change* dargestellt. Suspensionen von gewaschenen VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} -Maus-Tz wurden jeweils nach Inkubation mit PGE₁ (100 nM, 5 min), cBIMPS (100 µM, 20 min), SNAP (10 µM, 5 min) oder 8-pCPT-cGMP (2 mM, 20 min) Aliquots entnommen und als Vergleichskontrollen gesetzt. Nach jeweils Stimulation durch ADP (0,25 µM) oder U46619 (50 nM) wurden erneut Aliquots zum Vergleich der Tz-Morphologie und der Aktivierungsstufen entnommen. 2000-fache Vergrößerung. Referenzmarke= 10 µm.

VASP ^{+/+}

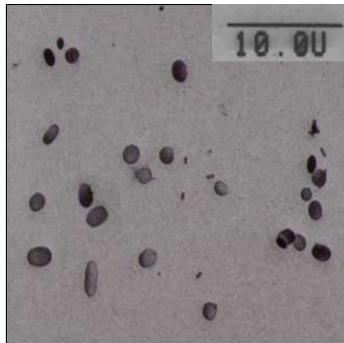


PGE₁ + ADP

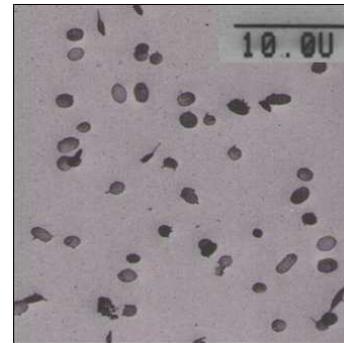
VASP ^{-/-}



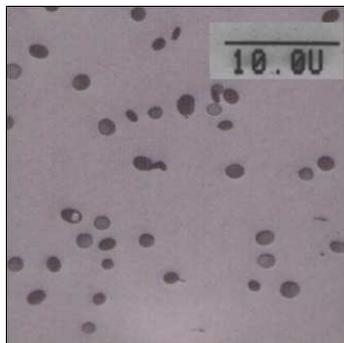
PGE₁ + ADP



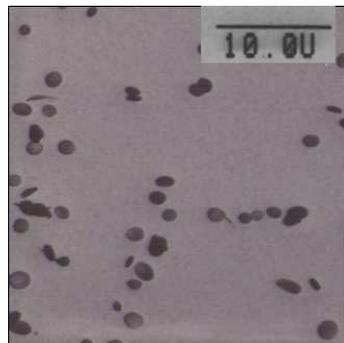
PGE₁ + U46619



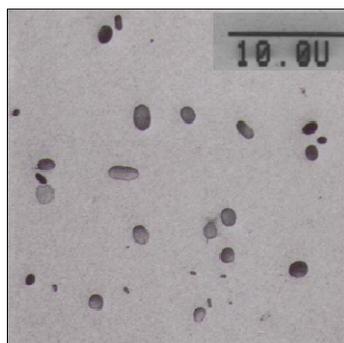
PGE₁ + U46619



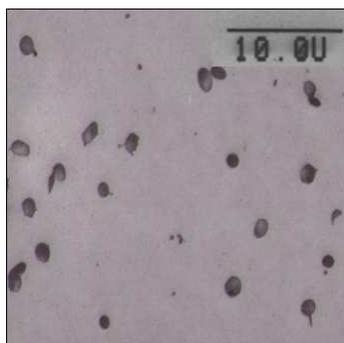
cBIMPS + ADP



cBIMPS + ADP

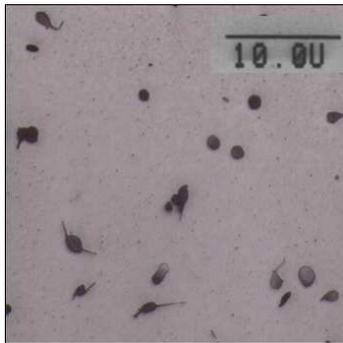


cBIMPS + U46619



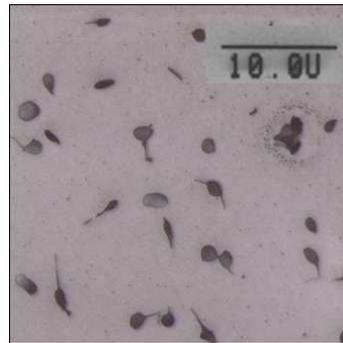
cBIMPS + U46619

VASP ^{+/+}

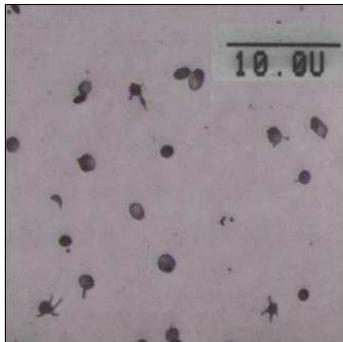


SNAP + ADP

VASP ^{-/-}



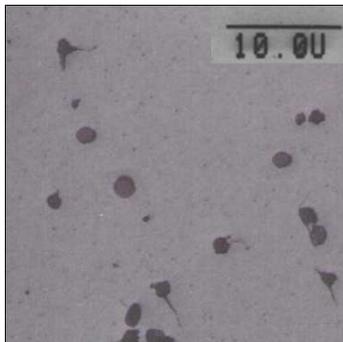
SNAP + ADP



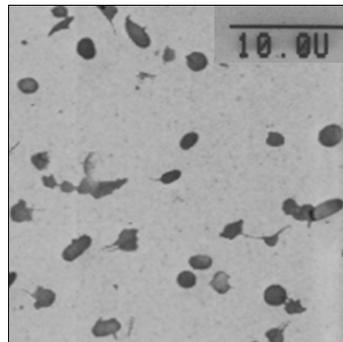
SNAP + U46619



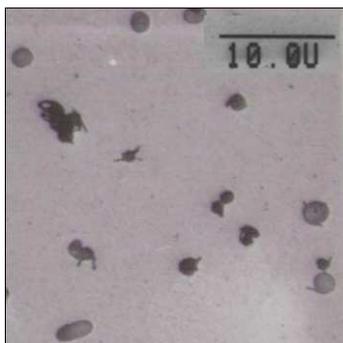
SNAP + U46619



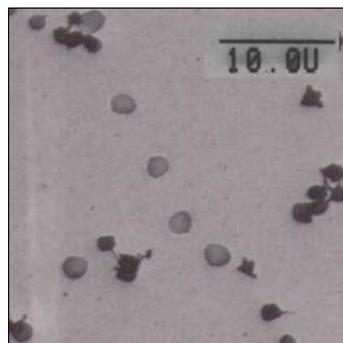
8-pCPT + ADP



8-pCPT + ADP



8-pCPT + U46619



8-pCPT + U46619

6 Diskussion

Der Aufrechterhaltung eines intakten Blutgefäßsystems kommt eine entscheidende Bedeutung für den menschlichen Organismus zu. Bei einer Störung des Gleichgewichtes kann es zur Entstehung von Thrombosen, Arteriosklerose und koronaren Herzerkrankungen kommen. Die Hemmung der Thrombozytenaktivität wird überwiegend über die Konzentration der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP sowie deren weitergeleitetes Signal auf Zielproteine vermittelt. Über die Phosphorylierung ihrer Substratproteine beeinflussen beide Kinasen die Regulation der Thrombozytenfunktion an unterschiedlichen Zielstrukturen (Schwarz et al., 2001; Münzel et al., 2003).

