

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. U. Walter**

**Die Rolle des Proteins VASP für die Proliferation und
Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Katharina Krohne
aus Heidelberg**

Würzburg, Januar 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Eigenthaler
Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter
Dekan: Prof. Dr.med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005

Die Promovendin ist Ärztin.

1	Einleitung	1
1.1	ENTWICKLUNG DER BLUTZELLEN	1
1.1.1	URSPRUNG UND ENTWICKLUNG HÄMATOPOETISCHER ZELLEN	2
1.1.2	DER EINFLUSS VON ZYTKINEN AUF DIE MEGAKARYOPOESE	4
1.1.2.1	Thrombopoetin	4
1.1.2.2	Interleukin 6	4
1.1.2.3	Interleukin 11	5
1.1.3	POLYPLOIDIE	6
1.2	ENTSTEHUNG VON THROMBOZYTEN AUS MEGAKARYOZYTEN	6
1.3	THROMBOZYTEN	8
1.4	HÄMOSTASE	9
1.4.1	PRIMÄRE HÄMOSTASE	9
1.4.2	SEKUNDÄRE HÄMOSTASE	10
1.5	HEMMUNG DER THROMBOZYTENAGGREGATION	10
1.5.1	REGULATION DER ADENYLATCYCLASE- UND DER GUANYLATCYCLASE-AKTIVITÄT	11
1.5.2	PHOSPHODIESTERASEN	12
1.5.3	CAMP- UND CGMP-ABHÄNGIGE PROTEINKINASEN	12
1.5.4	VASP	13
1.6	ZIEL DER ARBEIT	15
2	Material	16
2.1	ANTIKÖRPER	16
2.2	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	17
2.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
2.4	GERÄTE, SOFTWARE	19
3	Puffer und Lösungen	20
3.1	PUFFER I	20
3.2	PUFFER II	20
3.3	PUFFER III	20

3.4	PUFFER IV	20
3.5	PUFFER V	20
3.6	SDS-STOPP	20
3.7	ELEKTROPHORESEPUFFER	21
3.8	TRANSFERPUFFER	21
3.9	WASCHPUFFER	21
4	Methoden	22
4.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE THROMBOZYTENANALYSE	22
4.1.1	BLUTENTNAHME UND THROMBOZYTENISOLIERUNG	22
4.1.2	STIMULATION DER THROMBOZYTEN	22
4.2	WESTERNBLOT	25
4.2.1	GEWINNUNG VON WESTERN-BLOT-PROBEN AUS THROMBOZYTEN	25
4.2.1.1	Blutentnahme und Waschen der Thrombozyten	25
4.2.1.2	Stimulation der Thrombozyten	26
4.2.1.3	Thrombozytenstandard	27
4.2.2	SDS POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	28
4.3	IMMUNFLUORESCENZ MIKROSKOPIE VON THROMBOZYTEN MIT VASP-ANTIKÖRPERN	31
4.4	MAUSSTAMMZELLEN	33
4.4.1	GEWINNUNG DER STAMMZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK	33
4.4.2	SEPARATION DER STAMMZELLEN DURCH MACS SCA-1 MULTISORT KIT	34
4.4.2.1	Magnetische Markierung der Zellen	34
4.4.2.2	Magnetische Auftrennung der Zellen	35
4.4.3	FÄRBUNG DER ZELLEN MIT ANTIKÖRPERN	35
4.4.4	KULTIVIERUNG UND ANSCHLIEBENDE ANALYSE DER ZELLEN	38
5	Ergebnisse	40
5.1	TEIL 1:	40
5.1.1	SPEZIFITÄT DES ANTIKÖRPERS 5C6	40
5.1.2	CHARAKTERISIERUNG DES ANTIKÖRPERS 5C6 DURCH WESTERNBLOT-ANALYSE UND ZEITKINETIK DER VASP-PHOSPHORYLIERUNG AN SERIN ¹⁵⁷	41

5.1.3 VERGLEICHENDE ZEITKINETIK DER VASP-PHOSPHORYLIERUNG AN SERIN ²³⁹ MIT DEM BEKANNTEN ANTIKÖRPER 16C2	44
5.1.4 SYNERGISTISCHER EFFEKT VON PGE ₁ UND SNP AUF DIE VASP-PHOSPHORYLIERUNG	47
5.1.5 ANALYSE DER VASP-PHOSPHORYLIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	48
5.1.5.1 Analyse der VASP-Phosphorylierung in stimulierten Thrombozyten mit dem 5C6-Antikörper in der FACS-Analyse	48
5.1.5.2 Analyse der VASP-Phosphorylierung in stimulierten Thrombozyten mit dem 16C2-Antikörper in der FACS-Analyse	50
5.1.6 IMMUNFLUORESCENZ VON THROMBOZYTEN MIT DEN PHOSPHOSPEZIFISCHEN VASP-ANTI-KÖRPERN	53
5.2 TEIL 2:	57
5.2.1 ENTSPRECHEN DIE ISOLIERTEN ZELLEN DER GESUCHTEN STAMMZELLPOPULATION?	58
5.2.2 PROLIFERATION	59
5.2.2.1 Proliferation der Stammzellen der VASP Wildtypmäuse	59
5.2.2.2 Proliferation der Stammzellen der VASP knock out Mäuse	60
5.2.3 AUSDIFFERENZIERUNG ZU CD41 POSITIVEN ZELLEN	61
5.2.3.1 Differenzierung der Stammzellen der VASP Wildtypmäuse	61
5.2.3.2 Differenzierung der Stammzellen der VASP knock out Mäuse	62
 6 Diskussion	 65
 7 Zusammenfassung	 72
 8 Literaturverzeichnis	 73

Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFU	koloniebildende Einheit
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EDRF	endothelium derived relaxing factor
ENA	Drosophila Enabled
EPO	Erythropoetin
ERK	extrazellulär responsive Kinase
EVH	Ena-VASP homologe Domäne
EVL	Ena-VASP-like Protein
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	fluorescence channel
FSC	forward scatter
GC	Guanylatzyklase
GMP	Guanosinmonophosphat
GP	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	horse-radish peroxidase
IL-11	Interleukin 11
IL-12	Interleukin 12
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MW	molekularer Gewichtsmarker
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PGE	Prostaglandin
PGI	Prostazyklin
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PRP	plättchenreiches Plasma
PRR	Prolinreiche Region
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SNP	Sodium Nitroprusside
SSC	side scatter
TBS	Tris buffered saline
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TPO	Thrombopoetin
VASP	Vasodilatator stimulierendes Phosphoprotein
VSMS	glatte Gefäßmuskelzellen
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Das Knochenmark ist der Bildungsort aller Blutzellen, die dort aus sogenannten Vorläuferzellen entstehen (*Übersicht siehe Abb. (1)*). Zu den hämatopoetischen Vorläuferzellen gehören die Megakaryozyten, aus denen Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, gebildet werden. Megakaryozyten entstehen aus pluripotenten Stammzellen, ihre Reifung beinhaltet mehrere Verdopplungen der DNA ohne anschließende Teilung des Kerns und des Zytoplasmas. Die daraus resultierenden Riesenzellen haben ihren Sitz im blutbildenden Knochenmark nahe der Gefäßwände, um das Eintreten der Thrombozyten in die Blutbahn zu erleichtern. Im Laufe ihrer Reifung bilden Megakaryozyten schlanke Zytoplasmaausläufer, an deren Enden Thrombozyten abgeschnürt werden (Stenberg and Levin 1989; Cramer et al. 1997; Italiano et al. 1999). (*Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs gibt Abb. (2)*)

Thrombozyten sind also scheibenförmige, kernlose Zellen. Sie zirkulieren im Blutkreislauf und stellen die Unversehrtheit des Gefäßsystems sicher. Bei Verletzung heften sich die Thrombozyten an extravaskulärem Gewebe an und führen zusammen mit den Gerinnungsfaktoren zu einem schnellen Wundverschluss und zu einer Wiederherstellung des normalen Blutflusses in den beschädigten Gefäßen.

Mangel oder Störungen der Thrombozytenfunktion können zu unkontrollierbaren Blutungen, Thrombosen oder Embolien führen. Daher ist es wichtig, sowohl die Funktion der Thrombozyten, als auch deren Bildung noch genauer zu verstehen, um eine bessere Behandlung beziehungsweise Prävention dieser Krankheiten zu erreichen.

1.1 Entwicklung der Blutzellen

Im menschlichen Embryo erscheinen Ansammlungen von Stammzellen des hämatopoetischen Systems (Blutinseln) in der 3. Entwicklungswoche (Sieff 1998). Im 3. Entwicklungsmonat wandern einige dieser Zellen in die Leber, die dann bis kurz vor der Geburt eine Hauptquelle der Blutbildung darstellt. Auch Milz, Thymus und Lymphknoten tragen zur Blutbildung bei. Ab dem 4. Entwicklungsmonat beginnt die Blutbildung im Knochenmark, das bei der Geburt des reifen, gesunden Neugeborenen die komplette Produktion an Blutzellen übernommen hat. Beim Kleinkind ist noch das gesamte Knochenmark an der Blutbildung beteiligt (rotes Knochenmark). Im Laufe der Adoleszenz degeneriert ein Großteil des roten Knochenmarks zu Fett und beschränkt

sich später auf die Wirbelkörper, Rippen, Sternum, Schädel, Becken und die proximalen Epiphysen von Femur und Humerus. (Robbins 1999)

1.1.1 Ursprung und Entwicklung hämatopoetischer Zellen

Die korpuskulären Bestandteile des Blutes (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten) haben alle ihren Ursprung in einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Sieff 1998), die im Laufe der embryonalen Entwicklung aus omnipotenten Stammzellen entstanden sind. Aus ihr entwickeln sich die Stammzellen der myeloiden und die der lymphatischen Blutzellen (*siehe Abb. (1)*). Aus der lymphatischen Stammzelle gehen sogenannte „committed stem cells“ für T-Lymphozyten, B-Lymphozyten/Plasmazellen und Natürliche Killerzellen hervor. (Kondo 1997) „Committed stem cells“ haben zwar noch die Eigenschaft von Stammzellen, das heißt, sie können sich selbst replizieren, aber die Art ihrer Weiterentwicklung ist bereits festgelegt. Auf die Entwicklung der Lymphozyten wird hier jedoch nicht näher eingegangen, nur soweit, dass es im Gegensatz zur myeloiden Linie, im Verlauf der Reifung keine morphologisch erkennbaren Zwischenschritte gibt (Robbins 1999).

Aus der multipotenten myeloischen Stammzelle gehen drei „committed stem cells“ hervor, die nach ihrer Ansammlung im Knochenmark koloniebildende Einheiten (CFU) genannt werden. CFU-Eo determiniert die Linie für eosinophile Granulozyten. CFU-G/M haben noch die Möglichkeit sich in zwei Stammzellen zu entwickeln, aus der entweder Monozyten oder Granulozyten hervorgehen. Das gleiche gilt für die E/Mega-Stammzelle, aus der Stammzellen für die Bildung von Thrombozyten oder die Bildung von Erythrozyten hervorgehen (Robbins 1999). Eine bipotente E/Mega-Vorläuferzelle wurde sowohl in der Kultur humaner (Debili et al. 1996), als auch in der Kultur muriner (Papayannopoulou et al. 1996) Knochenmarkszellen beschrieben. Alle CFU-Zellen entwickeln sich über morphologisch identifizierbare Vorläuferstufen, die sogenannten Blasten, zu den endgültigen ausdifferenzierten Zellen (Robbins 1999).

Eine wichtiges Glied in der Kontrolle der Erythropoese und Megakaryopoese wurde auch in der biologischen Aktivität einiger Zytokine wie zum Beispiel Erythropoetin (EPO), Thrombopoetin (TPO), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11) gesehen. Dies sind Wachstumsfaktoren, die hauptsächlich für die Differenzierung dieser Linien verantwortlich sind. Tiere, bei denen der TPO-Spiegel künstlich erhöht wurde entwickelten nicht nur einen Anstieg der zirkulierenden Thrombozyten im Blut, sondern auch eine größere Anzahl von megakaryoiden Vorläuferzellen. Dies verhielt sich

identisch im Bezug auf EPO, Erythrozyten und deren Vorläufer (Krantz 1991; Kaushansky 1995).

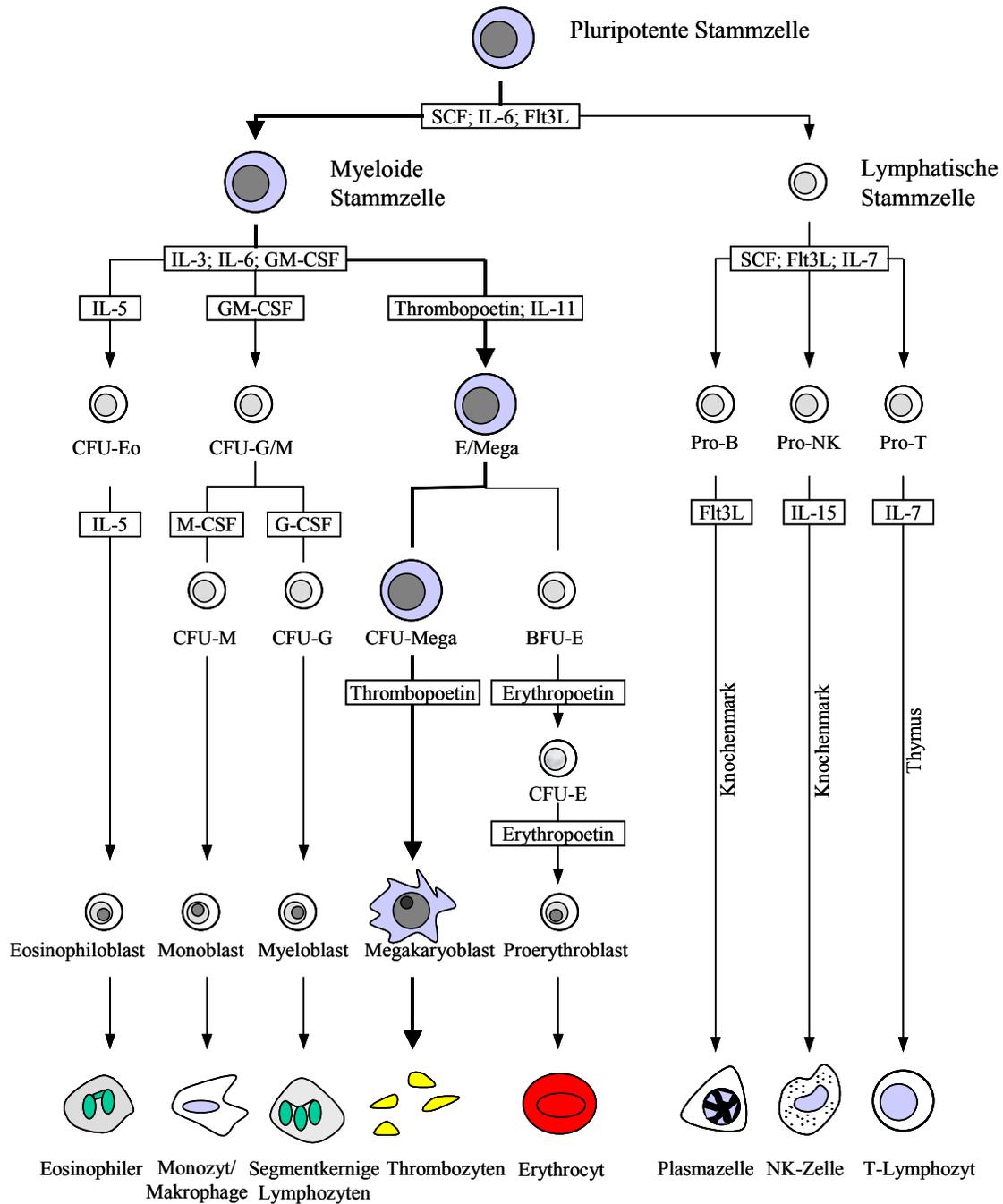


Abb. (1): Hämatopoese. Entwicklung der einzelnen Zellen des hämatopoetischen Systems aus einer pluripotenten Stammzelle. Diverse Zytokine (in Kästchen) beeinflussen die Ausdifferenzierung zu den einzelnen Linien und deren reifen Endprodukten.