Halbrügge und Walter identifizierten 1989 das Protein VASP mit einer apparenten Molekularmasse von 46/50 kDa, das sowohl durch die cAK als auch die cGK phosphoryliert wird (Halbrügge and Walter, 1989). VASP wurde charakterisiert als wichtiges Substrat für die Proteinkinase A und die Proteinkinase G in humanen Thrombozyten (Waldmann et al., 1987). *In vitro* besitzt VASP nur eine geringe Aktin-Nukleations- und -Polymerisations-Aktivität, die durch die Zugabe des Aktin-bindenden Proteins Profilin erhöht wird (Walders-Harbeck et al., 2002). Da für den Formwandel von Thrombozyten eine Um- und Neuorganisation von Aktinfilamenten einschliesslich Filopodien und Pseudopodien notwendig ist, lag die Vermutung nahe, dass das Protein VASP in diesem Vorgang eine relevante Funktion besitzen könnte (Bearer et al., 2000). VASP in unterschiedlichen Zelltypen steht vor allem im Zusammenhang mit fokaler Adhäsion, Zellkontakten und hochdynamischen Regionen der Plasmamembran wie der Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes, Adhäsion, Änderung der Zellform sowie Motilität und Zellteilung (Reinhard et al., 1992).

6.1 Nachweis einer vergleichbaren Aktivierbarkeit von Human- und Maus-Thrombozyten

Wie bereits unter Punkt 2.3 dieser Arbeit ausgeführt, ist der initiale Formwandel der Thrombozyten vom diskoiden zum sphärischen Thrombozyten mit einer

Pseudopodienbildung verbunden, welche auf einer Aktinpolymerisation mit Neuorganisation des Zytoskelettes beruht und direkt nach der Thrombozytenaktivierung durch Umgestaltung der strukturellen Zone mit Vermehrung der Mikrotubuli in den Pseudopodien abläuft. Es gibt mehrere Signalwege über die in Thrombozyten ein *shape change* ausgelöst werden kann. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Substanzen ADP und U46619 wurden alternative Signalwege stimuliert die sowohl in Human- als auch in Maus-Thrombozyten vergleichbar vorzuliegen scheinen (Klages et al., 1999; Offermanns, 2000; Offermanns, 2006).

Durch einen extrazellulären Thrombozytenstimulus wird die Aktivierung über Membranrezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine (G_i , G_q und $G_{12/13}$) gekoppelt sind, ausgelöst (Offermanns, 2000). Bestimmte Rezeptoren, wie z.B. der ADP-Rezeptor P_2Y_{12} , inhibieren über G_i -Aktivierung die Aktivität der Adenylatzyklase und verringern so die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Yang et al., 2002). P_2Y_{12} – Rezeptoren sind sowohl in Human- als auch in Maus-Thrombozyten vorhanden (Offermanns et al., 2000). Nach ADP-Stimulation trägt dieser Signalweg unter anderem zur Aggregation nicht jedoch zum *shape change* in Thrombozyten bei (Offermanns, 2006; Wilhelm et al., 1993; Haserück et al., 2004; Gachet, 2006). Der ADP-Rezeptor P_2Y_1 , der sowohl für die Induktion eines *shape change* als auch einer Aggregation notwendig ist und Thromboxanrezeptoren sind G_q gekoppelt (Kunapuli et al., 2003; Offermanns, 2006; Gachet, 2006). Die Phospholipase C_β wird durch G_q stimuliert und induziert die Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat und in Folge davon einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und auch die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette (Offermanns et al., 1997). Dadurch wird ein *shape change* der Thrombozyten ausgelöst (Offermanns, 2006; Bauer et al., 2001; Essler et al., 1999). Der Ca^{2+} -Anstieg aktiviert die Phospholipase A_2 , die die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden katalysiert.

Eine weitere Subklasse der G-Proteine, $G_{12/13}$, interagiert unter anderem mit kleinen GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie (Gratacap et al., 2001; Retzer et al., 2000; Klages et al., 1999). Der $G_{12/13}$ -Signalweg wird unter anderem durch eine Aktivierung des Thromboxan-Rezeptors durch das Thromboxan A_2 - Analogon U46619 ausgelöst und kann dadurch über eine komplexe Aktivierung von Rho und Rho-Kinase die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase bewirken. Dies

ermöglicht dann, nach Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette, deren Interaktion mit Aktinfilamenten. Dieser Signalweg ist unabhängig von Ca^{2+} , existiert sowohl in Human- als auch Maus-Thrombozyten (Klages et al., 1999) und bewirkt Veränderungen des Aktinzytoskelettes, der Grundlage des *shape change* (Offermanns, 2000; Offermanns, 2006; Bauer et al., 1999).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten die Human- und Mausthrombozyten eine vergleichbare Aktivierbarkeit nach Hinzugabe eines Agonisten zur Auslösung eines *shape change*. Bei Humanthrombozyten konnte mittels Aggregometrie ein EC_{50} -Wert für ADP von ca. 130 nM und für U46619 von ca. 5 nM bestimmt werden. Bei den Mäusethrombozyten lag der EC_{50} -Wert für ADP bei 100 nM und für U46619 im Bereich von 10 nM. Es konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Induktion eines *shape change* durch Agonisten wie ADP und U46619 kein relevanter Unterschied in Art und Umfang des eingetretenen *shape change* nachweisbar war. Nach Zugabe von ADP oder des Thromboxan A_2 -Analogon U46619 bildete sich umgehend ein *shape change* aus.

6.2 Nachweis einer vergleichbaren Aktivierbarkeit von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} - Maus-Thrombozyten

VASP wurde initial aus humanen Thrombozyten isoliert, wird aber auch in einer Vielzahl anderer Zellen und Geweben exprimiert. Wie bereits erwähnt, steht VASP vor allem im Zusammenhang mit fokaler Adhäsion, elastischen Fasern, Zellkontakten und hochdynamischen Regionen der Plasmamembran (Reinhard et al., 1992). Durch die Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes werden zelluläre Vorgänge wie die Thrombozyten-Aktivierung, Zell-Zell-Adhäsion, Änderung der Zellform sowie Motilität und Zellteilung reguliert. Eine Reihe von Signaltransduktionsmechanismen und Teilkomponenten des Zytoskelettes sind hierfür notwendig (Machesky, 2002; Pollard and Borisy, 2003; Vasioukhin and Fuchs, 2001).

In Thrombozyten ist VASP an der Schnittstelle zweier hauptsächlich inhibitorisch wirkender Signalwege lokalisiert. Die VASP-Phosphorylierung als Antwort auf cGMP- und cAMP-erhöhende Substanzen und selektive membrangängige Aktivatoren der cGK und der cAK scheint eng mit einer Thrombozyteninhibierung und im Besonderen

mit der Hemmung der Fibrinogenbindung an das humane Thrombozytenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu korrelieren (Halbrügge et al., 1990; Horstrup et al., 1994).

Der Aktivierung von Thrombozyten folgt der *shape change*, der durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes verursacht wird. Das Zytoskelett-Protein Gelsolin fördert diesen *shape change* durch Bindung und Auflösung von Aktin-Filamenten. VASP bindet *in vitro* zusammen mit Gelsolin an die Enden von Aktin-Filamenten und hemmt dabei dessen Aktinauflösende Funktion (Bearer et al., 2000). Sowohl VASP als auch Profilin sind an der Spitze der Lamellipodien konzentriert lokalisiert wie von Rottner et al. an fluoreszenzgefärbten Maus Melanom-Zellen durch Video-Mikroskopie gezeigt werden konnte (Kwiatkowski et al., 2003; Rottner et al., 1999). Dort bewirkt VASP eine Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen. Eine Hypothese lautet, dass VASP-Proteine die Aktivität von *capping*-Proteinen einschränken können (Bear et al., 2002). VASP bindet hierbei an die Enden von freien Aktin-Filamenten und ermöglicht so eine fortlaufende Anbindung von Monomeren während es die Fähigkeit der *capping*-Proteine zur Unterbrechung dieser Filamentverlängerung blockiert. Dadurch wird die Aktinfilamentbildung letztendlich gefördert. Daraus ergibt sich die Erkenntnis, dass VASP *in vitro* eine zentrale Rolle innerhalb der Regulation der Thrombozytenaktivität einnimmt.