SCF: stem cell factor; IL: Interleukin ; Flt3L: Flt3 Ligand; GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen colony stimulating factor

1.1.2 Der Einfluss von Zytokinen auf die Megakaryopoese

1.1.2.1 Thrombopoetin

Der Terminus Thrombopoetin (TPO) wurde 1958 geprägt und zwar als Substanz, die für die Thrombozytenproduktion nach induzierter Thrombozytopenie, verantwortlich war (Kelemen et al. 1958). TPO ist ein aus 332 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein, das in der Leber, der Niere, im Knochenmarksstroma und in einigen anderen Geweben gebildet wird. Der TPO-Blutspiegel korreliert in den meisten Fällen umgekehrt proportional mit der Menge an Thrombozyten und Megakaryozyten. Das heißt, hohe Thrombozytenzahlen haben einen niedrigen TPO-Spiegel zur Folge und umgekehrt (Koike et al. 1998). Es wird vermutet, dass der TPO-Spiegel abhängig von seiner rezeptorvermittelten Aufnahme in die Zellen ist. Wenn die Thrombozytenzahlen hoch sind, wird TPO vermehrt von Thrombozyten aufgenommen, was zu einem Absinken des TPO-Plasmaspiegels führt und damit die Megakaryozytenproduktion bremst (Kuter and Rosenberg 1995; McCarty et al. 1995; Fielder et al. 1996; Stefanich et al. 1997). Einige Fälle wie zum Beispiel Entzündungen oder Infektionen (Schoffski et al. 2002), Lebersversagen (Tacke et al. 2002) oder hämatologische Störungen können zu unerwartet hohen oder niedrigen TPO-Spiegeln führen. Zum Beispiel führt Interleukin 6 (IL-6), ein Mediator entzündlicher Prozesse, zu einer Steigerung der TPO-Produktion in den Hepatozyten (Kaser et al. 2001). Der Rezeptor für das TPO ist der c-Mpl-Rezeptor (Vigon et al. 1992). Die Veränderung der Rezeptorkonformation nach Ligandenbindung führt zu einer Kinaseaktivierung durch Transphosphorylierung (Ihle 1995) und führt darüber hinaus zu einer Vielzahl von verschiedenen Signalereignissen in der Zelle (Kaushansky 2003).

Es wird vermutet, dass der Effekt von TPO auf Megakaryozyten aus zwei Phasen besteht. TPO steigert die Proliferation primitiver Vorläuferzellen inklusive ihrer später folgenden Ausdifferenzierung zu Megakaryozyten. Dies führt zu einem temporären Arrest dieser Zellen in der G0-Phase. Die nun voll ausdifferenzierte Zelle antwortet auf TPO jetzt mit anderen Signalen als ihr unreifer Vorläufer. Es kommt zu Endomitosen und der daraus resultierenden Polyploidie (Jackson C 1997).

1.1.2.2 Interleukin 6

Der Einfluss von Interleukin 6 (IL-6) auf die Megakaryopoese wird kontrovers diskutiert. IL-6 spielt eine wichtige Rolle in entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen (Akira et al. 1993; Tilg et al. 1994; Jordan et al. 1995). Zum Beispiel

zeigen Mäuse, denen IL-6 fehlt, eine deutlich geschwächte „Akut-Phase-Antwort“ (Kopf et al. 1994). Die Gabe von IL-6 beim Menschen wurde mit einem Anstieg der Zahl zirkulierender Thrombozyten im Blut assoziiert (Weber et al. 1993; van Gameren et al. 1994; D'Hondt et al. 1995; Gordon et al. 1995; Lazarus et al. 1995; Schrezenmeier et al. 1995; Veldhuis et al. 1995). Außerdem waren die IL-6 Serumspiegel bei Patienten mit reaktiver Thrombozytose signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Hollen et al. 1991; Hollen et al. 1992). Ob der thrombozytopoetische Effekt von IL-6 in vivo durch eine direkte Stimulation der Vorläuferzellen oder indirekt vermittelt wird ist unbekannt. Es gibt sowohl Publikationen, die einen direkten steigernden Einfluss von IL-6 auf die Megakaryopoese propagieren (Carver-Moore et al. 1996; de Sauvage et al. 1996; Gainsford et al. 2000), als auch die Theorie, dass IL-6 als Akut-Phase-Protein die Bildung von TPO induziert und somit indirekt über TPO auf die Megakaryopoese wirkt (Kaser et al. 2001).

1.1.2.3 Interleukin 11

Interleukin (IL-11) ist ein aus Stromazellen entstehendes Zytokin, das multiple Effekte auf unterschiedliche Systeme des Körpers hat (Teramura et al. 1996). Neben der Stimulation der Megakaryopoese zeigte sich auch in unzähligen Experimenten an Tiermodellen und in klinischen Versuchen an Patienten, die an akuten oder chronischen entzündlichen Erkrankungen litten (Walmsley et al. 1998; Anguita et al. 1999; Sands et al. 1999; Trepicchio et al. 1999), dass IL-11 eine antiinflammatorische und mukosaprotektive Wirkung hat. Es senkt die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 und IL-12, die von Makrophagen sezerniert werden (Redlich et al. 1996; Trepicchio et al. 1996; Leng and Elias 1997; Trepicchio et al. 1997). Ein rekombinantes IL-11 war das erste kommerziell erwerbliche thrombopoetische Zytokin. Nach myelosuppressiver Chemotherapie senkt es den Bedarf an Thrombozytenkonzentraten (Demetri 2000). Bei Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs führte die Gabe von IL-11 nach Hochdosis-Chemotherapie zu einem dosisabhängigen Anstieg der Vorläuferzellen im Knochenmark, der Megakaryozyten und der Thrombozytenzahlen. Allerdings litten viele Frauen auch unter massiven Nebenwirkungen, die von Müdigkeit, Muskelschmerzen, Ödemen, Anämie bis hin zu kardiovaskulären Ereignissen reichten (Gordon et al. 1996). Ein weiterer möglicher Einsatzort für IL-11 ist eine milde Form der Hämophilie A oder bei der von Willebrand Erkrankung. Kürzlich konnte im

Mausmodell bewiesen werden, dass IL-11 die Produktion des von-Willebrand-Faktors und des Faktors VIII steigert (Denis et al. 2001).

In vitro verstärkt IL-11 das Wachstum früher Vorläuferzellen und fördert die Megakaryo- und Erythropoese.

1.1.3 Polyploidie

Ein besonderes Merkmal der Megakaryozyten ist die Polyploidie. Sie entsteht durch wiederholte DNA-Replikationen ohne anschließende Zellteilung (Ravid et al. 2002). Dieser endomitotische Zellzyklus führt zu Zellen, die einen DNA-Gehalt von bis zu $128n$ haben. N entspricht der Anzahl haploider Chromosomensätze der Zelle. Im Laufe der Reifung kommt es ab einem Stadium von $8n$ zur Fragmentierung der polyploiden Zellen in Thrombozyten (Jackson C 1997). Ein direkter Zusammenhang zwischen DNA-Menge, Megakaryozyten-Größe und Thrombozyten-Produktion konnte gezeigt werden (Odell et al. 1976; Mattia et al. 2002). Megakaryozyten mit einem hohen Ploiditäts-Grad bilden mehr Thrombozyten als diejenigen mit einer niedrigeren Ploidität. Veränderungen der Ploidität in einigen Krankheiten (zum Beispiel myeloproliferative Erkrankungen und Myelofibrose) werden entweder mit ineffektiver oder übermäßiger Thrombozytenproduktion in Verbindung gebracht (Rabellino et al. 1984; Kobayashi et al. 1993; Jacobsson et al. 1996; Hofmann et al. 2000). Der Prozess der Ploidisierung, auch bekannt als Endomitose, ist charakterisiert durch das Fehlen der Zytokinese am Ende des Zellzyklus (Nagata et al. 1997; Vitrat et al. 1998). Die Endomitose wurde ursprünglich definiert als Eintritt in die Mitosephase mit einer Blockierung in der Prophase, ohne dass es zu einem Zerfall der Kernmembran kommt (Geitler 1953). Der Ausdruck Endomitose wird heutzutage gebraucht, um den Zellzyklus der Megakaryozyten zu beschreiben. Dieser beinhaltet den Eintritt der Zelle in die Mitosephase ohne Abschluss der Anaphase B und der Zytokinese zusammen mit dem Zusammenbruch der Kernhülle (Zimmet and Ravid 2000). Aufgrund dieses Stopps im späten Verlauf der Mitose wird vermutet, dass Proteine wie z. B. das Stathmin, die eine Rolle in der Regulation der Mitosespindel spielen, eine Schlüsselrolle in der Polyploidisierung besitzen (Rubin et al. 2003).

1.2 Entstehung von Thrombozyten aus Megakaryozyten

Jeder reife Megakaryozyt bildet hunderte von Thrombozyten und entlässt sie in den Blutkreislauf. (Kaufman et al. 1965; Trowbridge et al. 1984) Nach Polyploidisierung

des Kernmaterials und der Reifung des Zytoplasmas (*siehe Abb. (2) Bild 1*) wandeln sich die Megakaryozyten in sogenannte „Proplatelets“ um, einer Zwischenstufe auf dem Weg zum reifen Thrombozyten. Auch wenn „Proplatelets“ zum ersten Mal in elektronenmikroskopischen Bildern von Knochenmarksinus bemerkt wurden (Thiery and Bessis 1956; Becker and De Bruyn 1976), stammen die meisten Informationen aus der Kultivierung primärer Megakaryozyten. Die Transformation des Zytoplasmas der Megakaryozyten beginnt mit einer Erosion an einem Pol und setzt sich über die ganze Zelle fort, bis das gesamte Zytoplasma in „Proplatelets“ umgewandelt ist (Italiano et al. 1999). Zu Beginn der „Proplatelet-Bildung“ strukturieren die Megakaryozyten ihr Zytoplasma zu dicken Ausläufern, den Pseudopodien um (*siehe Abb. (2) Bild 2*), die direkt an der sich vorwölbenden Plasmamembran Bündel aus Mikrotubuli besitzen. Die Pseudopodien verlängern sich zu „Proplatelet-Ausläufern“ (*siehe Abb. (2) Bild 3*). Sie enthalten zahlreiche Bündel aus Mikrotubuli, die parallel zur Längsachse der Pseudopodien verlaufen. Diese Mikrotubuli setzen sich bis in die aufgetriebenen Enden der „Proplatelets“ fort, bilden dort eine Schleife und treten wieder in die „Proplateletschäfte“ ein. Die „Proplatelets“ nehmen wiederholt U-förmige Gestalt an und bilden in diesem Bereich aktinvermittelt verzweigte Strukturen aus, aus denen neue Ausläufer hervorgehen (*siehe Abb. (2) Bild 4*). Bei den „Proplatelet-Ausläufern“ kommt es zu Einschnürungen, die ihnen eine perlenkettenartige Erscheinung vermitteln (*siehe Abb. (2) Bild 5*). Dieses Phänomen im Bereich der „Proplatelets“ stellt instabile Strukturen dar, die vermutlich Thrombozytenmaterial enthalten, das gerade zur Spitze transportiert wird. Die Reifung der „Proplatelets“ nähert sich ihrem Ende, wenn sich aus dem Mikrotubuli-Bündel ein einzelner Mikrotubulus ablöst und sich zu einer Spule aufwickelt. Dies gibt den reifen Thrombozyten ihre typische diskoidale Form und hilft, Granula und Organellen in der „Proplatelet-Spitze“ zurückzuhalten. „Proplatelets“ werden von der Megakaryozyte nach Retraktion abgeschnürt (*siehe Abb. (2) Bild 6*) (Italiano et al. 1999). Es ist bisher ungeklärt, ob Megakaryozyten voll entwickelte Thrombozyten oder „Proplateletketten“ in den Blutkreislauf entlassen. Bekannt ist, dass ganze oder fragmentierte Megakaryozyten zirkulieren (Melamed et al. 1966; Hansen and Pedersen 1978) und es ist gut vorstellbar, dass die Thrombozytenreifung in den Gefäßen abgeschlossen wird (Behnke and Forer 1998), insbesondere im ersten Kapillarbett, zu denen sie nach Eintritt in den Blutkreislauf gelangen, wie zum Beispiel die Lunge. Es wurde berichtet, dass die Zahl an Thrombozyten in der Pulmonalarterie höher sei als in der Aorta (Levine et al. 1993).

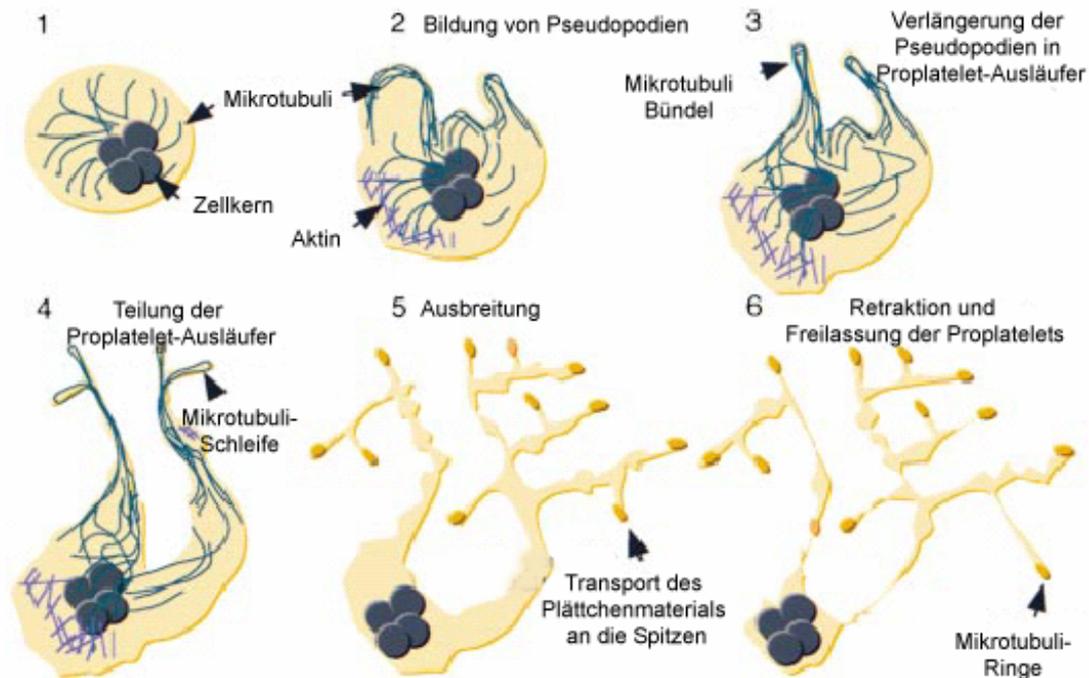


Abb. (2): Modell der Thrombozytenproduktion modifiziert nach (Italiano et al. 1999). Erklärung der einzelnen Punkte siehe 1.2

1.3 Thrombozyten

Thrombozyten sind diskoide, kernlose Zellfragmente, die auf Grund ihres fehlenden Zellkerns nur noch begrenzt zur Proteinsynthese fähig sind. Sie sind mit 2-4µm Durchmesser die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes mit einer Häufigkeit von 150 000 bis 450 000 pro µl Blut. Die physiologische Überlebenszeit der Thrombozyten im peripheren Blutstrom beträgt 7-10 Tage. Der Abbau der Thrombozyten erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz. Etwa ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert und steht im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil. Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie ADP, Thrombin oder Adhäsion an spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix führen zu einer Formveränderung „shape change“ mit Bildung von Pseudopodien und daraus folgend einer Oberflächenzunahme.