VASP-defiziente Mäuse zeigen eine leichte Megakaryozyten-Hyperplasie im Knochenmark und in der Milz (Hauser et al., 1999). Darüberhinaus wurde an isolierten VASP-defizienten Plättchen eine erhöhte Aktivierung durch Kollagen und Thrombin sowie eine verminderte Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation durch zyklische Nukleotide festgestellt. Isolierte Thrombozyten aus VASP^{-/-}-Mäusen zeigten eine erhöhte Fibrinogen-Bindung an das Integrin GPIIb-IIIa (Aszodi et al., 1999). Die Fibrinogenbindung spielt jedoch im Rahmen des *shape change* keine Rolle, sie besitzt erst beim *Spreading* und der Aggregation eine wesentliche Funktion. Zudem adhärieren VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten *in vivo* verstärkt an Endothel und subendotheliale extrazelluläre Matrix (Massberg et al., 2003; Massberg et al., 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Formwandel an Thrombozyten von VASP-Wildtyp- und VASP-*Knockout*-Mäusen durchgeführt. In der Literatur wird eine im Umfang und zeitlicher Ausprägung unterschiedliche

Aktivierbarkeit der Thrombozyten bei VASP-Wildtyp und *-Knockout* beschrieben (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Beschrieben wurde für VASP^{-/-} - Thrombozyten die Ausbildung eines zeitlich (bis ca. 20 Sekunden) verzögerten *shape change* und Aggregation nach Stimulierung durch Kollagen und damit eigentlich eine verminderte Aktivierbarkeit (Aszodi et al., 1999). Andererseits wurde, wie bereits erwähnt, mittels Aggregometrie an isolierten VASP-defizienten Plättchen eine erhöhte Aktivierung durch Kollagen und Thrombin sowie eine verminderte Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation durch zyklische Nukleotide festgestellt (Aszodi et al., 1999).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Induktion eines *shape change* durch Agonisten wie ADP oder U46619 kein relevanter Unterschied von VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} - Mausthrombozyten in Kinetik, Umfang und Morphologie des *shape change* nachweisbar war. Das heisst, dass sich sowohl für den durch ADP (vermittelt vor allem über G_q und PLC_β und kalziumabhängig mit Aktivierung der Myosinleichtketten-Kinase) als auch durch U46619 (vermittelt kalziumunabhängig über G_{12/13} und Rho/ Rho-Kinase) induzierten *shape change* kein signifikanter Unterschied nachweisen liess. Die erstellten *shape change* Kurven der VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} - Mausthrombozyten waren nahezu identisch. Auch die Reaktivität auf ADP oder U46619 anhand der Dosis-Wirkungskurven zeigte keinen Unterschied von VASP^{+/+} -und VASP^{-/-} - Mausthrombozyten.

Zur morphologischen Beurteilung des *shape change* wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten, nach Stimulation mit ADP oder U46619 für VASP^{+/+} und VASP^{-/-} eine ähnliche Aktivierung der Thrombozyten mit Pseudo- und Filopodienbildung und Ausbildung eines *shape change*. Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein VASP im Rahmen des *shape change* keine relevante Rolle zu spielen scheint.

6.3 cAMP-erhöhende Substanzen führen zu einer Phosphorylierung von VASP und zu einer kompletten Hemmung des *shape change* von humanen Thrombozyten und murinen wt und VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargelegt, konnte mit den cAMP-erhöhenden Substanzen Prostaglandin E₁ und Sp-5,6-DCI- cBIMPS der durch ADP und U46619 induzierte *shape change* sowohl in Human- als auch VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten komplett gehemmt werden (siehe 5.1.2 und 5.2.2). Die Hemmsubstanzen waren ähnlich aktiv in humanen und murinen Thrombozyten und die eingesetzten Konzentrationen unterschieden sich hierbei nicht in relevanter Weise.

Vergleiche von murinen VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten fanden erneut direkt statt. Nach Vorinkubation mit PGE₁ oder cBIMPS und dann folgender Zugabe der Agonisten ADP oder U46619 konnte gezeigt werden, dass PGE₁ und cBIMPS den sowohl durch ADP als auch U46619 induzierten Formwandel von VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten vollständig hemmen (bezüglich Signalkaskaden siehe auch Abb. 2-5).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Mäusethrombozyten bestätigten die mit der Aggregometrie erhaltenen Ergebnisse. Durch Vorinkubation mit PGE₁ ließ sich eine morphologisch sichtbare Aktivierung (*shape change*, Pseudopodienbildung) nahezu verhindern. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen VASP^{+/+}- oder VASP^{-/-}-Thrombozyten führen. Entsprechend ähnlich stellen sich die Ergebnisse nach Vorinkubation mit cBIMPS dar. Diese Ergebnisse verifizieren also die durch die Aggregometrie erhobenen Daten. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die VASP-Phosphorylierung nicht verantwortlich für die durch cAMP vermittelte Hemmung des *shape change* zu sein.

In Human- und Maus-Thrombozyten wurde nach Inkubation mit PGE₁ oder cBIMPS die cAMP abhängige VASP-Phosphorylierung an Position Serin 157 untersucht. Es zeigte sich sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige Phosphorylierung von VASP an der durch cAMP bevorzugten Position Serin 157. Die Phosphorylierung der durch cGMP bevorzugten Position Serin 239 nach PGE₁- oder cBIMPS-Inkubation war im Vergleich zu der Phosphorylierung nach SNAP- oder 8-pCPT-

cGMP- Inkubation etwas geringer (Abb. 5-11). Diese Ausprägung der Phosphorylierungsmuster werden so auch in der Literatur beschrieben (Smolenski et al., 1998; Butt et al., 1994; Halbrügge et al., 1990).

Der Umstand, dass sich bei den VASP-*Knockout*-Thrombozyten nahezu identische Ergebnisse wie beim VASP-Wildtyp zeigen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Protein VASP im Rahmen des *shape change* keine relevante Rolle zu spielen scheint. Eliautou et al. beschrieben kürzlich in einer Arbeit ähnliche Resultate bezüglich der Bildung von Filopodien in VASP^{-/-}-Thrombozyten (Eliautou et al., 2009). Die nachgewiesene Hemmung des *shape change* erfolgte aufgrund meiner Untersuchungen unabhängig von VASP, also durch andere Wirkungen der cAMP-erhöhenden Substanzen PGE₁ und cBIMPS. Aszodi et al. beschrieben eine verringerte Inhibierung der Aggregation von VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten nach Inkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen (Aszodi et al., 1999). In den in meiner Arbeit erhobenen Daten wurde im Gegensatz hierzu bemerkenswerterweise der *shape change* beim VASP^{-/-} der Maus-Thrombozyten komplett gehemmt.

6.4 Wirkung von cGMP-erhöhenden Substanzen auf die Phosphorylierung von VASP und den *shape change* von humanen Thrombozyten und murinen wt und VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten

Die Plättchen wurden mit cGMP-erhöhenden Substanzen, entweder dem NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (=SNAP) oder dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP, vorinkubiert und dann, nach Zugabe von ADP oder U46619, deren Hemmwirkung auf den *shape change* mittels Aggregometrie dokumentiert (siehe unter 5.1.3 und 5.2.3).

SNAP bewirkte eine maximale Phosphorylierung von VASP nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten, 8-pCPT-cGMP nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten. Eine Erklärung für diesen Zeitunterschied ist, dass 8-pCPT-cGMP ein synthetisch hergestelltes Analogon des intrazellulären Signalmoleküls cGMP ist, das, im Gegensatz zum natürlichen cGMP lipophil ist, und eine gewisse Zeit braucht, um durch die Zellmembran zu diffundieren und die intrazellulären cGMP-abhängigen Kinasen zu aktivieren. 8-pCPT-cGMP kann daher für die Stimulation von cGMP-

abhängigen Kinasen in intakten Zellen verwendet werden. Die Phosphorylierung durch die cGMP-erhöhenden Substanzen wurde durch den monoklonalen VASP-Antikörper 16C2, der eine Phosphorylierung an Serin 239 anzeigt, nachgewiesen.

In Human- und Maus-Thrombozyten wurde nach Inkubation mit SNAP oder 8-pCPT-cGMP die cGMP abhängige VASP-Phosphorylierung an Position Serin 239 untersucht. Es zeigte sich sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige Phosphorylierung von VASP an der durch cGMP bevorzugten Position Serin 239, aber auch, in etwas geringerem Ausmass, an Position Serin 157 des VASP-Proteins (Abb. 5-11 und 5-28). Diese Phosphorylierungsmuster entsprechen den in der Literatur genannten Verteilungsmustern an Serin 157 und 239 von VASP (Smolenski et al., 1998; Butt, Eigenthaler et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass SNAP in der Lage ist, den *shape change* in Human-Thrombozyten vollständig zu hemmen. In unseren Experimenten lag der Wert der IC_{50} für SNAP sowohl für ADP als auch U46619 im Bereich von 100 nM. Im Gegensatz hierzu konnte überraschenderweise durch eine Inkubation mit dem Antagonisten 8-pCPT-cGMP keine signifikante Hemmung des durch ADP oder U46619 induzierten *shape change* in Human-Thrombozyten gezeigt werden. In den Experimenten mit den Mäuse-Thrombozyten zeigte sich, ebenfalls unerwarteterweise, dass weder durch SNAP noch durch 8-pCPT-cGMP der durch ADP oder U46619 induzierte Formwandel bei VASP ^{+/+} und VASP ^{-/-} signifikant gehemmt werden konnte. Ein Unterschied liess sich hierbei zwischen VASP ^{+/+} - oder VASP ^{-/-} -Thrombozyten nicht nachweisen. Diese Ergebnisse wurden durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt.

Da durch cGMP-erhöhende Substanzen in Humanthrombozyten trotz deutlicher Phosphorylierung von VASP an Serin 157 und Serin 239 durch das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP keine Hemmung des *shape change* messbar war, wird die Vermutung verstärkt, dass das Protein VASP auf den *shape change* auch von humanen Thrombozyten keinen negativen Einfluss besitzt. Im Gegensatz hierzu konnte durch den NO-Donor SNAP in den Humanthrombozyten der *shape change* komplett gehemmt werden, bemerkenswerterweise nicht jedoch in den Mäusethrombozyten von VASP ^{+/+} und VASP ^{-/-}. Zur Erklärung der fehlenden Hemmwirkung von SNAP auf die Maus-Thrombozyten ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt durch eine

Studie von Jensen et al., in der durch NO der durch Thrombin induzierte *shape change* von Human-Thrombozyten gehemmt wurde (Jensen et al., 2004). Da die Hemmung nur durch cAMP-Analoga und nicht durch cGMP-Analoga wiederholt werden konnte und die Inhibierung des *shape change* durch Inkubation mit cAK-Inhibitoren nicht mehr möglich war (sehr wohl aber nach Inkubation mit cGK-Inhibitoren) zogen die Autoren die Schlussfolgerung, dass die cAK für die NO-vermittelte Hemmung des *shape change* notwendig ist, während die cGK keinen relevanten Einfluss auf den *shape change* hat (Jensen et al., 2004). Dies erscheint für die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten einer fehlenden Hemmung des *shape change* bei Humanthrombozyten durch 8-pCPT-cGMP eine mögliche Erklärung zu sein. Die NO-vermittelte Hemmung des *shape change* in meinen Experimenten könnte dann durch eine NO/cGMP-induzierte Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) III (Gambaryan et al., 2004; Marshall et al., 2004) und der dadurch bewirkten Erhöhung der cAMP-Konzentration und nachfolgenden cAK-Aktivierung erfolgen (Jensen et al., 2004).

In einer weiteren Studie konnte durch Cilostazol, ein selektiver PDE III-Hemmer, *in vitro* eine VASP-Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch erhöhte cAMP-Spiegel nachgewiesen werden (Sudo et al., 2003). Bei den Mäusethrombozyten könnte diese indirekte Wirkung von NO auf die PDE III, cAMP-Spiegel und cAK reduziert oder nicht ausgeprägt sein, was die fehlende Wirkung erklären könnte. Artspezifische Unterschiede der cGMP-abhängigen cAMP-Erhöhung wurden bereits von Haslam beschrieben (Haslam et al., 1989). Bezüglich vergleichender Ergebnisse zwischen Mensch und Maus müssen in der Analyse grundsätzlich auch differierende Präparationstechniken der gewaschenen Plättchen als Ursache für solche Abweichungen erwogen werden (Smolenski et al., 1998; Aszodi et al., 1999).

In diesem Zusammenhang sind auch, wie unter Punkt 6.1 bereits angedeutet, die Ergebnisse einer Arbeit von Gratacap interessant, in der die inhibitorische Potenz von cAMP auf U46619, auf die heterotrimeren G-Proteine G_q und $G_{12/13}$ wie auch auf Rac und Rho diskutiert werden. Dagegen zeigte cGMP lediglich eine hemmende Eigenschaft auf G_q und Rac (Gratacap et al., 2001). Dies belegt, dass Rho und Rac unterschiedlich durch G-Proteine reguliert werden. Der $G_{12/13}$ -Signalweg bewirkt über eine Rho A-Aktivierung einen *shape change* während Rac über den G_q -Signalweg aktiviert wird und für den *shape change* keine Rolle spielt.

Ebenfalls gibt es Daten, die einen direkten möglichen NO/cGMP-vermittelten Signalweg via cAK unterstützen und auch postulieren, dass eine VASP-Phosphorylierung an Serin 239 durch NO nicht durch cGK sondern cAK vermittelt wird (Li et al., 2003; Feil et al., 2005; Hofmann et al., 2006). Die cGMP-vermittelte VASP-Phosphorylierung konnte in diesen Untersuchungen mittels spezifischer Inhibitoren der cAK aber nicht der cGK inhibiert werden. Ausserdem wurde dargestellt, dass die durch cGMP und NO induzierte Hemmung einer Plättchen-Aggregation nur durch cAK- und nicht durch cGK-Inhibitoren umgekehrt werden konnte. Diesem Konzept wird allerdings, zumindest teilweise, in den Arbeiten von Gambaryan und Marshall widersprochen von denen die Ergebnisse von Li et al. nicht reproduzierbar waren (Gambaryan et al., 2004; Marshall et al., 2004).

Eine ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Li et al. diskutierte frühe Plättchenaktivierung durch cGMP aufgrund des ERK-*pathway* (cGMP/cGMP-abhängige Proteinkinase G-vermittelte extrazelluläre signalabhängige Kinase) wird aufgrund experimenteller Unklarheiten insgesamt als eher nicht wahrscheinlich betrachtet (Gambaryan et al., 2004; Freedman et al., 2003).

Eine Differenzierung individueller Funktionen der cAK und cGK wird dadurch erschwert, dass beide Kinasen zusammen in vielen Zelltypen exprimiert werden und gegebenenfalls ähnliche, gleiche oder entgegengesetzte (Teil-) Funktionen besitzen. Bisher konnte nicht schlüssig geklärt werden, wie die Substrate der cAK und der cGK die Plättcheninhibition regulieren. In meiner Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von VASP nicht die Hemmwirkung von cAMP-erhöhenden Substanzen oder SNAP auf den Formwandel erklärt.

Durch *in vitro*-Experimente konnte herausgearbeitet werden, dass durch die VASP-Phosphorylierung die Bindung an F-Aktin reduziert und die Polymerisation von Aktin und die Bündelung der Filamente unterdrückt werden (Harbeck et al., 2000). Ein Einfluss auf die Interaktionen zwischen VASP und Profilin war hierbei nicht nachweisbar. Daher wäre es also möglich, dass durch die VASP-Phosphorylierung die verstärkende Funktion von VASP auf die Aktinpolymerisation herunterreguliert werden kann. Die EVH 2-Domäne des VASP-Proteins unterstützt die Fähigkeit, die Aktinpolymerisation durch eine Bündelungsfunktion (Profilin-Aktin) und ein *anti-capping* zu regulieren (Bachmann et al., 1999; Kwiatkowski et al., 2003; Krause et

al., 2003; Bear et al., 2002). Durch eine Phosphorylierung von VASP resultiert dann eine verminderte Aktivität dieser Bündelungsaktivitäten und des *anti-capping* (Bearer et al., 2000).