Die Thrombozyten sind von einer zelltypischen Plasmamembran aus polarisierten Phospholipiden umgeben, in die Membranproteine eingelagert sind. Die Thrombozyten besitzen zwei besondere Membransysteme: einmal das „demarcation membrane system“ mit dem offenen kanalikulären System, das weit in die Thrombozyten hineinreicht und über Poren mit dem Extrazellularraum verbunden ist und so als Kanal

für die Granulasekretion fungiert und außerdem das dichte tubuläre System ohne Kontakt zum Extrazellulärraum. Es ist ein Abkömmling des rauhen Endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten und ein Hauptspeicherort für Ca^{2+} . Im Inneren der Thrombozyten befinden sich neben dem Zytoskelett aus Aktin, Myosin und Mikrotubuli zahlreiche Organellen. Sie beinhalten Mitochondrien, Glycogenspeicher und drei verschiedene Formen von Thrombozyten-spezifischen Speichergranula, die „dense bodies“, die α -Granula und die Lysosomen. Die „dense bodies“ enthalten eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen (ADP, ATP, Ca^{2+} , Serotonin), die den Aggregationsvorgang fördern. Die α -Granula sind zahlenmäßig am häufigsten und enthalten eine Vielzahl von Proteinen, die verschiedene biologische Funktionen wie zum Beispiel die Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation und die Koagulation beeinflussen. Die lysosomalen Granula enthalten hydrolytische Enzyme und ähneln den Lysosomen anderer Zellen (Gawaz 1999).

1.4 Hämostase

Nach Verletzungen der Gefäßwand kommt es zur Bildung eines Pfropfes durch Thrombozyten und lösliche Plasmakomponenten, die im Normalfall das Gefäßleck abdichten aber den weiteren Blutfluss im Gefäß gewährleisten. Diesen Vorgang nennt man Hämostase. Dieser lässt sich nach dem zeitlichen Ablauf in primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse einteilen.

1.4.1 Primäre Hämostase

Während der primären Hämostase kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßwandläsion. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der adhärenen Thrombozyten mit nachfolgender Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung.

Über den thrombozytären Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor (Glycoprotein (GP) Ib/V/IX) und kollagenimmobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF) wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Zellwandläsion hergestellt (Ruggeri 2003). Die Bedeutung dieses Schrittes für die Hämostase wird klar, wenn man Patienten mit dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (angeborener Funktionsdefekt des vWF) oder dem Bernard-Soulier-Syndrom (Funktionsdefekt des GP Ib/V/IX) betrachtet. Beide leiden unter einer erhöhten Blutungsneigung. Nun folgt die Stabilisierung über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren. Kollagen spielt hierbei eine besondere Rolle,

da es zu Formveränderungen „shape change“ und gleichzeitig zur Aktivierung der Thrombozyten kommt. Diese Thrombozyten bilden aus freigesetzter Arachnoidensäure Thromboxan A₂, welches nach Abgabe in den Extrazellularraum über die Bindung an einen spezifischen Thromboxanrezeptor die Aktivierung verstärkt. Zusätzlich wirkt Thromboxan vasokonstriktorisch und begünstigt so durch Verlangsamung des Blutflusses die Thrombusbildung. Des Weiteren werden Granulainhaltsstoffe freigesetzt, die sowohl autokrin 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 adhärenen Thrombozyten anregen. Verbunden werden die aktivierten Thrombozyten durch Fibrinogenbrücken über das GP IIb/IIIa. Sowohl die Fibrinogenbindung, Granulasekretion und auch „shape change“ sind Ca²⁺ abhängig. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und dem Aktivierungsgrad der Thrombozyten (Gawaz 1999).

1.4.2 Sekundäre Hämostase

Das primäre Thrombozytenaggregat ist relativ instabil. Zur Stabilisierung des Thrombozytenthrombus führt die sekundäre Hämostase, die die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die Bildung von Thrombin und Fibrin in der Umgebung des Thrombus beinhaltet. Die Gerinnungskaskade besteht aus einem intrinsischen und einem extrinsischen Flügel, die in einer gemeinsamen Endstrecke, der Thrombin- und Fibrinbildung münden. Die aktivierte Thrombozytenoberfläche ist entscheidend an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt. Die Anlagerung von Fibrin an das Thrombozytenaggregat führt über Quervernetzungen der Thrombozyten zur Konsolidierung des Thrombus. Das Thrombozyten-Fibrin-Konglomerat zieht sich zusammen und bedingt eine weitere Verfestigung des hämostatischen Blutkuchens.

1.5 Hemmung der Thrombozytenaggregation

Der Anstieg des intrazellulären cAMP und cGMP ist der wirksamste endogene Mechanismus der Thrombozyten-Inhibierung. Der Spiegel an zyklischen Nukleotiden wird hochreguliert durch die Adenylatzyklase (AC) bzw. die Guanylatzyklase (GC) und gesenkt durch Abbau durch Phosphodiesterasen. Hauptziele der zyklischen Nukleotide beinhalten die cAMP- und die cGMP-abhängige Proteinkinasen. Diese nehmen durch

Phosphorylierung von spezifischen Proteinen unmittelbar Einfluss auf das Geschehen in den Thrombozyten.

1.5.1 Regulation der Adenylatcyclase- und der Guanylatcyclase-Aktivität

ACs sind integrale Membranglycoproteine, die die Synthese von cAMP aus ATP katalysieren. Dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die AC der Thrombozyten wird durch die α -Untereinheit des stimulierenden G-Proteins ($G\alpha_s$) aktiviert und stark inhibiert durch die α -Untereinheit des Pertussis sensitiven inhibitorischen G-Proteins ($G\alpha_i$) (Offermanns 2000). Die Bindung von Prostaglandin/Prostazyklin (PGI_2 , PGE_1 , PGE_2) an seinen Rezeptor, der an G_s gekoppelt ist, führt deshalb zu einer Stimulierung der cAMP-Bildung. Rezeptoren für Adenosin und β -adrenerge Substanzen sind auch an G_s gekoppelt und aktivieren die AC. Einige Thrombozyten-Aktivatoren wie z.B. Thrombin, Epinephrin oder ADP induzieren die Freisetzung von $G\alpha_i$ und regulieren somit den cAMP-Spiegel nach unten. Dies passt gut mit der thrombozytenaktivierenden Eigenschaft dieser Agonisten zusammen, allerdings scheint ein Absinken des Thrombozyten cAMP-Spiegels nicht allein ausschlaggebend für die Aggregation zu sein, da in Thrombozyten mit selektiv aktiviertem G_q , einem Hemmstoff der AC, keine Aggregation induziert wird (Daniel et al. 1999). Für eine komplette Thrombozytenaggregation ist die Aktivierung sowohl des G_q -, als auch des G_i -gekoppelten Rezeptors erforderlich (Jin and Kunapuli 1998). Die Hemmung nur einer dieser Wege unterdrückt effektiv die Thrombozytenaggregation. Dieser Effekt wird bei den gängigen Thrombozyteninhibitoren Ticlopidin (Tiklyd[®]) und Clopidogrel (Plavix[®]) ausgenutzt. Diese binden an den G_i -gekoppelten ADP-Rezeptor ($P2Y_{AC}$) und verhindern so die ADP vermittelte Hemmung der AC (Geiger et al. 1998; Geiger et al. 1999).

Die GC existiert in löslicher und in membrangebundener Form. Allerdings enthalten Thrombozyten nur die sich im Zytoplasma befindliche lösliche Form. Die lösliche GC (sGC) enthält Häm als prosthetische Gruppe und wird aktiviert durch den „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF), Nitrovasodilatoren oder andere NO-bildende Substanzen (Ignarro 1989). Das aktivierte Enzym wandelt GTP in cGMP um. Dies führt zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) und somit zur Phosphorylierung spezifischer Zielproteine in Thrombozyten und in anderen Geweben (Nolte et al. 1994). Anhand von Thrombozyten PKG I-defizienter Mäuse konnte dessen antiaggregatorische Funktion bewiesen werden (Massberg et al. 1999).

1.5.2 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDEs) sind eine große Gruppe von Enzymen (PDE1-5), die den 3'-Phosphoester hydrolysieren, der an cAMP bzw. cGMP gebunden ist, und so die zyklischen Nukleotide in ihre inaktiven 5'-Metabolite überführen (Haslam et al. 1999). Hemmstoffe der PDEs regulieren die cAMP- und cGMP-Spiegel der Thrombozyten über einen verminderten Abbau der zyklischen Nukleotide. Die hohe Konzentration von PDE5 in Thrombozyten und in glatten Muskelzellen der Gefäße hat zur Entwicklung einiger selektiver Substanzen geführt (Haslam et al. 1999). Eine davon ist Sildenafil (Viagra[®]), die bekannt wurde für die Behandlung erektiler Dysfunktion. Dipyridamol, ein Medikament, das schon seit den 60er Jahren als koronarer Vasodilatator eingesetzt wurde, erlebte seine Renaissance durch die positiven Ergebnisse in der European Stroke Prevention Study 2 (Diener et al. 1996). Auch andere PDE5-Inhibitoren sollten sich aber als nützlich in der spezifischen Hemmung der Thrombozytenaggregation erweisen, da sie kaum vasodilatatorische Eigenschaften aufweisen (Nicholson et al. 1991).

1.5.3 cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen

Proteinkinasen, deren Aktivität vom Spiegel zyklischer Nukleotide abhängig ist, stellen eine der Haupteffektormoleküle in der Vermittlung physiologischer Effekte dar. Verglichen mit anderen Geweben und Zelltypen enthalten Thrombozyten eine relativ hohe Konzentration sowohl an cAMP abhängiger Proteinkinase (PKA) als auch an cGMP abhängiger Proteinkinase (PKG) (Waldmann et al. 1986).

Bisher konnten drei Klassen von cGMP-Rezeptorproteinen klassifiziert werden. Es konnten durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kationenkanäle, cGMP regulierte PDE's und die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) identifiziert werden. Die PKG ist in einer Vielzahl von Eukaryonten anzutreffen, dies geht von einzelligen Organismen wie dem Paramecium bis hin zum Menschen (Lohmann et al. 1997; Pfeifer et al. 1999). Zwei PKG-Gene, die PKG-I und PKG-II kodieren, konnten in Säugetieren identifiziert werden. In Thrombozyten herrscht die im Zytoplasma lokalisierte Form PKG-I in hohen Konzentrationen vor (Keilbach et al. 1992; Pfeifer et al. 1999). Die Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne induziert eine Konformationsänderung (Wall et al. 2003), die die Inhibierung des katalytischen Teils der Kinase durch den N-Terminus aufhebt und die Phosphorylierung der Substratproteine erlaubt.

Aktivierung der PKA bzw. der PKG 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).

1.5.4 VASP

Das Vasodilatator stimulierende Phosphoprotein (VASP) wurde erstmalig entdeckt und charakterisiert als wichtiges Substrat für sowohl die PKG, als auch die PKA in menschlichen Thrombozyten. (Waldmann et al. 1987; Halbrügge and Walter 1989). VASP ist das Gründungsmitglied einer Familie prolinreicher Proteine, die die ENA/VASP Protein Familie genannt wird (Gertler et al. 1995; Haffner et al. 1995; Gertler et al. 1996; Zimmer et al. 1996). Zusätzlich zu VASP umfasst diese Familie Drosophila Enabled (Ena) (Gertler et al. 1995), das Analogon von Ena bei Säugern Mena und das Ena-VASP-like Protein Evl (Gertler et al. 1996). Diese Proteine teilen hoch homologe N- und C-terminale Domänen (*siehe Abb. (3)*), die Ena-VASP homologen Domänen, bezeichnet als EVH1 und EVH2 und eine prolinreiche zentrale Domäne (Gertler et al. 1995; Haffner et al. 1995; Gertler et al. 1996; Zimmer et al. 1996). VASP ist das am gründlichsten untersuchte Mitglied der Ena/VASP-Familie. Funktionelle Untersuchungen lassen vermuten, dass es als ein sehr wichtiger Faktor an der Aktin Filament Formation beteiligt ist (Reinhard et al. 1995; Niebuhr et al. 1997; Beckerle 1998; Dramsi and Cossart 1998).

Die VASP-Phosphorylierung als Antwort auf cGMP erhöhende Substanzen (zum Beispiel Nitrovasodilatoren incl. ERDF), cAMP erhöhende Substanzen (PGE₁, PGI₂) und selektive membrangängige Aktivatoren der PKG und der PKA, korreliert eng mit 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). Diese Hemmung der Aktivierung/Aggregation der Thrombozyten ist sowohl in vitro (Schwarz et al. 2001), als auch in vivo (Massberg et al. 2004) nachweisbar.

Drei verschiedene Phosphorylierungsstellen konnten bislang in VASP biochemisch identifiziert werden (Serin¹⁵⁷, Serin²³⁹, Threonin²⁷⁸). Diese werden sowohl von der PKA als auch der PKG mit überkreuzender Selektivität phosphoryliert (*siehe Abb. (3)*) und von der Protein Phosphatase I und II dephosphoryliert (Halbrügge et al. 1990; Eigenthaler et al. 1992; Butt et al. 1994; Abel et al. 1995; Smolenski et al. 1998). Die Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷, der von der PKA bevorzugten Phosphorylierungsstelle,

führt zu einem deutlichen Shift der Molekülmasse von VASP in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) von 46 kDa zu 50 kDa (Egenthaler et al. 1992; Butt et al. 1994). Dagegen wird VASP an Serin²³⁹ bevorzugt durch die PKG phosphoryliert und stellt eine der besten in vitro Phosphorylierungsstellen der PKG dar (Butt et al. 1994). Erst durch die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin²³⁹ war die Beurteilung der VASP-Phosphorylierung auch in intakten Zellen möglich (Smolenski et al. 1998). In Experimenten mit gut charakterisierten Proteinkinase-Aktivatoren war dieser Shift in der Molekülmasse nützlich, um deren Präferenzen sowohl für die PKA als auch die PKG in intakten Zellen zu analysieren (Halbrügge et al. 1990; Egenthaler et al. 1992; Butt et al. 1994). Seit kurzem steht auch ein Antikörper gegen VASP, das an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist, zur Verfügung. Dieser Antikörper wurde jedoch noch nicht näher charakterisiert.

In Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten ist VASP assoziiert mit fokalen Kontakten, stress fibers, Zell-Zell-Kontakten und hoch dynamischen Membranregionen (Reinhard et al. 1992)

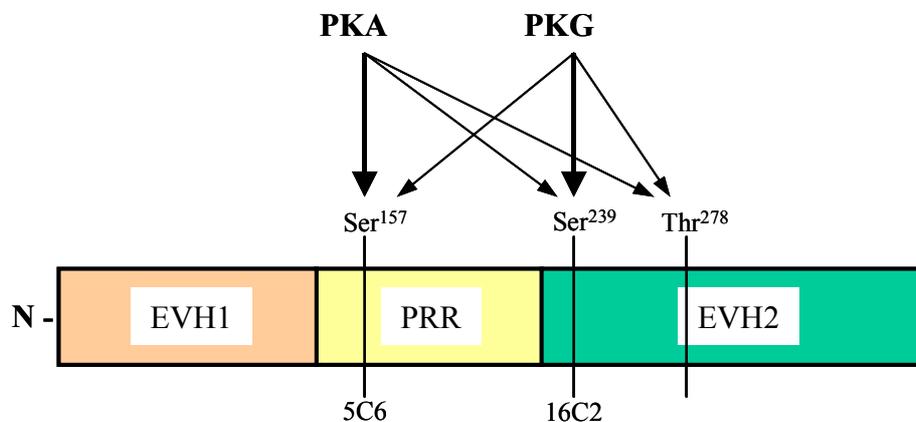


Abb. (3): Struktureller Aufbau des Vasodilatator stimulierenden Proteins. VASP besteht aus drei Domänen Ena-VASP homologe Domäne 1 und 2 (EVH1; EVH2) und der prolinreichen Region (PRR). Es enthält drei bekannte Phosphorylierungsstellen: Serin¹⁵⁷, Serin²³⁹ und Threonin²⁷⁸, die mit unterschiedlicher Präferenz von der PKA und der PKG phosphoryliert werden. Gegen Serin¹⁵⁷, und Serin²³⁹ gibt es phosphospezifische monoklonale Antikörper, welche als mab Klon 5C6 und mab Klon 16C2 bezeichnet werden.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel meiner Arbeit sollte die Charakterisierung des neuen monoklonalen Antikörpers 5C6 sein, der spezifisch die Phosphorylierung von VASP an der Position Serin¹⁵⁷ erkennt. In diesem Zusammenhang sollte genauer auf die Zeitkinetik der VASP-Phosphorylierung als Reaktion auf Stimulation entweder mit PGE₁ oder mit SNP eingegangen werden. Ziel der Experimente war auch die genauere Lokalisation von phosphoryliertem VASP in der Immunfluoreszenz.

Außerdem sollte die Rolle des Proteins VASP in der Proliferation und Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen in Megakaryozyten und Thrombozyten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2 Material

2.1 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Konzentration	Endkonzentration / Verdünnung		
						Blot	FACS	IF
M4	VASP	-	Kaninchen	Immunoglobule	Serum	1:3000	-	1:500
5C6	VASP-pSer157	-	Maus	nanoTools	50µg/ml	1:100	1:20	1:250
16C2	VASP-pSer238	-	Maus	nanoTools	50µg/ml	1:100	1:20	1:250
F20212	Maus IgG	FITC	Ziege	SIGMA		-	1:45	-
goat-anti-mouse	Maus IgG	HRP	Ziege	BioRad		1:3000	-	-
goat-anti-rabbit	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	BioRad		1:3000	-	-
Cy3-conjugated	Maus IgG	Cy3	Ziege	DIANOVA	0,7mg/ml	-	-	1:500
Cy3-conjugated	Kaninchen IgG	Cy3	Ziege	DIANOVA	0,7mg/ml	-	-	1:500
IgG2a,κ isotyp control Immunglobulin	Ratte Ig2a, κ	FITC		PharMingen		-	1:25	-
LY-6A/E	Maus Sca-1	FITC		PharMingen		-	1:25	-
anti-mouse CD41	Maus CD41	-	Ratte	PharMingen		-	1:100	-
F-6258	Ratte	FITC		SIGMA		-	1:50	-

2.2 Chemikalien und Lösungen

- 10% Formaldehyd (Methanol frei) – Polyscience Inc. – Warrington, PA/USA
- 2-Mercaptoethanol – SIGMA
- 8p-CPT-cGMP – Biolog
- Acrylam-Bisacrylam ratiophorese® Gel30 – Carl Roth GmbH + Co – Karlsruhe
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl) – SIGMA
- Ammoniumpersulfat (APS) – SIGMA
- Ampuwa – Fresenius Kabi – Bad Homburg v.d.H.
- Bromphenolblau – SIGMA
- Diethyl-Ether – Riedel de Haën
- DNase RNase free – Boehringer Mannheim
- Dulbecco's PBS (Ca²⁺; Mg²⁺; Natrium Bicarbonat frei) - LIFE TECHNOLOGIES – Paisley, Scotland
- ECL™ - Amersham – Buckinghamshire/UK
- EDTA – SIGMA
- Ethanol – J.T. Baker – Deventer/Holland
- Glucose – SIGMA
- Glycerin – MERCK - Darmstadt
- Glycine (C₂H₅NO₂) – SERVA – Heidelberg
- H₂O (aqua ad iniectabilia) – Delta Pharma – Boehringer, Ingelheim
- Interleukin 11, human – Biosource International – Ca/USA
- Interleukin 6, murin – Biosource International – Ca/USA
- MACS Sca-1 MultiSort Kit mouse – Miltenyi Biotec GmbH
- MarrowMAX™ Bone Marrow Medium – Invitrogen Corporation
- Methanol – J.T. Baker – Deventer/Holland
- Molekularer Gewichtsmarker - Biorad
- NaCl – MERCK - Darmstadt
- Non-fat dry milk – BioRad – Hercules/CA/USA
- Penicillin-Streptomycin-Solution – SIGMA
- Phalloidin - SIGMA
- Prostaglandin E₁ – SIGMA
- Rinderserumalbumin (BSA) – SIGMA
- SDS – MERCK - Darmstadt

- Sodium Nitroprusside (SNP) – SIGMA
- Temed – SIGMA
- Thrombopoetin, murin – R&D Systems
- Triton X-100 – SIGMA
- Trizma-Base – SIGMA
- Tween – SIGMA
- Ziegenserum – SIGMA

2.3 Verbrauchsmaterialien

- Blotting-Papier – Hartenstein GB33
- CELLSTAR[®] TC-Plate 24 well – greiner bio-one
- Deckgläschen Ø 15mm
- Einmalspritze 5ml – BRAUN
- FALCON[®] FACS-Röhrchen 5ml – Becton Dickinson
- FALCON[®] Röhrchen 5ml mit Deckel – Becton Dickinson
- Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand – Schleicher & Schuell
- LeucoCOUNT[™] Kit - Becton Dickinson
- MACS Separation Columns 25MS – Miltenyi Biotec GmbH
- Millipore Immobilion[™]-P; Filtertyp: PVDF; Porengröße 0,45µm
- Nadel 19G – Sterican[®]
- Nylonnetz SEFAR Nitex
- Objektträger – Waldeck 76x26mm geputz/gebrauchsfertig
- Original-Perfusor[®] Spritze OPS 50ml – B. BRAUN Melsungen AG – Melsungen
- Pre- Separation Filters – Miltenyi Biotec GmbH
- Röntgenfilm: x-ray Retina 100NIF XBD – Fotochemische Werke GmbH
- Safe-Lock Eppendorfcaps – Eppendorf – Hamburg
- SARSTEDT-Monovetten (5ml, 10ml) (Gerinnungsröhrchen mit 0.5ml, 1ml Citratlösung) - Nümbrecht
- Sarstedt-Röhrchen (13ml)
- Transparent Film (LUMOCOLOR) DIN A4 - STAEDTLER[®]

2.4 Geräte, Software

- BioRad PowerPac 200
- BioRad Trans-Blot™-Cell
- BioRad-Minigel (Mini Trans Blot) Kammer
- Blutanalysegerät Tehnicon H3 RTC™
- CELLQuest (Version 3.1f)
- Eppendorf-Thermomixer (5436)
- Eppendorf-Zentrifuge (5415C)
- Eppendorf-Zentrifuge (5417R)
- FACSCalibur – Becton Dickinson
- FotoLook SA 2.09.1 (Scannsoftware)
- Hettich-Zentrifuge (Rato Silenta/K)
- Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS SP - Leika - Heidelberg
- MiniMACS Separation Unit - Miltenyi Biotec GmbH
- NIH-Image 1.61/ppc
- Röntgenkassette: Dr. Goos-Suprema DIN 6832 24x30cm Pb
- Scanner STUDIOSTAR – AGFA
- Vortexgenie 2

3 Puffer und Lösungen

3.1 Puffer I

Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei)
5,5mM D-Glucose
0,5% Rinderserumalbumin

3.2 Puffer II

Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei)
5,5mM D-Glucose
1mM EDTA

3.3 Puffer III

Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei)
5% Ziegenserum
0,05% Triton X-100

3.4 Puffer IV

Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei)
2% BSA
0,38% Trisodiumcitrat
1U/ml DNase

3.5 Puffer V

Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei)
0,5% BSA

3.6 SDS-Stopp

200mM Tris/HCl
15% Glyzerin (v/v)
6% SDS (w/v)
0,03% Bromphenolblau (w/v)

Aqua dest.

10% 2-Mercaptoethanol

3.7 Elektrophoresepuffer

4,8g Trizma Base

11,6g Glycine

800ml Ampuwa

8ml 10% SDS.

3.8 Transferpuffer

9,1g Trizma Base

43,5g Glycine

2400ml Ampuwa

600ml Methanol

3.9 Waschpuffer

1xTBS (Tris buffered saline)

0,05% Tween-20

4 Methoden

4.1 Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse

4.1.1 Blutentnahme und Thrombozytenisolierung

Das Blut wurde von gesunden, erwachsenen, freiwilligen und aufgeklärten Spendern aus der Cubitalvene entnommen. Alle Spender waren Nichtraucher und hatten in der Woche vor der Blutentnahme keine Thrombozytenaggregationshemmer zu sich genommen.

Nach ausreichender Desinfektion wurde das Blut im Unterarm mit einer Manschette nur leicht gestaut und sofort mit Sarstedt-Monovetten, die eine Citratlösung enthielten, um die Thrombozyten für den weiteren Gebrauch im inaktiven Zustand zu stabilisieren, entnommen. Bei der Blutentnahme wurde darauf geachtet, dies langsam und mit wenig Sog zu tun, um die Thrombozyten nicht durch unnötige Scherkräfte zu aktivieren.

Das Blut wurde für 5 Minuten bei 1400rpm (330g) in einer Hettich-Zentrifuge bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Blut trennt sich durch die Zentrifugation in verschiedene Phasen auf. Die untere, dunkelrote Phase enthält überwiegend Erythrozyten, dann kommt eine, bei gesunden Personen fast nicht sichtbare Phase, der buffy coat mit Leukozyten und anschließend eine gelbe durchsichtige Phase: das plättchenreiche Plasma (PRP).

Das PRP wurde vorsichtig abpipettiert und zum Ruhen für 15 Minuten ins Wasserbad bei 37°C gestellt und anschließend für die Versuche verwendet.

4.1.2 Stimulation der Thrombozyten

Für den einen Versuch wurden kurz vor Versuchsbeginn Puffer I, bestehend aus Dulbecco's PBS (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei) mit 5,5mM D-Glucose und 0,5% Rinderserumalbumin (BSA), hergestellt. Desweiteren wurden in acht Eppendorfgefäße 46,7µl 10% methanolfreies Formaldehyd vorgelegt.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde eine Stammlösung entweder aus Prostaglandin E₁ (PGE₁) und/oder Natrium Nitroprusside (SNP) hergestellt.

- Die SNP-Kristalle wurden nach dem Abwiegen mit H₂O unter Lichtausschluss aufgelöst. Es wurde kurz vor Versuchsbeginn entweder eine 10mM oder eine 100µM Stammlösung hergestellt.

- Aus dem PGE₁-Pulver wurde mit Ethanol eine 10mM Stammlösung erstellt und bei -20°C gelagert. Aus dieser Stammlösung wurde jeweils vor Versuchsbeginn ein Aliquot entnommen und mit H₂O auf 1mM oder 10µM verdünnt.

Aus dem Gesamt-PRP wurden 700µl entnommen und je nach Versuch vermischt mit 7µl einer der Stammlösungen in einem Verhältnis von 1:100.

Von jeder Konzentration wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Es wurden Proben zu je 100µl nach 0,5, 1, 2, 5, 10 und 60 Minuten entnommen und in die Eppendorfgefäße mit 10% Formaldehyd-Lösung pipettiert (Endkonzentration 3,7%). Das Formaldehyd vernetzt primäre Aminogruppen und wirkt deswegen fixierend. Die Proben wurden zum Fixieren fünf Minuten bei RT stehen gelassen.

Außerdem wurden noch zwei Proben à 100µl aus dem Gesamt-PRP entnommen, der Nullwert und eine Probe zur Färbung ohne 1. Antikörper, um die unspezifische Bindung zu bestimmen. Diese wurden genauso wie oben beschrieben mit Formaldehyd fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Proben 1 Minute bei 5000rpm (2700g) zentrifugiert (Eppendorfcentrifuge 5417R). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Sediment, bestehend aus Thrombozyten, in 400µl Puffer I resuspendiert. Zu jeder Probe wurden nun 40µl Triton X-100 (2% in PBS) pipettiert. Triton löst Lipide aus der Zellmembran und macht sie so durchgängig zum Beispiel für Antikörper, um intrazelluläre Strukturen anfärben zu können. Die Proben wurden 10 Minuten bei RT permeabilisiert.

Anschließend wurden die Proben wiederum 1 Minute bei 2700g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Sediment wurde in 300µl Puffer I resuspendiert und auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. Jedes Gefäß mit 150µl fixierten und permeabilisierten Thrombozyten wurde dann wie folgt weiter behandelt.

In jedes Eppendorfgefäß wurden 165µl 1. Antikörper, der mit Puffer I 1:10 verdünnt wurde, dazugegeben und das Ganze 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten 1 Minute bei 2700g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der sekundäre Antikörper, konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) (Ziege gegen Maus IgG, FITC-markiert) wurde mit Puffer I im Verhältnis 1:43,8 verdünnt und die Sedimente mit je 300µl dieser Mischung resuspendiert. Die Thrombozyten wurden für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und hinterher wiederum 1 Minute bei 2700g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 400µl Puffer I

resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse bei 4°C im Dunklen gelagert. Die Analyse geschah innerhalb einer Stunde. Das Protokoll wurde nach (Schwarz et al. 1999) erstellt.

Die Probe zur Färbung ohne 1. Antikörper blieb in einen Eppendorfgefäß und wurde folgend wie die anderen behandelt.

Als 1. Antikörper wurden Antikörper gegen die phosphorylierte Form von VASP verwendet. Entweder der 5C6 Antikörper, der für pSer157 spezifisch ist, oder der 16C2 Antikörper, der für pSer239 spezifisch ist. Jeder Antikörper wurde jeweils bei einer Hälfte der Proben verwendet.

Für den anderen Versuch wurde das PRP aus 10ml Blut wie in 4.1.1 beschrieben gewonnen. Jeweils 100µl wurden initial als Nullwert und als Probe zur Färbung ohne 1. Antikörper aus dem Gesamt-PRP entnommen. Anschließend wurden je 300µl PRP mit PGE₁ (100nM); SNP (100µM, 10µM, 1µM) und PGE₁ (100nM) + SNP (100µM, 10µM, 1µM) stimuliert.