Neuere Arbeiten zeigten, dass VASP auch durch klassische Formen der Protein Kinase C (PKC) an Serin 157 phosphoryliert wird (Wentworth et al., 2006; Pula et al., 2006; Aburima et al., 2010). Die Ena/VASP-Proteine scheinen auch bei den Signaltransduktionswegen der kleinen GTPasen der Rho-Familie beteiligt zu sein (Garcia Arguinzonis et al., 2002; Grosse et al., 2003; Krugmann et al., 2001; Chitaley et al., 2004). Rho-GTPasen, z.B. Rho, Rac und Cdc42 regulieren die Bildung von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Dies wäre ein möglicher Ansatz für eine Mitbeteiligung von VASP beim *shape change* in Thrombozyten. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Veränderungen des Aktinzytoskelettes, die zum *shape change* der Thrombozyten führen, durch VASP nicht beeinflusst werden.

Die *in vivo* Bedeutung von VASP in Bezug auf die Thrombozytenfunktion war bisher wenig verstanden. Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die Rolle von VASP für die Regulation der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen *in vivo* untersucht (Massberg et al., 2003; Massberg et al., 2004). In VASP-defizienten Mäusen werden Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen nach Ischämie und Reperfusion als Antwort auf eine endotheliale Denudation und in atherosklerotisch veränderten Gefäßen drastisch gesteigert. Ebenfalls konnte die Arbeitsgruppe von Massberg et al. darlegen, dass NO die Thrombusbildung muriner VASP-defizienter Plättchen in Flusskammerversuchen nicht mehr hemmte (Begonja et al., 2006). Die Agonisten-induzierte Plättchenadhäsion und konsekutive Thrombusformation wurde also durch den NO/cGMP-Signalweg in VASP-defizienten Plättchen nicht inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass VASP an der NO-vermittelten Hemmung der Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen unter physiologischen Bedingungen in der intestinalen Mikrozirkulation beteiligt ist. Jensen et al. stellten in ihrer zuletzt veröffentlichten Arbeit die Hypothese auf, dass die durch NO-vermittelte Hemmung des *shape change* vor allem von der cAK und VASP abhängt (Jensen et al., 2010). Die in meiner Arbeit erhobenen Daten lassen diesen Schluss bezüglich VASP nicht zu.

Eliautou et al. untersuchten zuletzt den Einfluss des Fehlens von VASP auf Plättchen, die einer adhäsiven Matrix (vWF, Fibrinogen) oder löslichen Agonisten (ADP, U46619, PAR-4) exponiert waren (Eliautou et al., 2009). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Maus-Thrombozyten, indem jeweils ca. 90% der adhären Plättchen ein ähnliches Verhalten mit Ausbildung von Filopodien aufwiesen. Diese Arbeit unterstützt die von mir erhobenen Ergebnisse. Die Autoren postulierten daher, dass ein Fehlen des VASP-Proteins wenig Einfluss auf die Bildung von Filopodien darstelle. Teilweise im Widerspruch hierzu ist die Arbeit von Pula et al. zu werten, die, nach Kollagenstimulation, eine Funktion von VASP in der Signalkaskade unterhalb der Proteinkinase C_δ und einen negativ modulierenden Effekt auf die Ausbildung von Filopodien beschreibt (Pula et al., 2006).

VASP ist jedoch nur eines der Substrate der cAK und cGK, die an der Organisation des Zytoskelettes beteiligt sind. Die Phosphorylierung von z.B. Caldesmon, GPIIb_β, MLCK und Rap1b tragen wahrscheinlich ebenso zur Hemmung der Umstrukturierung des Zytoskelettes bei.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Ausmaß des Effektes der VASP-Deletion auf die Integrin-Aktivierung und die Sekretion bislang überschätzt wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die VASP-Deletion zu keiner Störung des Thrombozyten-Formwandels führt. Neuere Arbeiten zeigen, dass VASP auch auf den initialen Prozess der Filopodienbildung in Thrombozyten keinen relevanten Einfluss auszuüben scheint (Eliautou et al., 2009).

Es soll auch erwähnt werden, dass die Möglichkeit, dass die Funktionen von VASP in Maus-Knockout-Modellen durch andere Mitglieder der Ena/VASP-Familie (Mena, Evi) ersetzt werden, durchaus möglich erscheint und diskussionswürdig bleibt.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer potentiellen Funktion des Proteins VASP für den *shape change* von Thrombozyten. VASP spielt im Rahmen vieler physiologischer und auch pathophysiologischer Regulationsvorgänge eine Rolle. So ist in VASP-defizienten Mausthrombozyten eine Rolle von VASP bei der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten nachgewiesen worden. Ebenfalls ist sein Einfluss auf das Aktinrearrangement belegt. Das VASP-Protein interagiert nicht nur mit verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen, sondern ist auch ein Substrat der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Etablierung geeigneter Präparationstechniken der Thrombozyten experimentelle Untersuchungen zur Aktivierung und Hemmung des *shape change* von humanen und murinen Thrombozyten möglich sind. Die Aktivierbarkeit nach Stimulation durch ADP und das Thromboxan A₂-Analogon U46619 stellte sich bei Thrombozyten von Mensch und Maus, im Rahmen und im Wissen der differierenden Präparationstechniken, als vergleichbar dar.

Mittels vergleichender Untersuchungen an Thrombozyten von VASP-Wildtyp- und VASP-*Knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass VASP bei der initialen Aktivierung der Thrombozyten keine relevante Rolle zu spielen scheint. Es zeigte sich, entgegen publizierter Daten einer anderen Arbeitsgruppe, kein Unterschied zwischen den VASP^{+/+}- und VASP^{-/-}-Thrombozyten in der Kinetik und der quantitativen Ausprägung des *shape change* nach Stimulation durch ADP und U46619.

In Humanthrombozyten wurde der *shape change* durch cAMP-erhöhende Substanzen komplett gehemmt. Weiterhin ließ sich der *shape change* der murinen Thrombozyten von VASP^{+/+} und VASP^{-/-} gleichermaßen durch cAMP-erhöhende Substanzen hemmen. Da also in meinen Experimenten der *shape change* auch bei den VASP^{-/-}-Thrombozyten nach Inkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen komplett gehemmt werden konnte, kann als Schlussfolgerung die VASP-Phosphorylierung nicht die hemmende Wirkung von cAMP auf den *shape change* vermitteln.

Durch cGMP-erhöhende Substanzen ließ sich weder bei VASP^{+/+} - noch VASP^{-/-} - Thrombozyten eine Hemmung des *shape change* erzielen. Auch die Tatsache, dass bei Humanthrombozyten trotz deutlicher Phosphorylierung von VASP an Serin 157 und Serin 239 durch das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP keine Hemmung des *shape change* messbar war, verstärkt die Vermutung, dass das Protein VASP auf den *shape change* auch von humanen Thrombozyten keinen negativen Einfluss besitzt. Das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP konnte also sowohl bei den Humanthrombozyten als auch bei den Thrombozyten der VASP^{+/+} - und VASP^{-/-} - Mäuse keine signifikante Hemmung des *shape change* bewirken. Im Gegensatz hierzu konnte durch den NO-Donor SNAP in den Humanthrombozyten der *shape change* komplett gehemmt werden, nicht jedoch in den Mäusethrombozyten von VASP^{+/+} und VASP^{-/-} .

Die Bedeutungen der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase für die Hemmung der Plättchenaktivierung und -aggregation sind beschrieben. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die Expression von funktionell aktiven Adhäsionsrezeptoren wie dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und das Aktinrearrangement können durch die cAMP- bzw. cGMP vermittelte Aktivierung der entsprechenden Kinasen fast vollständig gehemmt werden. Trotz intensiver Forschungstätigkeiten gibt es bisher jedoch kein schlüssiges Gesamtbild davon, wie die Substrate der cAK und cGK die Plättchenhemmung bewirken. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist die Phosphorylierung von VASP bei der Hemmung des *shape change* sicher nicht beteiligt.

Die in der Literatur postulierte Rolle von VASP im Rahmen der Thrombozytenaktivierung und Hämostase scheint speziell nur die Form der Aktinreorganisation zu beeinflussen, die entweder von der Ausbildung von fokalen Adhäsionen abhängt oder zu diesen führt. Die Veränderungen des Aktinzytoskelettes, die zum *shape change* der Thrombozyten führen, werden jedenfalls, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, durch VASP nicht beeinflusst.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintri-phosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cAK	cAMP- abhängige Proteinkinase
cBIMPS	Sp-5,6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosyl-3',5'- monophosphorothioate
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cGK	cGMP- abhängige Proteinkinase
d.h.	das heißt
EC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Agonistenwirkung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/Na ₂ -Salz
f.c.	finale Konzentration
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Hemmstoffwirkung
Konz.	Konzentration
KCL	Kalium Chlorid
KH ₂ PO ₄	Kalium-Dihydrogen-Phosphat
LPA	Lysophosphatidsäure
MgCl ₂	Magnesium Chlorid
mind.	mindestens
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium Chlorid
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Dihydrogen-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatrium-Hydrogen-Phosphat

NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
8-pCPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio)-guanosine-3',5'-monophosphate sodium salt
PDE	Phosphodiesterase
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGI ₂	Prostazyklin
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	Standard deviation (=Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TxA ₂	Thromboxan A ₂
Tz	Thrombozyten
U 46619	Thromboxan Rezeptor Agonist
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Symbole und Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
kDa	kilo Dalton
l	Liter
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
rpm	Rounds per minute
sek	Sekunde(n)
U	Unit(s)
U/min	Umdrehungen/Minute
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schultzes Darstellung 17 und 18 des Blutplättchens.	6
Abb. 1-2:	Die Thrombozytenaktivierung.	7
Abb. 2-1:	Aufbau und strukturelle Einteilung des Thrombozyten.	13
Abb. 2-2:	Aktivierter Thrombozyt mit Pseudopodienbildung.	17
Abb. 2-3:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten.	19
Abb. 2-4:	Synthese und Signalweg von cGMP.	24
Abb. 2-5:	Darstellung der Regulation der Thrombozytenaktivität.	26
Abb. 2-6:	Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein des Menschen.	28
Abb. 2-7:	Das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein der Maus.	31
Abb. 5-1:	Induktion des <i>shape change</i> von Human-Thrombozyten (Tz) durch ADP oder U46619.	53
Abb. 5-2:	Induktion von <i>shape change</i> von Human Tz durch ADP oder U46619.	54
Abb. 5-3:	Hemmung des <i>shape change</i> von Human-Tz durch PGE ₁ oder cBIMPS nach Stimulation mit ADP oder U46619.	55
Abb. 5-4:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von Human-Tz durch PGE ₁ (A) und cBIMPS (B) nach Stimulation mit ADP oder U46619.	56
Abb. 5-5:	Hemmung des <i>shape change</i> von Human-Tz durch SNAP oder 8-pCPT- cGMP nach Stimulation mit ADP oder U46619.	57
Abb. 5-6:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von Human-Tz durch SNAP (A), aber nicht durch 8-pCPT- cGMP (B) nach Stimulation mit ADP oder U46619.	58
Abb. 5-7:	Untersuchung der VASP-Phosphorylierung durch PGE ₁ und cBIMPS zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten durch die Antikörper 10C6, 16C2 und M4.	61
Abb. 5-8:	Untersuchung der konzentrationsabhängigen VASP-Phosphorylierung durch PGE ₁ und cBIMPS durch die VASP-Antikörper 10C6, 16C2 und M4.	61

Abb. 5-9:	Untersuchung der VASP-Phosphorylierung durch SNAP und 8-pCPT-cGMP zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten durch die Antikörper 10C6, 16C2 und M4.	62
Abb. 5-10:	Untersuchung der konzentrationsabhängigen VASP-Phosphorylierung durch SNAP und 8-pCPT-cGMP durch die Antikörper 10C6, 16C2 und M4.	62
Abb. 5-11:	Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung an Serin 157 und Serin 239 durch PGE ₁ , cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP.	63
Abb. 5-12:	Induktion von <i>shape change</i> durch ADP oder U46619 von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz.	64
Abb. 5-13:	Konzentrationsabhängige Induktion des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch ADP.	66
Abb. 5-14:	Konzentrationsabhängige Induktion des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch U46619.	66
Abb. 5-15:	Hemmung des <i>shape change</i> durch PGE ₁ nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Tz.	68
Abb. 5-16:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>sh. ch.</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch PGE ₁ nach Stimulation mit ADP.	68
Abb. 5-17:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch PGE ₁ nach Stimulation mit U46619.	69
Abb. 5-18:	Hemmung des <i>shape change</i> durch cBIMPS nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Tz.	69
Abb. 5-19:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch cBIMPS nach Stimulation mit ADP.	70
Abb. 5-20:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch cBIMPS nach Stimulation mit U46619.	70
Abb. 5-21:	Hemmung des <i>shape change</i> durch SNAP nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Tz.	71
Abb. 5-22:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>sh. ch.</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch SNAP nach Stimulation mit ADP.	72

Abb. 5-23:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch SNAP nach Stimulation mit U46619.	73
Abb. 5-24:	Hemmung des <i>shape change</i> durch 8-pCPT- cGMP nach Stimulation mit ADP oder U46619 von VASP ^{+/+} -und VASP ^{-/-} -Tz.	73
Abb. 5-25:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch 8-pCPT-cGMP nach Stimulation mit ADP.	74
Abb. 5-26:	Konzentrationsabhängige Hemmung des <i>shape change</i> von VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Maus-Tz durch 8-pCPT-cGMP nach Stimulation mit U46619.	74
Abb. 5-27:	Untersuchung der VASP-Phosphorylierung der VASP ^{+/+} - und VASP ^{-/-} -Tz durch PGE ₁ , cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP durch die Antikörper 10C6, 16C2 und M4.	76
Abb. 5-28:	Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung von VASP ^{+/+} -Tz an Serin 157 und Serin 239 durch PGE ₁ , cBIMPS, SNAP und 8-pCPT-cGMP.	77
Abb. 5-29:	Tz-Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie nach Induktion des <i>shape change</i> durch ADP.	79
Abb. 5-30:	Tz-Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie nach Induktion des <i>shape change</i> durch U46619.	80
Abb. 5-31:	Vergleich der Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie von VASP ^{+/+} und VASP ^{-/-} nach Inkubation mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen und Induktion des <i>shape change</i> .	82

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1:	Eingesetzte Agonisten zur Aktivierung von Thrombozyten.	38
Tab. 4-2:	Eingesetzte Antagonisten zur Inhibition von Thrombozyten.	38
Tab. 4-3:	Herstellung eines 12%igen Polyacrylamid-Gels.	48
Tab. 4-4:	Trenngel-Lösung für 1 Gradientengel.	48
Tab. 4-5:	Eingesetzte Antikörper und Antikörperkonzentrationen.	50

11 Literaturverzeichnis

Abel K, Mieskes G and Walter U. Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets. *FEBS Lett* 1995;370:184-188.

Aburima A, Riba R, Naseem KM. Peroxynitrite causes phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through a PKC dependent mechanism. *Platelets* 2010;21(6):421-28.

Aktas B, Utz A et al. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke* 2003;34(3):764-69.

Ammendola A, Geiselhöringer A, Hofmann F and Schlossmann J. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I beta. *J Biol Chem* 2001;276:24153-59.

Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S and Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 1999;18:37-48.

Bachmann C, Fischer L, Walter U and Reinhardt M. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding and Actin bundle formation. *J Biolog Chem* 1999;274:23549-57.

Balbona K, Tran H, Godyna S, Ingham KC, Strickland DK and Argraves WS. Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J Biol Chem* 1992;267:20120-25.