Nach 5 Minuten Stimulation wurden pro Stimulationsprobe 100µl PRP entnommen und zu 46,7µl 10% Formaldehyd pipettiert.

Gewinnung der Stammlösungen und weitere Behandlung der Proben verlief genauso wie oben beschrieben.

Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Proben wurden mit langsamer Flussgeschwindigkeit in einem FACSCalibur von Becton Dickinson analysiert. Die Instrumenteneinstellungen, die benutzt wurden, waren: Forward scatter (FSC) E00V, side scatter (SSC) 337V und fluorescence channel 1 (FL-1) zwischen 450 und 750V, aufgrund der biologischen Variabilität der einzelnen Spender. FL-1 wurde jeweils so eingestellt, dass zum Zeitpunkt 0 Minuten der Mean-Wert $20 \pm 0,5$ war, um eine einheitliche Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Alle drei Detektoren wurden auf logarithmische Verstärkung eingestellt. Die Thrombozytenpopulation wurde mit den FSC- und SSC-Einstellungen identifiziert und darüber ein Fenster gelegt, um andere Zellen, Zellreste oder Thrombozytenaggregate aus der Messung auszuschließen. Es wurde solange gemessen, bis 10000 Thrombozytenereignisse in dem Fenster gezählt wurden. Sie wurden nach Mean- und Median-Fluoreszenz analysiert. Die Proben wurden vor der Messung auf

weniger als 2000 Ereignisse pro Sekunde verdünnt. Als Software wurde CELL-Quest 3.1f verwendet.

Die Einstellungen des Gerätes und der Nachweis, in dem festgelegten Fenster Thrombozyten zu zählen, wurden bereits von Mitarbeitern meines Labors erbracht (Schwarz et al. 1999).

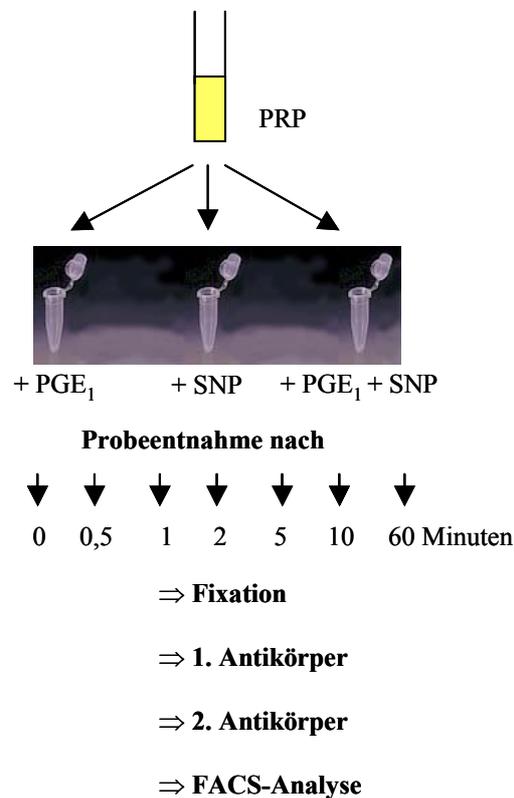


Abb (4): Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der durchflusszytometrischen Thrombozytenanalyse

4.2 Westernblot

4.2.1 Gewinnung von Western-Blot-Proben aus Thrombozyten

4.2.1.1 Blutentnahme und Waschen der Thrombozyten

Das Blut wurde wie bei 4.1.1 beschrieben entnommen. Die Donoren waren auch hier gesunde, freiwillige, aufgeklärte, erwachsene Nichtraucher, die im Zeitraum der Woche vor der Spende keine Thrombozytenaggregationshemmer zu sich genommen hatten. Von jedem Donor wurden 8 Sarstedt-Monovetten à 5ml Blut entnommen. Jedem Röhrchen wurden anschließend 10µl 0,5M EDTA hinzugefügt und man erhielt so eine Endkonzentration von 1mM EDTA.

Das Blut wurde 5 Minuten in einer Hettich-Zentrifuge mit 1300rpm (330g) bei RT zentrifugiert. Das Blut trennte sich in die bereits unter 4.1.1 beschriebenen Phasen auf. Das PRP wurde vorsichtig entnommen und in eine 13ml Röhre von SARSTEDT (mit rundem Boden) überführt. Das PRP wurde wiederum in einer Hettich-Zentrifuge bei 1550rpm (400g) für 6 Minuten bei RT zentrifugiert. Die Thrombozyten befanden sich am Boden des Röhrchens in einem Sediment. Es empfiehlt sich hier erfahrungsgemäß Röhrchen mit einem runden Boden zu nehmen, da die Gefahr, dass die Thrombozyten irreversibel aggregieren, dort geringer ist. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Sediment vorsichtig in 2ml Puffer II resuspendiert. Puffer II bestand aus Dulbecco's PBS, der Ca^{2+} und Mg^{2+} frei ist, das mit 5,5mM D-Glucose zur Ernährung der Thrombozyten angereichert war und zur Aggregationshemmung noch 1mM EDTA enthielt.

40 μ l Thrombozytensuspension wurden mit 120 μ l Puffer II gemischt und die Anzahl der Thrombozyten mit einem Blutanalysegerät (Technicon H3 RTC™) gezählt. Anschließend wurde die Thrombozytensuspension mit Puffer II auf 5×10^8 Thrombozyten/ml angeglichen, um gleiche Ausgangsbedingungen für jeden Versuch zu schaffen. Die gewaschenen Thrombozyten wurden zum Ruhen für 15 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gestellt.

4.2.1.2 Stimulation der Thrombozyten

SDS-Stopp wurde bereits im Voraus aus 200mM Tris/HCl, 15% Glycerin (v/v), 6% SDS (w/v) und 0,03% Bromphenolblau (w/v) mit Aqua dest. angesetzt. Unmittelbar vor Verwendung wurde der SDS-Stopplösung noch 10% 2-Mercaptoethanol zugetan. 2l zuvor beschriftete Eppendorfgefäße wurden jeweils mit 50 μ l SDS-Stopplösung befüllt und für die hineinzupipettierenden Proben bereit gestellt.

Je nach folgenden Versuchen wurden PGE₁ und SNP Stammlösung hergestellt.

- Die SNP-Kristalle wurden nach dem Abwiegen mit H₂O im Dunkeln aufgelöst. Es wurde kurz vor Versuchsbeginn entweder eine 10mM oder eine 100 μ M Stammlösung erstellt.
- Aus dem PGE₁-Pulver wurde mit Ethanol eine 10mM Stammlösung erstellt und bei -20°C gelagert. Aus dieser Stammlösung wurde jeweils vor Versuchsbeginn ein Aliquot entnommen und mit H₂O auf 1mM oder 10 μ M verdünnt.

Aus dem Gesamt-PRP wurden $3 \times 850 \mu\text{l}$ PRP entnommen und je nach Versuch vermischt mit PGE_1 , SNP und $\text{PGE}_1 + \text{SNP}$ in einer Verdünnung von 1:100. Es wurden entweder die Stammlösungen der hohen oder der niedrigen Konzentration verwendet.

Nach 0,5, 1, 2, 5, 10, 60 Minuten wurde jeweils ein Aliquot mit $100 \mu\text{l}$ aus den mit PGE_1 , SNP oder mit Beidem stimulierten PRP entnommen. Zusätzlich wurde ein Nullwert aus dem Gesamt-PRP entnommen. Die Aliquots wurden in die mit SDS-Stopplösung enthaltenden Eppendorfgläser pipettiert und in einem Eppendorf-Thermomixer (5436) für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C bis zum Versuchsbeginn eingefroren (*Schema siehe Abb (5)*).

Es wurden sowohl drei Versuche von der hohen Konzentration und drei Versuche von der niedrigen Konzentration durchgeführt.

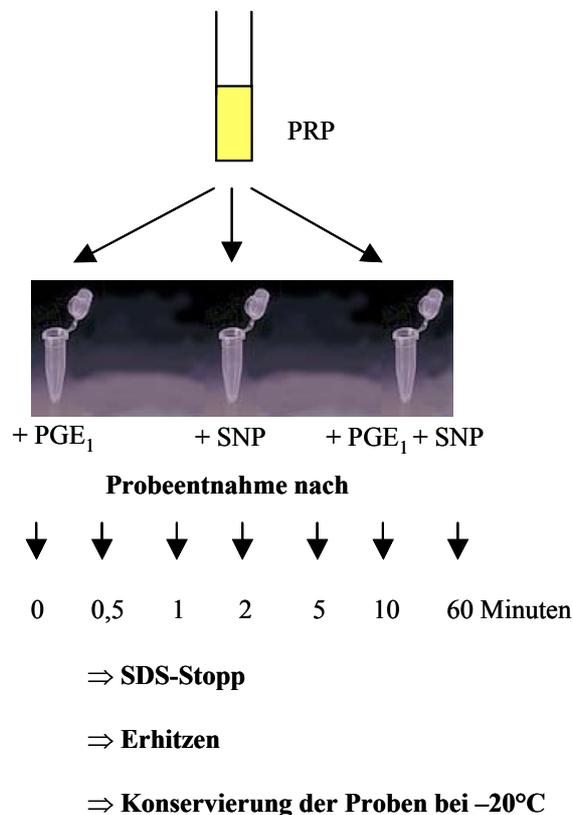


Abb (5): Schematische Darstellung der Probengewinnung für die Westernblotanalyse

4.2.1.3 Thrombozytenstandard

Es wurden 4 Sarstedt-Monovetten à 5ml Blut verwendet. Die Thrombozyten wurden genauso behandelt wie in 4.2.1.1 beschrieben. Die gewaschenen Thrombozyten wurden auf eine Konzentration von $5 \times 10^8/\text{ml}$ angeglichen.

$1998 \mu\text{l}$ der gewaschenen Thrombozyten wurden mit $2 \mu\text{l}$ der 10mM PGE_1 -Stammlösung (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$) für 10 Minuten stimuliert und die Reaktion anschließend mit

1ml SDS-Stopp incl. 10% 2-Mercaptoethanol gestoppt. Die Probe wurde in einem Eppendorf-Thermomixer (5436) für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C bis zum Versuchsbeginn eingefroren.

4.2.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Es wurden BioRad-Minigel (Mini Trans Blot) Kammern verwendet. Als Trenngel wurde ein 9% Gel benutzt, da dort die VASP-Proteine mit 46 kD und 50 kD in der phosphorylierten Form gut voneinander getrennt werden können. Als Sammelgel wurde ein 3% Gel verwendet.

Für zwei 9% Gele wurden 8,4ml Ampuwa (destilliertes H₂O), 4,5ml 30% Acrylam/0,8% Bisacrylam, 1,88ml 3M Trizma-Base (pH 8,9) und 150µl 10% SDS vermischt und anschließend 7,5µl TEMED und 150µl 10% APS dazugegeben, um die Polymerisation des Gemisches zu erreichen. Das noch flüssige Gel wurde zwischen die Glasplatten der Minigelkammer gegossen und mit 70% Ethanol während der Polymerisation bedeckt, um eine glatte Geloberfläche ohne Luftblasen zu erhalten. Sobald das Gel fest war, wurde das Ethanol abgegossen und ein flüssiges Gelgemisch eines 3% Geles darüber gegossen. Das 3% Gel besteht aus 5,44ml Ampuwa, 750µl 30% Acrylam/0,8% Bisacrylam, 940µl 0,5M Trizma-Base (pH 6,7) und 75µl 10% SDS und anschließend 3,75µl TEMED und 150µl 10% APS für die Polymerisation. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein 1,5mm breiter Platzhalter für 10 Taschen gesteckt. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die BioRad-Minigel Kammer eingespannt und die Kammer wurde bis zum Rand mit Elektrophoresepuffer befüllt. Dieser Puffer bestand aus 4,8g Trizma Base, 11,6g Glycine, 800ml Ampuwa und 8ml 10% SDS. Anschließend wurden die Platzhalter für die Taschen vorsichtig nach oben herausgezogen.

Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C in einem Eppendorf-Thermomixer (5436) erhitzt und anschließend wie folgt aufgetragen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SDS-Stopp 1x verdünnt	0min	0,5min	1min	2min	5min	10min	60min	Standard	MW

Abb. (6): Übliche Ladeweise der Gele

Pro Tasche wurden jeweils 10µl aufgetragen. Es wurden 10µl von den Proben, 7,5µl Thrombozytenstandard und 5µl Molekularer Gewichtsmarker (MW) von BioRad genommen und mit SDS-Stopp auf 10µl aufgefüllt. Über den MW, der sich farblich auf der Membran darstellt, lässt sich später die Größe der auf dem Röntgenfilm abgebildeten Proteine abschätzen.

Von jeder Stimulationsstufe (PGE₁: 10µM, 100nM; SNP: 100µM, 1µM; PGE₁+SNP: 10µM/100µM, 100nM/1µM) wurden jeweils zwei Gele gemacht, um später sowohl mit dem 5C6-, als auch dem 16C2-Antikörper einen Immunblot durchführen zu können.

Nachdem die Taschen geladen waren, wurde die Elektrophorese mit der BIO-RAD Power Pac 200 Maschine gestartet. Begonnen wurde mit einer konstanten Spannung von 80V, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten und die Grenze zum Trenngel erreicht hatten, dann wurde auf 150V geschaltet, bis die Lauffront mit dem SDS-Stopp unten aus dem Gel wieder herausgelaufen war. SDS-Page nach (Laemmli 1970) und (Schwarz et al. 1999).

Die Gele wurden nun aus der Kammer genommen und mit einer Rasierklinge das Laufgel vom Sammelgel getrennt. Die Gele wurden dann zum Blotten in die Haltevorrichtung einer BioRad Trans-Blot™-Cell getan. Dazu wurde auf das Gel eine Membran (Millipore Immobilon™-P) gelegt, die zuvor mit einer Rasierklinge in die gleiche Größe geschnitten wurde (4,9x9cm). Gel mit Membran wurden nun von außen nach innen auf jeder Seite von einer Lage Schaumstoff und einer Lage Blotting-Papier bedeckt, in die Haltevorrichtung gepresst und anschließend wurde die Haltevorrichtung in die Transferkammer geschoben. Es musste hierbei darauf geachtet werden, dass sich die Membran auf der Seite des positiven Pols der Kammer befand, da die sich im Gel befindlichen Proteine durch das SDS negativ geladen waren. Das Zusammenbauen der Haltevorrichtung mit dem Gel musste im Transferpuffer unter Luftausschluss geschehen, da Luftbläschen zwischen Gel und Membran den Transfer der Proteine verhindern.

Der Transferpuffer bestand aus 9,1g Trizma Base, 43,5g Glycine, 2400ml Ampuwa und 600ml Methanol, das aber erst nach vollständigem Lösen der Salze dazugegeben werden durfte. Der Transferpuffer sollte möglichst kalt sein, damit die Proteine beim Transfer als scharfe Banden auf die Membran geblottet werden.

Die Transferkammer wurde bis oben mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer lief im Kühlraum bei 4°C bei einer konstanten Stromstärke von 1A über eine Stunde mit einer

BIO-RAD Power Pac 200 Maschine ab. Der Transfer fand nach (Towbin et al. 1979) statt.

Hinterher wurden die Membranen aus der Kammer genommen und mindestens 1 Stunde mit 6% fettfreier Trockenmilch (BioRad) in Waschpuffer, der aus 1xTBS (Tris buffered saline) mit 0,05% Tween-20 besteht, geschwenkt, um alle freien Stellen auf der Membran mit Proteinen zu besetzen. TBS wurde bereits im Vorfeld als 10fach konzentrierte Stammlösung hergestellt. Pro Liter 10xTBS wurden 24,2g Trizma Base und 80g NaCl in destilliertem Wasser aufgelöst und mit HCl und NaOH auf einen pH von 7,6 eingestellt. Zur weiteren Verdünnung des TBS wurde destilliertes Wasser verwendet.

Danach wurden die Membranen für eine Stunde mit dem ersten Antikörper in 3% fettfreier Trockenmilch in Waschpuffer bei RT inkubiert oder alternativ bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Als Erstantikörper wurden monoklonale Mausantikörper gegen spezifische Phosphorylierungsstellen beim VASP-Protein in einer Verdünnung 1:100 verwendet. Die Membranen wurden entweder mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Serin an der Stelle 239 im Protein (16C2) oder gegen Serin¹⁵⁷ (5C6) gefärbt. Anschließend wurden die Membranen dreimal circa 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Darauf folgend wurden die Membranen 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper in 3% fettfreier Trockenmilch in Waschpuffer inkubiert. Als Antikörper wurde ein HRP (horse-radish peroxidase) konjugierter Ziege gegen Maus Antikörper (BioRad) in einer Verdünnung 1:3000 angewandt.

Anschließend wurden die Membranen noch fünf mal ca. 7 Minuten in Waschpuffer gewaschen und danach 1 Minute mit ECL-Lösung (4ml pro Membran) inkubiert. ECL führt zusammen mit dem HRP zu einer Lichtreaktion, die man mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar machen kann.

Zum Entwickeln wurden die Membranen zwischen zwei Transparent Film Overheadfolien gelegt und mit einem flachen Gegenstand alle Luftblasen zwischen den Folien und der Membran entfernt. Die Membranen mit den Folien wurden in eine Röntgenkassette gelegt und in einer Dunkelkammer Röntgenfilme für Minuten bis Sekunden auf die Membranen gelegt, je nachdem, wie stark das Signal war. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine (Protect) entwickelt.

Anschließend wurden die Filme beschriftet und mit einem Durchlichtscanner (AGFA-STUDIOSTAR) und der Software Foto-Look SA 2.09.1 eingescannt und darauf mit

NIH-Image 1.61/ppc die Intensität der einzelnen Banden ausgemessen, um eine statistische Auswertung der Westernblot-Versuche durchführen zu können.

4.3 Immunfluoreszenz Mikroskopie von Thrombozyten mit VASP-Antikörpern

Es wurden 10ml Blut wie in 4.1.1 beschrieben entnommen und das PRP gewonnen. Acht Deckgläschen (\varnothing 15mm) wurden vor Versuchsbeginn mit 70% Ethanol gereinigt und auf feuchtes Blotting-Papier in eine Petri-Schale gelegt.

Danach wurden 30 μ l PRP auf jedes Deckgläschen pipettiert und der Deckel auf die Petri-Schale gesetzt. Den Thrombozyten wurde dann 15-20 Minuten bei RT Zeit gegeben, um an den Deckgläschen zu adhären. Anschließend wurde das PRP wieder vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Dann wurden jeweils vier Deckgläschen mit 100 μ l PBS, vier weitere mit 200 μ l PGE₁ (10 μ M) in PBS und die übrigen vier mit SNP (100 μ M) stimuliert. Die Herstellung der PGE₁ und der SNP-Lösung wurde in 4.1.2 beschrieben. Die Deckgläschen wurden nun bei RT in der feuchten Umgebung der Petri-Schale inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Flüssigkeit wiederum vorsichtig abgesaugt.

Die Deckgläschen wurden nun mit der mit den Thrombozyten beschichteten Seite nach unten auf 300 μ l Tropfen von 3,7% Formaldehyd in PBS auf einer Transparent Film Overheadfolie gelegt. Nach 10 Minuten Fixierung bei RT wurden die Deckgläschen vorsichtig entfernt und auf Blotting-Papier seitlich abgetupft. Anschließend wurden die Deckgläschen drei Mal mit der Seite, auf der die Thrombozyten angeheftet waren, nach unten in 300 μ l Tropfen PBS gewaschen und auf Blotting-Papier abgetupft.

Daraufhin wurden die Deckgläschen 10 Minuten bei RT mit 300 μ l Tropfen 50mM NH₄Cl in PBS inkubiert und anschließend drei Mal in 300 μ l Tropfen PBS gewaschen. Danach wurden sie 10 Minuten bei RT in 300 μ l Tropfen 0,2% Triton X-100 permeabilisiert und anschließend 20 Minuten mit 300 μ l Tropfen Puffer III inkubiert. Puffer III bestand aus Dulbecco's PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei), 5% Ziegen Serum und 0,05% Triton X-100.

Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Thrombozyten 30 Minuten im Dunkeln in einem 300 μ l Tropfen Puffer III mit Antikörper gegen VASP und gegen filamentäre Aktinfilamente (Phalloidin) gefärbt (*Details siehe Abb. (7)*)

Puffer III wurde vor dem Auftragen auf die Folie mit den Antikörpern vorgemischt, um bei beiden Proben die gleiche Menge Antikörper zu haben.

Nach der Inkubation wurden die Proben drei Mal in einem PBS-Tropfen gewaschen und danach in einem Tropfen mit Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy³-konjugierter Antikörper, je nach 1. Antikörper gegen Kaninchen oder Maus, gewählt und in einem Verhältnis von 1:500 mit Puffer III verdünnt. Auch diese Inkubation wurde im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

Die Deckgläschen wurden nun wieder drei Mal in PBS-Tropfen gewaschen und gut abgetropft. Auf jedes Deckgläschen wurde anschließend 18µl Mowiol nach (Taylor and Heimer 1974) auf die Seite der Thrombozyten gegeben und es wurde mit der Zellseite nach unten auf einem sauberen Objektträger platziert. Sobald die Objektträger trocken genug waren, wurden die Deckgläschen mit handelsüblichem Nagellack umrundet, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern.

Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Das Protokoll wurde nach (Smolenski et al. 1998) erstellt.

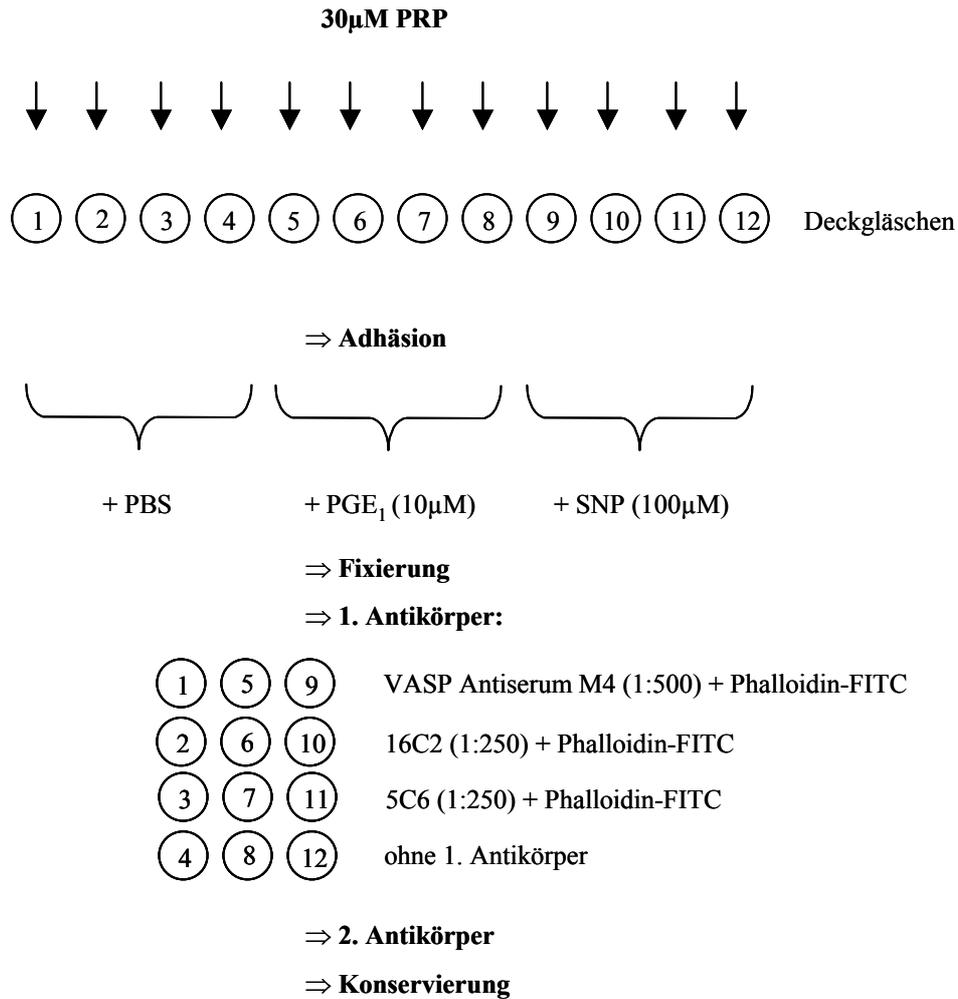


Abb. (7): Schematischer Versuchsaufbau der Probengewinnung für die Immunfluoreszenz mit Thrombozyten

Die auf Deckgläschen fixierten und mit Antikörpern gefärbten Thrombozyten wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (TCS SP Leika) angeschaut und digital fotografiert.

4.4 Mausstammzellen

4.4.1 Gewinnung der Stammzellen aus dem Knochenmark

Es wurden junge Mäuse aus eigener Zucht genommen, die zwischen 8 Wochen und ½ Jahr alt waren, damit noch nicht das überwiegend blutbildende Knochenmark durch Fettmark ersetzt war. Es wurden für die Versuche sowohl Wildtypmäuse, als auch VASP knock out Mäuse verwendet.

Die Mäuse wurden mit Genickbruch getötet und anschließend zur Desinfektion für ca. 2 Minuten in 70% Ethanol gelegt. Hinterher wurden ihnen in einer sterilen

Gewebekammer die Oberschenkel- und die Unterschenkelknochen mit sterilen Scheren und Pinzetten sauber herauspräpariert. Die Knochen sollten möglichst weitgehend von Bindegewebe und Muskulatur befreit werden und wurden anschließend in kalten sterilen Puffer IV gegeben.

Puffer IV bestand aus Dulbecco's PBS mit 2% BSA, 0,38% Trisodiumcitrat und 1U/ml DNase. Der Puffer wurde unter dem Abzug mit Hilfe einer Perfusorspritze (BRAUN) und einer gebrauchsfertigen Filtereinheit (Schleicher & Schuell) steril filtriert, um eine spätere Kontamination der Stammzellen zu vermeiden.

Die Knochen wurden nun wieder aus der Pufferlösung herausgenommen und der Knochenmarksraum mit einer Schere eröffnet. Dazu wurde ein Stück des proximalen und des distalen Gelenkkopfes abgeschnitten und die Markhöhle mit einer 5ml Einmal-Spritze (BRAUN), der eine 22G-Nadel (Sterican[®]) aufgesetzt wurde, mit Puffer IV durchspült. Das Knochenmark mit dem Puffer wurde in einem sterilen Gefäß aufgefangen und mit einer Spritze mit 19G-Nadel (Sterican[®]) ein paar Mal aufgezogen und wieder ausgespritzt, um die Zellen voneinander zu trennen.

Danach wurden die Zellen durch ein engmaschiges steriles Nylonnetz (SEFAR Nitex) gespritzt, um Knochensplitter und Gewebereste von den vereinzelt Zellen zu trennen. Daraufhin wurden die Zellen 10 Minuten bei 200g in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde steril unter dem Abzug mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Sediment mit 800µl steril filtriertem Puffer V resuspendiert, der aus Dulbecco's PBS mit 0,5% BSA bestand.

Isolation des Knochenmarks nach (Shiraga et al. 1999).

4.4.2 Separation der Stammzellen durch MACS Sca-1 MultiSort Kit

4.4.2.1 Magnetische Markierung der Zellen

Das in 800µl Puffer V resuspendierte Sediment sollte nicht mehr als 10^8 Zellen enthalten, um genügend markierte Antikörper für die Sca-1 positiven Zellen zu haben. Deshalb sollte bei drei oder mehr Mäusen die Zellzahl gemessen werden, um notfalls die resuspendierten Zellen noch zu verdünnen. Zum Zählen der Zellen wurden 10µl aus den 800µl entnommen und mit 190µl Puffer V verdünnt und die Anzahl der Leukozyten anhand eines kleinen Blutbildes mit einem Blutanalysegerät gemessen. Anschließend wurden 200µl (oder entsprechend mehr) mit Sca-1 MultiSort Mikrobeads (aus MACS Sca-1 MultiSort Kit, mouse – Miltenyi Biotec) zu der Zellsuspension dazugegeben und 15 Minuten bei 6-12°C inkubiert. Mausstammzellen haben als Oberflächenantigen Sca-

1, das ihnen in der weiteren Differenzierung wieder verloren geht (Gonda et al. 1993). An die Sca-1 positiven Zellen hefteten sich nun während der Inkubation die Sca-1 Antikörper mit Magnetkügelchen an.

Danach wurde das Volumen des Zell-Antikörpergemisches mit Puffer V auf das fünf- bis zehnfache verdünnt und 10 Minuten bei 200g in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde steril unter dem Abzug mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Sediment mit 1ml Puffer V resuspendiert.

4.4.2.2 Magnetische Auftrennung der Zellen

Für die magnetische Trennung der Zellen wurde eine magnetische Säule (MACS Separation Columns) mit einem aufgesetzten Filter (Pre-Separation Filter) in die Haltevorrichtung des Magneten der MiniMACS Separation Unit gesteckt und mit 500µl Puffer V durchgespült. Der Filter wurde verwendet, um zu verhindern, dass größere Zellkonglomerate die Säule verstopfen.

Danach wurde 1ml Zellsuspension durch die Säule laufen gelassen. Bei mehr als 2×10^8 Zellen müssen weitere Säulen verwendet werden. Die magnetisch markierten Zellen blieben nun an dem magnetisch aufgeladenen Granulat der Säule hängen und nicht markierte Zellen liefen durch die Säule hindurch. Um die Säule von Sca-1 negativen Zellen zu reinigen, wurde sie noch drei Mal mit 500µl Puffer V durchgespült. Anschließend wurde die Säule aus der magnetischen Verankerung herausgenommen und zwei Mal mit 500µl Puffer V gespült, um die Sca-1 positiven Zellen aus der Säule zu gewinnen. Um eine möglichst saubere Auftrennung zu erhalten, wurde die gleiche Prozedur ein zweites Mal mit einer frischen Säule durchgeführt, allerdings war diesmal kein Filter notwendig.

Die Zellen wurden in einem 5ml Falcon[®]-Röhrchen mit Deckel gesammelt und waren nun für weitere Versuche oder eine Kultivierung bereit.

4.4.3 Färbung der Zellen mit Antikörpern

Die Zellsuspension wurde in einer Eppendorffzentrifuge 2 Minuten bei 2700g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Sediment mit 250µl Puffer I resuspendiert.

20µl von der Zellsuspension wurden mit 100µl Puffer I 1:6 verdünnt und 100µl davon mit 400µl LeucoCOUNT-Reagenz in einem LeucoCOUNT-Röhrchen vermischt. (Materialien im LeucoCOUNT™ Kit von Becton Dickinson enthalten).