Bauer M, Retzer M, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP, Siess W. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 1999;94:1665-72.

Bauer M, Maschberger P, Quek L, Bridson SJ, Dash D, Weiss M, Watson SP, Siess W. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin alpha IIb beta3 inside-out signalling during shape change. *Thromb Haemost* 2001;85:331-40.

Bear JE, Krause M and Gertler FB. Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:158-66.

Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD and Allen PG. VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;47:351-64.

Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, et al. Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS. *Blood cells, molecules & diseases* 2006; 36: 166–170.

Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Archiv für Pathologische Anatomie* 1882;90:261-332.

Blume C et al. AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J Biol Chem* 2007;282(7): 4601-12.

Born GV and Cross MJ. Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature* 1963;197:974-76.

Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B and Walter U. Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* 1992;43:2591-2600.

Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J and Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 1994;269:14509-17.

Butt E, Eigenthaler M and Genieser HG. (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 1994; 269:265-68.

Capron L. New concepts of atherogenesis. *Presse Med* 1988;17:980-84.

Capron L. Inflammation and atherosclerosis. *J Mal Vasc* 1989;14 Suppl A:3-12.

Castellano F, Le Clainche C, Patin D, Carlier MF and Chavrier P. A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J* 2001;20:5603-14.

Chitaley K et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C. *FEBS Lett* 2004;556(1-3):211-15.

Clemetson KJ and Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001;86:189-97.

Daniel JL, Dangelmaier C et al. Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* 1999;82(4):1322-26.

Dramsi S and Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:137-66.

Eigenthaler M, Nolte C et al. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem* 1992;205(2):471-81.

El-Daher SS, Eigenthaler M, Walter U, Furuichi T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Kakkar VV, Authi KS. Distribution and activation of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases in highly purified human platelet plasma and intracellular membranes. *Thromb Haemost* 1996;76:1063-71.

Eliautou S, Mangin PH, Walter U, Gachet C, Lanza F. Normal filopodia extension in VASP-deficient platelets upon activation by adhesive matrices or soluble agonists. *Thromb Haemost* 2009;102:792-94.

Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC and Aepfelbacher M. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:21867-74.

Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M, Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:30361-64.

Etienne-Manneville S and Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420:629-35.

Freedman JE, Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1183-88.

Gachet C. Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1:15-20.

Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:277-300.

Galler AB et al. VASP-dependent regulation of actin cytoskeleton rigidity, cell adhesion, and detachment. *Histochem Cell Biol* 2006;125(5):457-74.

Gambaryan S, Geiger J, Schwarz UR, Butt E, Begonja A, Obergfell A and Walter U. Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase. *Blood* 2004;103:2593-2600.

Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM, Walter U. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J Biol Chem* 2010;285:18352-63.

Garcia Arguinzonis MI, Galler AB, Walter U, Reinhard M and Simm A. Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J Biol Chem* 2002;277:7.

Gawaz M. Thrombozyten und primäre Hämostase. Das Blutplättchen. Stuttgart: *Thieme Verlag* 1999.

Gawaz M. Blood Platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases. Stuttgart: *Thieme Verlag* 2001.

Geese M, Loureiro JJ, Bear JE, Wehland J, Gertler FB and Sechi AS. Contribution of Ena/VASP Proteins to Intracellular Motility of *Listeria* Requires Phosphorylation and Proline-rich Core but Not F-Actin Binding or Multimerization. *Mol Biol Cell* 2002;13:2383-96.

Geiger J, Honig-Liedl P et al. Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors. *Eur J Pharmacol* 1998;351(2):235-46.

Geiger J, Brich J, Hönig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y_{AC} ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2007-11.

Geiger J, Nolte C, Butt E, Sage SO and Walter U. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1031-35.

George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-39.

Gertler FB, Comer AR, Juang JL, Ahern SM, Clark MJ, Liebl EC, Hoffmann FM. Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev* 1995;9(5):521-33.

Gertler FB, Niebuhr K et al. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 1996;87(2):227-39.

Gratacap MP, Payraastre B, Nieswandt B and Offermanns S. Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2001;276:47906-13.

Grosse R, Copeland JW, Newsome TP, Way M and Treisman R. A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *Embo J* 2003;22:3050-61.

Haffner C, Jarchau T, Reinhard M, Hoppe J, Lohmann SM and Walter U. Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J* 1995;14:19-27.

Halbrugge M and Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* 1989;185:41-50.

Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 1990;265:3088-93.

Harbeck B, Hüttelmaier S, Schlüter K, Jokusch BM and Illenberger S. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 2000;275(40):30817-25.

Haseruck N, Erl W, Pandey D, Tigyi G, Ohlmann P, Ravanat C, Gachet C, Siess W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 2004;103:2585-92.

Haslam RJ, Dickinson NT et al. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb Haemost* 1989;82(2):412-23.

Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U and Zimmer M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8120-25.

Heemskerk JW, Bevers EM and Lindhout T. Platelet Activation and Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 2002;88:186-93.

Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2005;280:1-4.

Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K and Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 1994;225:21-27.

Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol* 1989;26(1):63-76.

Jang EK, Azzam JE, Dickinson NT, Davidson MML and Haslam RJ. Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside. *Br J Haematol* 2002;117:664-75.

Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB and Mortensen RM. Impaired activation of murine platelets lacking $G\alpha_{i2}$. *J Clin Invest* 2001;108:477-83.

Jensen BO, Selheim F, Doskeland SO, Gear AR, Holmsen H. Protein kinase A mediates inhibition of the thrombin-induced platelet shape change by nitric oxide. *Blood* 2004;104:2775-82.

Jensen BO, Kleppe R, Kopperud R, Nygaard G, Doskeland SO, Holmsen H, Selheim F. Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change. *Platelets* 2011;22:7-18.

Jin J and Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8070-74.

Keilbach A, Ruth P et al. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* 1992;208(2):467-73.

Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G and Offermanns S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 1999;144:745-54.

Krause M et al. The Ena/VASP enigma. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 24):4721-26.

Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB and Wehland J. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 2000;149:181-94.

Krause M, Dent EW, Bear JE, et al. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 541–64.

Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J and Hall A. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53-Mena complex. *Curr Biol* 2001;11:1645-55.

Kunapuli SP, Ding Z, Dorsam RT, Kim S, Murugappan S and Quinton TM. ADP receptors-targets for developing antithrombotic agents. *Curr Pharm Des* 2003;9: 2303-16.

Kwiatkowski AV, Gertler FB, Loureiro JJ. Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 386–392.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85.

Li Z, Xi X et al. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell* 2003;112(1):77-86.

Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M and Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in human. *Blood* 2003;101:4423-29.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.

Loureiro JJ, Rubinson DA, Bear JE, Baltus GA, Kwiatkowski AV and Gertler FB. Critical Roles of Phosphorylation and Actin Binding Motifs, but Not the Central Proline-rich Region, for Ena/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) Function during Cell Migration. *Mol Biol Cell* 2002;13:2533-46.

Lukowski R. Control of vasculo-proliferative processes by the NO-cGMP-cGKI pathway. Dissertation Technische Universität München 2006.

Machesky LM. Sharks' teeth and dunes. *Nature* 2002;417:494-97.

Mackie IJ and Neal CR. The Platelet. Platelet-vessel wall Interactions. In: *The Bloomsbury series in clinical science*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin; 1988;1-32.

Manns JM, Brenna KJ, Colman RW, Sheth SB. Differential regulation of human platelet responses by cGMP inhibited and stimulated cAMP phosphodiesterases. *Thromb Haemost* 2002;87:873-79.

Marguerie GA, Thomas-Maison N, Ginsberg MH, Plow EF. The platelet-fibrinogen interaction. Evidence for proximity of the A alpha chain of fibrinogen to platelet membrane glycoproteins IIb/III. *Eur J Biochem* 1994;139:5-11.

Marshall SJ, Senis YA, Auger JM, Feil R, Hofmann F, Salmon G, Peterson JT, Burslem F, Watson SP. GPIIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood* 2004;103:2601–09.