Mit Hilfe des LeucoCOUNT-Systems hat man die Möglichkeit, mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur) sehr einfach und exakt die Anzahl von Leukozyten bzw. Stammzellen in einer Lösung zu bestimmen.

Im LeucoCOUNT-Röhrchen befand sich eine feste Zahl Kügelchen (Bead Count), die man beim FACSCalibur in einem Fenster R1 zählte, bis 10000 Ereignisse erreicht wurden und sie mit den gesuchten Zellen im Fenster R2 ins Verhältnis setzte. Dies musste nun noch mit dem Bead Count multipliziert und die Verdünnung und das totale Volumen der Zellsuspension berücksichtigt werden, um die absolute Zellzahl zu erhalten.

Die LeucoCOUNT-Proben wurden mit schneller Flussgeschwindigkeit mit den FACS-Einstellungen FSC: E00V, SSC 284V, FL-1 525V und Fluoreszenzkanal 2 (FL-2) gemessen. Der FSC-Detektor wurde auf lineare Verstärkung gesetzt, die übrigen Detektoren auf logarithmische Verstärkung.

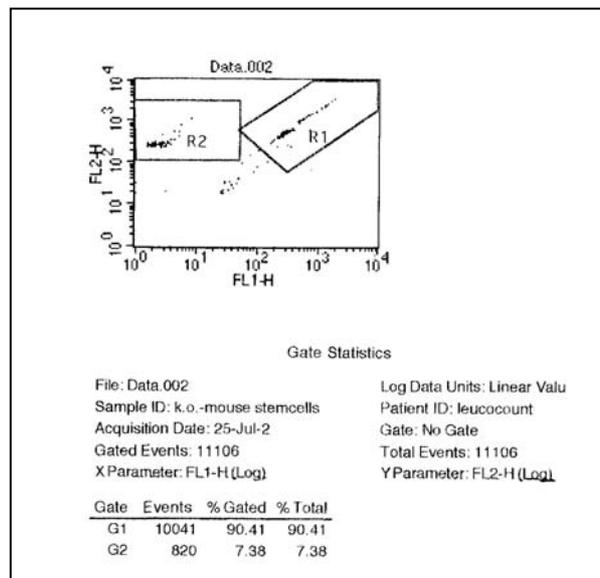


Abb. (8): Analyse-Fenster der LeucoCount-Zählung. G1= Ereignisse in R1 (Kügelchen); G2= Ereignisse in R2 (gesuchte Zellen)

Stammzellen/μl =

$$G2/G1 \times \text{bead counts}/100\mu\text{l (Menge der Zellsuspension)} \times \text{Verdünnung}$$

Zellen insgesamt = *Stammzellen/μl* \times *Volumen (1000μl)*

Von der restlichen Zellsuspension wurden jeweils 50μl in insgesamt vier Eppendorfgefäße pipettiert und wie folgt mit Antikörper gefärbt.

- ① Positive Kontrolle mit 2µl FITC konjugiertem IgG-Antikörper gegen Ratte (FITC-rat IgG2a,κ isotyp control Immunglobulin)
 - ② 2µl FITC-konjugierter Antikörper gegen Sca-1 (FITC anti mouse LY-6A/E)
 - ③ ohne 1. Antikörper
 - ④ Antikörper gegen CD41 (Ratte gegen Maus) 1:100 (Purified anti mouse CD41)
- (alle verwendeten Antikörper waren von PharMingen)

Die Zellsuspension mit den Antikörpern wurde für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Der Inhalt der Eppendorfgefäße ① und ② wurde mit PBS mit 5,5mM Glucose auf 400µl verdünnt und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Eppendorfgefäße ③ und ④ wurden in der Eppendorffzentrifuge 2 Minuten bei 2700g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment wurde in 100µl Puffer I resuspendiert, der bereits vorher mit dem Sekundärantikörper vorgemischt wurde und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Pro 250µl Puffer I wurden 5µl FITC-konjugierter Antikörper gegen Ratten (F-6258 – SIGMA) dazugegeben. Der Inhalt der Eppendorfgefäße ③ und ④ wurde mit PBS mit 5,5mM Glucose auf 400µl verdünnt und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Proben wurden mit schneller Flussgeschwindigkeit in einem FacsCalibur von Becton Dickinson analysiert. Die Instrumenteneinstellungen, die benutzt wurden, waren: FSC E00V, SSC 397V und FL-1 um 500V, aufgrund der biologischen Variabilität der einzelnen Mäuse. FL-1 wurde jeweils so eingestellt, dass bei Färbung ① ohne Stimulation der Median-Wert ca. 10,7 betrug. Anschließend wurden alle Proben von Färbung ① und ② bei gleichem FL-1 gemessen. FL-1 musste bei Färbung ③ ohne Stimulation erneut auf einen Median-Wert um die 10,7 eingestellt werden, da der Antikörper eine etwas stärkere Fluoreszenz aufweist. Darauf folgend wurden alle Proben der Färbungen ③ und ④ mit dieser Einstellung gemessen.

Die FSC und SSC Detektoren wurden auf lineare Verstärkung und der FL-1 Detektor auf logarithmische Verstärkung eingestellt. Die Stammzellpopulation wurde mit den FSC- und SSC-Einstellungen identifiziert und darüber ein Fenster gelegt, um andere Zellen aus der Messung auszuschließen. Es wurde solange gemessen, bis 5000 Stammzellereignisse in dem Fenster gezählt wurden. Ihre Verteilung wurde mit Hilfe eines Density-Plots analysiert.

Als Software wurde CELL-Quest 3.1f verwendet.

4.4.4 Kultivierung und anschließende Analyse der Zellen

Nach der Separation der Zellen durch das MACS Sca-1 MultiSort Kit wurden von 1ml Zellsuspension 20µl entnommen, mit 80µl Puffer V 1:5 verdünnt und zusammen mit 400µl LeucoCOUNT-Reagenz in ein LeucoCOUNT-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden wie in 4.4.3 beschrieben gezählt.

Anschließend wurde das Medium gemischt aus MarrowMAX™ Bone Marrow Medium (Invitrogen Corporation), 10ng/ml Maus-Interleukin (IL)-6, 10ng/ml humanem IL-11 und 10ng/ml Maus-Thrombopoetin (mTPO), um die Ausdifferenzierung der Stammzellen in Richtung Megakaryozyten zu beeinflussen. Um eine eventuelle Kontamination der Zellen durch Bakterien zu vermeiden, wurden außerdem noch Antibiotika (Penicillin-Streptomycin-Solution) im Verhältnis 1:100 beigemischt. Das Medium wurde steril filtriert und die Zellsuspension mit dem Medium im Verhältnis 10000 Zellen/ml vermischt.

Es wurden 24 Mulden Zellkulturschalen verwendet, wobei nur die inneren acht benutzt wurden und die äußeren mit sterilem H₂O gefüllt wurden, um allen Zellen gleiche Feuchtigkeitsbedingungen zu schaffen.

Es wurden 20 Mulden mit je 10000 Zellen, d.h. 1ml gefüllt und alle zwei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen 8-pCPT-cGMP stimuliert. Jeweils vier Mulden bekamen die gleiche Menge 8-pCPT-cGMP. Als Konzentrationen wurden 0, 25 und 50µM verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am Tag 6 wurde pro Mulde 1ml Medium zugefüttert und die Zellen erneut mit 8-pCPT-cGMP stimuliert.

Am Tag 9 wurden die Zellen von der Hälfte der Mulden (je zwei pro Konzentration) durch auf- und abpipettieren abgelöst und der Inhalt jeder Mulde in ein FALCON®-Röhrchen mit Deckel überführt. Aus diesen 2ml pro Röhrchen wurden nun jeweils 100µl für eine LeucoCOUNT-Messung entnommen und zusammen mit 400µl LeucoCOUNT-Reagenz in ein LeucoCOUNT-Röhrchen gefüllt und wie in 4.4.3 beschrieben gemessen. Die restlichen Zellen wurden pro FALCON®-Röhrchen in ein Eppendorfgefäß überführt und in einer Eppendorffzentrifuge bei 2700g 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Sediment in 100µl Puffer I resuspendiert und die jeweils gleichen Stimulationskonzentrationen zusammenpipettiert. Diese 200µl pro 8-pCPT-cGMP-

Konzentration wurden nun à 50µl auf vier Eppendorfgefäße verteilt und wie in 4.4.3 beschrieben mit Antikörper gefärbt und mit dem FACSCalibur gemessen.

Am Tag 12 wurde mit den restlichen Zellen auf gleiche Art und Weise verfahren.

5 Ergebnisse

5.1 Teil 1:

Ziel:

Charakterisierung des Antikörpers 5C6 und Zeitkinetik der VASP-Phosphorylierung

Der 5C6 Antikörper erkennt die phosphorylierte Form von VASP an der Position Serin¹⁵⁷, die bevorzugt über die cAMP abhängige Proteinkinase phosphoryliert wird. (Butt et al. 1994)

Zum Vergleich wurde der bereits bekannte und ausführlich erprobte Antikörper 16C2 (Smolenski et al. 1998; Schwarz et al. 1999) eingesetzt, der spezifisch ist für VASP, das an der Position Serin²³⁹ phosphoryliert ist. Mit beiden Antikörpern sollte vergleichend die Zeitkinetik, Intensität und Dauer der Phosphorylierung von VASP durch verschiedene Stimuli (PGE₁, SNP, PGE₁+SNP) untersucht werden.

5.1.1 Spezifität des Antikörpers 5C6

Fragestellung: Ist der Antikörper 5C6 wirklich spezifisch für VASP, das an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist?

Um die Spezifität der Phospho-VASP-Antikörper gegen phosphoryliertes Serin¹⁵⁷ (5C6) und phosphoryliertes Serin²³⁹ (16C2) sicherzustellen, wurden CHO-Zellen mit VASP-Mutanten transfiziert. Diese CHO-Zellen exprimieren nur sehr geringe Mengen von VASP, die bei der Analyse der Zellen vernachlässigbar gering sind. Die VASP-Mutanten enthielten entweder an der Position 157 an Stelle von Serin ein Alanin (AST-Mutante) oder es war an der Position 239 das Serin gegen ein Alanin ausgetauscht (SAT-Mutante) worden. Dadurch war eine Phosphorylierung an der jeweiligen Position nicht mehr möglich. Die Zellen wurden nach 2 Tagen geerntet und zwei Minuten mit 10µM PGE₁ stimuliert. Die Reaktion wurde mit SDS-Stopp-Lösung unterbrochen und die Proben durch Immunoblotting mit den phosphospezifischen Antikörpern analysiert (siehe Abb. (9)). Wie zu erwarten war, ergab das Immunoblotting mit dem 5C6-Antikörper auch nach Stimulation mit PGE₁ kein Signal bei der AST-Mutante. Aber es war eine eindeutige Phosphorylierung bei der SAT-Mutante nach Stimulierung zu

sehen. Genau entgegengesetzte Ergebnisse wurden mit dem 16C2-Antikörper erzielt (siehe Abb. (9)).

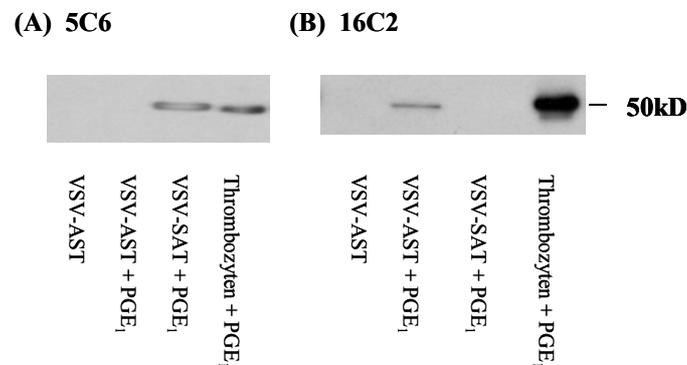


Abb. (9): Spezifität der Phospho-VASP-Antikörper.

Transfektion von CHO-Zellen mit VASP-Mutanten an den Positionen Serin¹⁵⁷ (VSV-AST) oder Serin²³⁹ (VSV-SAT). Die Zellen wurden mit 10µM PGE₁ für 2 Minuten stimuliert. Die 50kD-Bande entspricht phosphoryliertem VASP (A) **Western Blot Analyse mit anti-Phospho-VASP-Serin¹⁵⁷ (5C6) Antikörper.** (B) **Western Blot Analyse mit anti-Phospho-VASP-Serin²³⁹ (16C2) Antikörper.**

Beide Antikörper sind hoch spezifisch für VASP, das an den entsprechenden spezifischen Aminosäure phosphoryliert ist.

Ergebnis: Beide Antikörper binden jeweils nur an die für sie spezifische phosphorylierte Aminosäure.

5.1.2 Charakterisierung des Antikörpers 5C6 durch Westernblot-Analyse und Zeitkinetik der VASP-Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷

Fragestellung: Der Einfluss von PGE₁ und SNP auf die Intensität und Geschwindigkeit der VASP-Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷.

Gewaschene Thrombozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an PGE₁, SNP oder einer Kombination aus beiden Substanzen stimuliert. Hierbei wurde in der Hälfte der Experimente eine höhere Konzentration (10µM PGE₁, 100µM SNP, 10µM PGE₁+100µM SNP) an Stimulanzien und in der anderen Hälfte eine niedrigere Konzentration (100nM PGE₁, 1µM SNP, 100nM PGE₁+1µM SNP) verwendet. Aus den stimulierten und gewaschenen Thrombozyten wurden Aliquots nach 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 60 Minuten entnommen und die Proteine mit SDS-Stopplösung denaturiert. Die Proteine der einzelnen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit den Phospho-VASP-Antikörperen inkubiert. Um die Ergebnisse

vergleichbar zu machen, wurde jeweils die gleiche Standard-Probe mitanalysiert. Dieser Standard bestand aus gewaschenen Thrombozyten, die mit 10 μ M PGE₁ 10 Minuten lang inkubiert wurden, um eine möglichst starke Phosphorylierung zu erzielen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ausgewertet, der Standard gleich 100% gesetzt und der Mittelwert und der Standardfehler aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchen berechnet.

Unter Verwendung des neuen Antikörpers 5C6 konnte in dem oben beschriebenen Versuch gezeigt werden, dass die Stimulation der Thrombozyten mit 10 μ M PGE₁ zu einem sehr raschen Anstieg der VASP-Phosphorylierung bereits nach 0,5 Minuten führte, die innerhalb weniger Minuten wieder leicht rückgängig war. Nach Stimulation mit 100 μ M SNP war Serin¹⁵⁷ deutlich schwächer phosphoryliert. Das Maximum der Serin¹⁵⁷-Phosphorylierung wurde erst nach 5 Minuten erreicht. Bei einer gleichzeitigen Stimulation mit 10 μ M PGE₁ und 100 μ M SNP war der Anstieg der VASP-Phosphorylierung etwas langsamer als mit PGE₁ alleine. Die Phosphorylierung war aber über einen längeren Zeitraum stabil als mit einer alleinigen PGE₁-Stimulation (*siehe Abb. (10)*).