Maschberger P, Bauer M, Baumann-Siemons J, Zangl KJ, Negrescu EV, Reininger AJ and Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem* 2000;275:19159-66.

Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F and Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 1999;189:1255-64.

Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-96.

Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Heinzmann U and Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003;197:41-49.

Massberg S, Gruener S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Mueller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U and Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator stimulated Phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* 2004;103:136-42.

Menshikov MY, Ivanova K, Schaefer M, Drummer C and Gerzer R. Influence of the cGMP analog 8-PCPT-cGMP on agonist-induced increases in cytosolic ionized Ca²⁺ and on aggregation of human platelets. *Eur J Pharmacol* 1993;245:281-84.

Münzel T, Feil R, Mülsch A, Lohmann SM, Hofmann F and Walter U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosin 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* 2003;108:2172-83.

Moers A, Nieswandt B, Massberg S, Wettschureck N, Gruner S, Konrad I, Schulte V, Aktas B, Gratacap MP, Simon MI, Gawaz M and Offermanns S. G13 is an essential mediator of platelet activation in haemostasis and thrombosis. *Nat Med* 2003;9:1418-22.

Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F and Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signalling. *J Cell Biol* 2003;160(5):719-27.

Negrescu EV, de Quintana KL, Siess W. Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation of novel protein substrates through an integrin- and (Ca²⁺)-independent mechanism. *J Biol Chem* 1995;270:1057-61.

Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J and Chakraborty T. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* 1997;16:5433-44.

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

Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20:2120-30.

Nieswandt B, Schulte V, Zywiec A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002;277:39493-98.

Nieswandt B and Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-61.

Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318:470-72.

Nolte C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P and Walter U. Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J Biol Chem* 1991;266:14808-12.

Nolte C, Eigenthaler M et al. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating platelet inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1994;48(8):1569-75.

Obergfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA and Shattil SJ. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIb beta3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2001;276:5916-23.

Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997;389:183-86.

Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem* 2000;381:389-96.

Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99:1293-1304.

Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 2005;19:898-909.

Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R and Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998;17:3045-51.

Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P and Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;135:105-49.

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-43.

Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:324-32.

Pollard TD and Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003;112:453-65.

Pula G., K. Schuh, K. Nakayama, K. I. Nakayama, U. Walter and A. W. Poole: PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood* 2006;108:4035-44.

Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch BM and Walter U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J* 1992;11:2063-70.

Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D and Walter U. Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7956-60.

Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM and Walter U. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* 1995;14:1583-89.

Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM and Walter U. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett* 1996;399:103-07.

Reinhard M, Jarchau T and Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem* 2001;26:243-49.

Retzer M, Siess W, Essler M. Mildly oxidised low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin. *FEBS Lett* 2000;466:70-74.

Renfranz PJ and Beckerle MC. Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:88-103.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986;314:488.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-09.

Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.

Rottner K, Behrendt B, Small JV and Wehland J. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1999;1:321-22.

Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8(11):1227-34.

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1335-42.

Samara WM and Gurbel PA. The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2003;14:65-79.

Savage B, Saldivar E and Ruggeri ZM. Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 1996;84:289-97.

Savage B, Almus-Jacobs F and Ruggeri ZM. Specific Synergy of Multiple Substrate-Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow. *Cell* 1998;94:657-66.

Sandberg M, Butt E, Nolte C, Fischer L, Halbrugge M, Beltman J, Jahnsen T, Genieser HG, Jastorff B, Walter U. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3',5'- monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *J Biochem* 1991;279(Pt 2):521-27

Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004;109:1819-22.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F and Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 2000;404:197-201.

Schoenhagen P, Mc Erlean ES, Nissen SE. The vulnerable coronary plaque. *J Cardiovasc Nurs* 2000;15:1-12.

Schultze M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 1865;1:1-42.

Schwarz UR, Walter U et al. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 2001;62(9):1153-61.

Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997;100:91-95.

Shattil SJ, Kashiwagi H and Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998;91:2645-57.

Siess W, Siegel FL and Lapetina EG. Arachidonic acid stimulates the formation of 1,2- diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. *J Biol Chem* 1983;258:11236-42.

Siess W, Weber PC, Lapetina EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during platelet shape change induced by thrombin or platelet-activating factor. Epinephrine does not induce phospholipase C activation or platelet shape change. *J Biol Chem* 1984;259:8286-92.

Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:58-178.

Siess W, Lapetina EG. Prostacyclin inhibits platelet aggregation induced by phorbol ester or Ca²⁺-ionophore at steps distal to activation of protein kinase C and Ca²⁺-dependent protein kinases. *Biochem J* 1989;258:57-65.

Siess W and Lapetina EG. Platelet aggregation induced by alpha 2-adrenoceptor and protein kinase C activation. A novel synergism. *Biochem J* 1989;263, 377-85.

Siess W, Lapetina EG. Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. *Biochem J* 1990;271:815-19.

Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem* 2004;92:1086-94.

Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H and Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1998;273:20029-35.

Smolenski A et al. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;358(1):134-39.

Smolenski A, Poller W, Walter U and Lohmann SM. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 2000;275:25723-32.

Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2008.

Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets* 2003;14(6):381-90.

Teichmann L. Stromabwärts der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Thrombozyten. Dissertation 2008.

Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1979;24:145-49.

Towbin H, Staehelin T et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4350-54.

Vasioukhin V and Fuchs E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:76-84.

Vogel SN. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med* 1999;107:479-87.

Walders-Harbeck B, Khatlina S, Hinssen H, Jockusch B and Illenberger S. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett* 2002;529:275.

Waldmann R, Nieberding M and Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem* 1987;167:441-48.

Wall ME, Francis SH et al. Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2380-85.

Wallis RM, Corbin JD, Sharron HF and Ellis P. Tissue Distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999;83:3C-12C.

Walter U, Eigenthaler M, Geiger J and Reinhard M. Role of cyclic nucleotide dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:237-49.

Walter U, Geiger J, Haffner C, Markert T, Nehls C, Silber RE and Schanzenbacher. Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors. *Agents Actions Suppl* 1995;45:255-68.

Wentworth JKT, Pula G, Poole AW. *Biochem J* 2006;393:555-64.

Wettschureck N, Moers A, Offermanns S. Mouse models to study G-protein-mediated signalling. *Pharmacology & Therapeutics* 2004;101:75-89.

White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994:397-413.

Wilhelm B and Siess W. Activation of the cloned platelet thrombin receptor decreases the pertussis-toxin-dependent ADP-ribosylation of the membrane and soluble inhibitory guanine-nucleotide-binding-alpha proteins. Inhibition by the prostacyclin analog, iloprost. *Eur J Biochem* 1993;216:81-88.

Woodside DG, Liu S and Ginsberg MH. Integrin activation. *Thromb Haemost* 2001;86:316-23.

Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D and Brass L. Signaling through G_i family members in platelets. *J Biol Chem* 2002;277:46035-42.

Zimmer M et al. Cloning of the VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) genes in human and mouse: structure, sequence, and chromosomal localization. *Genomics* 1996;36(2):227-33.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten danken, die durch das angenehme Arbeitsklima zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siess für die Überlassung des interessanten Themas, die stetige Gesprächsbereitschaft, die vielen hilfreichen Verbesserungsvorschläge und Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P.C. Weber und **Herrn Prof. Dr. C. Weber** für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten.

Herrn Prof. Dr. U. Walter vom Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg für die Kooperation.

Herrn Prof. Dr. M. Eigenthaler vom Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg für die Aufzucht und Bereitstellung der VASP-Mäuse und die stetige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. M. Gawaz von der Medizinischen Klinik I der TU München/ Deutsches Herzzentrum für die Zusammenarbeit und Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Deutschen Herzzentrum.

Herrn Prof. Dr. S. Maßberg und **Frau Dr. Sabine Grüner** von der Medizinischen Klinik I der TU München/ Deutsches Herzzentrum für die Versorgung der Mäuse, Hilfe bei vielen experimentellen Fragestellungen und die gute Zusammenarbeit.

Nicole Wilke und **Pankaj Goyal** für die technische Unterstützung bei der Arbeit.