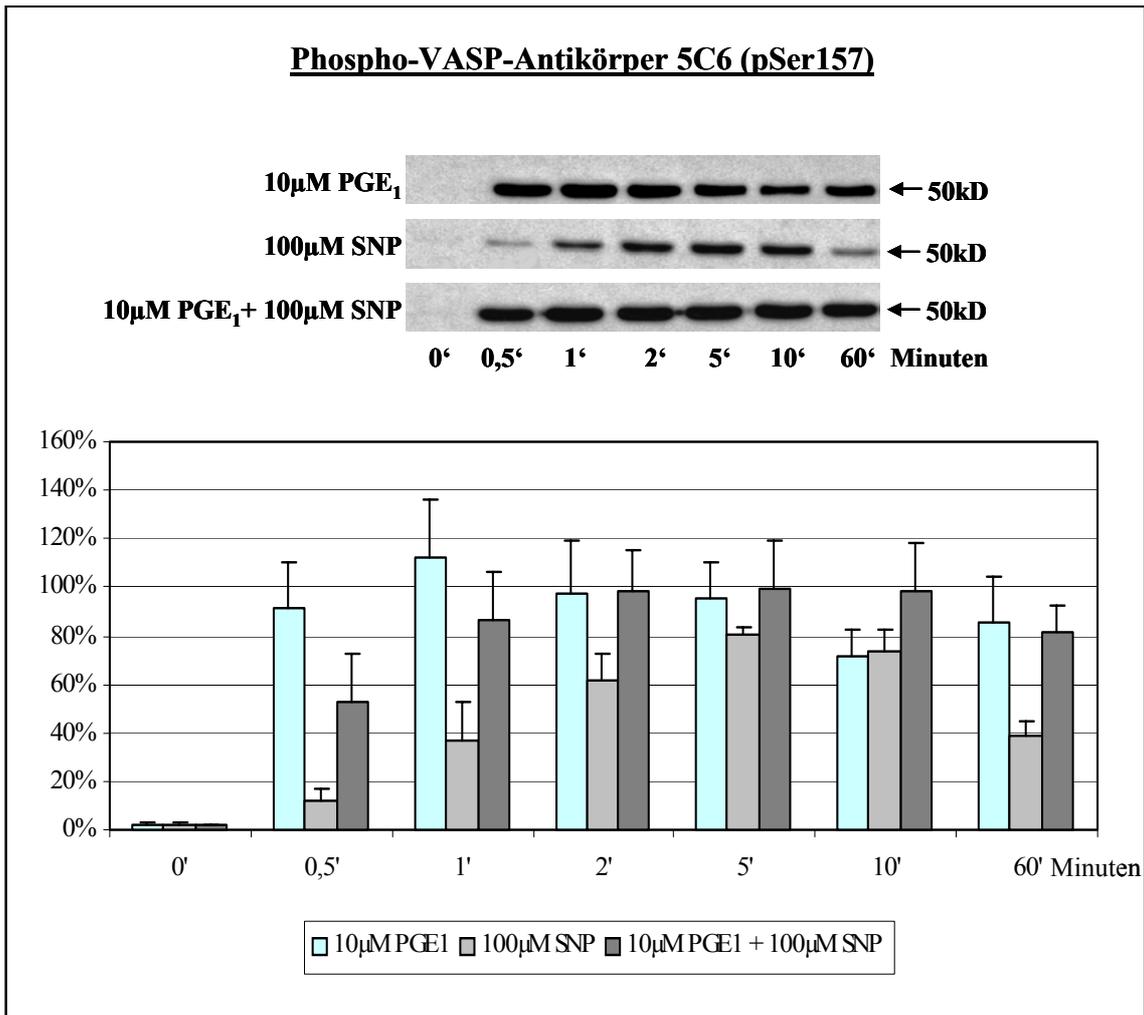


Abb. (10): Westernblot-Analyse gewaschener Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ (10µM) und SNP (100µM) mit dem 5C6-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin¹⁵⁷ (pSer157). Abbildung der Röntgenfilmausschnitte (oben) und Mittelwert mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der Quantifizierung der Schwärzung des Röntgenfilms (unten). Die 50kD-Bande entspricht VASP, das an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist.

Des Weiteren wurden auch niedrigere Konzentrationen der Stimulanzen eingesetzt (siehe Abb. (11)). Die Stimulation der Thrombozyten mit 100nM PGE₁ zeigte an der Aminosäure Serin¹⁵⁷, wie auch bei der hohen Konzentration, einen raschen Anstieg der Phosphorylierung bereits nach 0,5 Minuten. Die Phosphorylierung fiel schwächer aus als mit 10µM PGE₁. Nach Stimulation mit 1µM SNP zeigte sich an Serin¹⁵⁷ eine um mehr als 50% schwächere Phosphorylierung, die auch erst nach 10 Minuten ihr Maximum erreichte. Bei einer Stimulation mit 100nM PGE₁ und 1µM SNP war der Anstieg der VASP-Phosphorylierung etwas langsamer als nach PGE₁ alleine. Das Maximum, das erreicht wurde, überstieg das Maximum der alleinigen Stimulation mit PGE₁ und zeigte im analysierten Zeitfenster keinen Abfall.

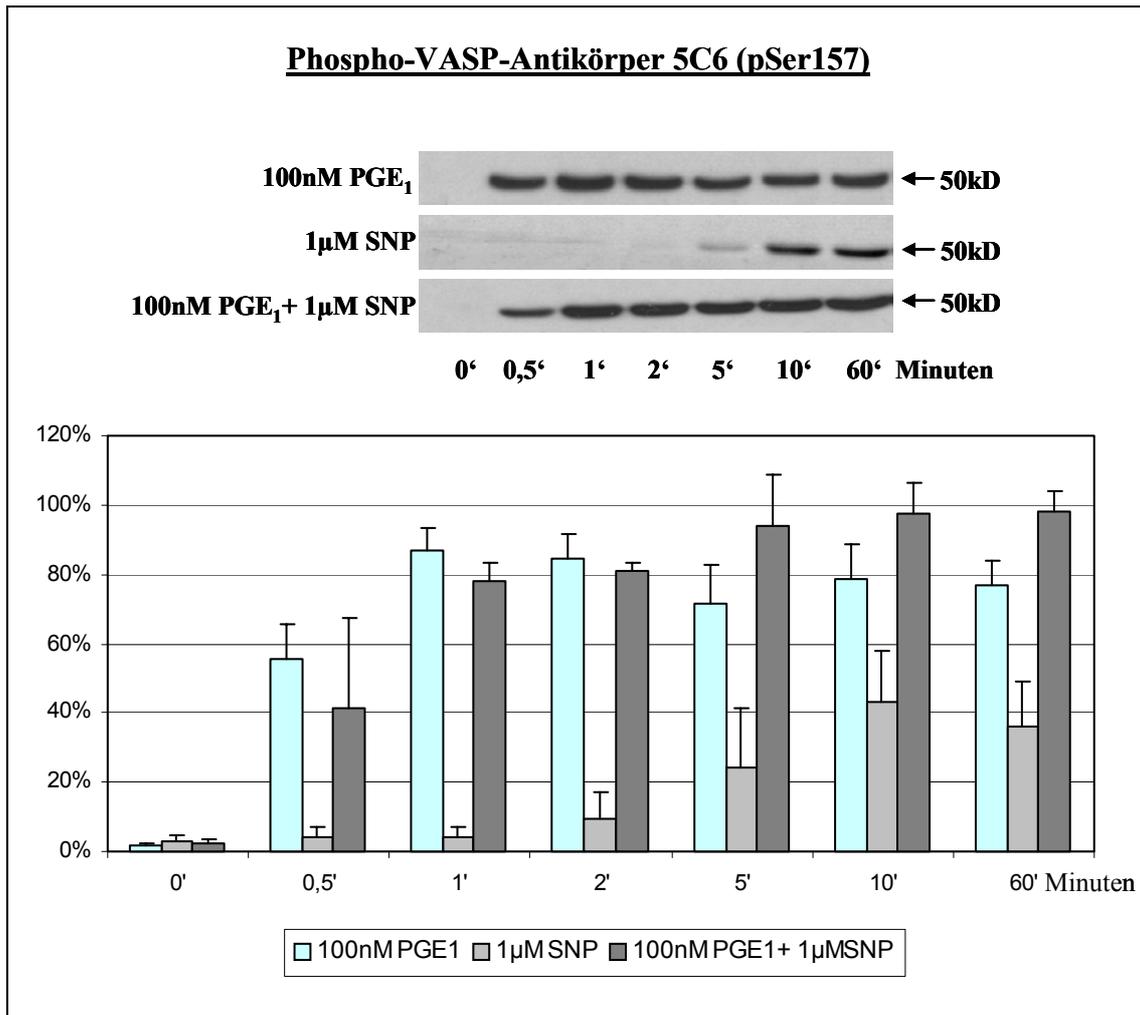


Abb. (12): Westernblot-Analyse gewaschener Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ (100nM) und SNP (1µM) mit dem 5C6-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin¹⁵⁷ (pSer157). Abbildung der Röntgenfilmausschnitte (**oben**) und Mittelwert mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der Quantifizierung der Schwärzung des Röntgenfilms (**unten**). Die 50kD-Bande entspricht VASP, das an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist.

Ergebnis: Serin¹⁵⁷ wird bevorzugt nach Stimulation mit PGE₁ phosphoryliert. Höhere Konzentrationen an Stimulanzen führen zu einem schnelleren und stärkeren Anstieg der Phosphorylierung als niedrigere.

5.1.3 Vergleichende Zeitkinetik der VASP-Phosphorylierung an Serin²³⁹ mit dem bekannten Antikörper 16C2

Fragestellung: Der Einfluss von PGE₁ und SNP auf die Intensität und Geschwindigkeit der VASP-Phosphorylierung an Serin²³⁹ im Vergleich zur Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷.

Die Untersuchung der Phosphorylierungsstelle an Serin²³⁹ mit dem 16C2 Antikörper zeigte, dass durch hohe Konzentrationen an PGE₁ bevorzugt Serin¹⁵⁷ phosphoryliert

wird und erst sekundär im Zeitverlauf Serin²³⁹. Ein Maximum der Phosphorylierung von Serin²³⁹ wird hier erst nach 10 Minuten erreicht. Stimuliert man hingegen mit 100µM SNP, gibt es eine deutliche Phosphorylierung bereits nach 0,5 Minuten, die sich sukzessive steigert, bis ihr Maximum nach 5 Minuten erreicht wird. Eine Kombination aus 10µM PGE₁ und 100µM SNP zeigt die gleiche Phosphorylierungskinetik wie SNP alleine, aber mit einer etwa 10% schwächeren Phosphorylierung (siehe Abb. (12)).

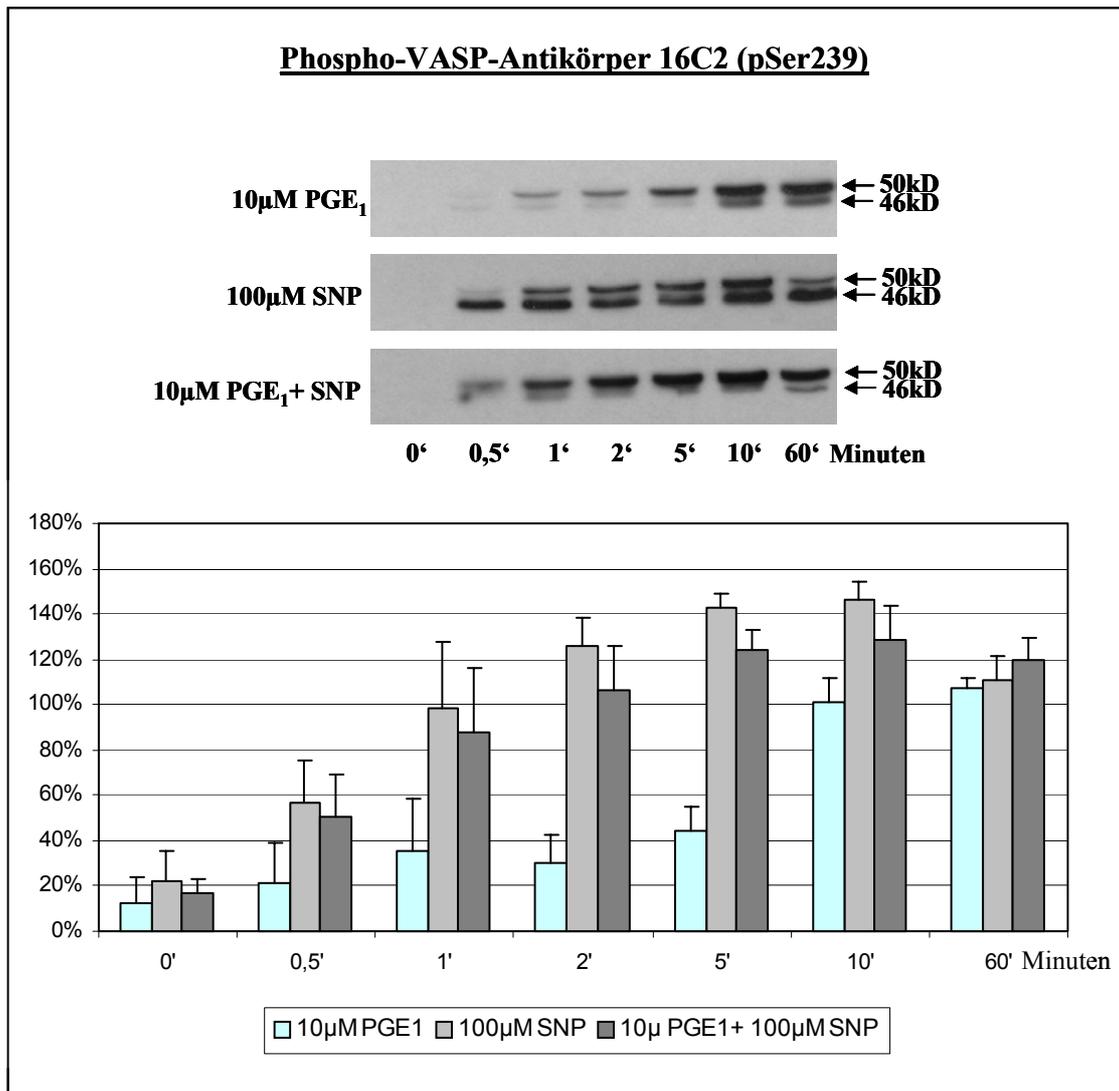


Abb. (12): Westernblot-Analyse gewaschener Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ (10µM) und SNP (100µM) mit dem 16C2-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin²³⁹ (pSer239). Abbildung der Röntgenfilmausschnitte (oben) und Mittelwert mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der Quantifizierung der Schwärzung des Röntgenfilms (unten). Die 46kD-Bande entspricht VASP, das an Serin²³⁹ phosphoryliert ist, das 50kD-Polypeptid entspricht VASP, das zusätzlich an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert wurde.

Niedrige Konzentrationen an PGE₁ (100nM) und SNP (1µM) führten, wenn sie einzeln als Stimulanzen eingesetzt wurden, annähernd zu einer gleich starken Phosphorylierung des Serins²³⁹ (siehe Abb. (13)). Eine deutliche Phosphorylierung sieht man erst nach 5 Minuten, die nach 10 Minuten ihr Maximum erreicht und sich dabei fast verdoppelt hat. Eine Kostimulation mit beiden Substanzen zeigt den gleichen langsamen Anstieg der Phosphorylierungsintensität mit einem Maximum nach 10 Minuten. Die Werte liegen aber immer deutlich über denen der Einzelstimulationen. Im Bereich der maximalen Phosphorylierung liegen sie sogar mehr als ein Drittel darüber.

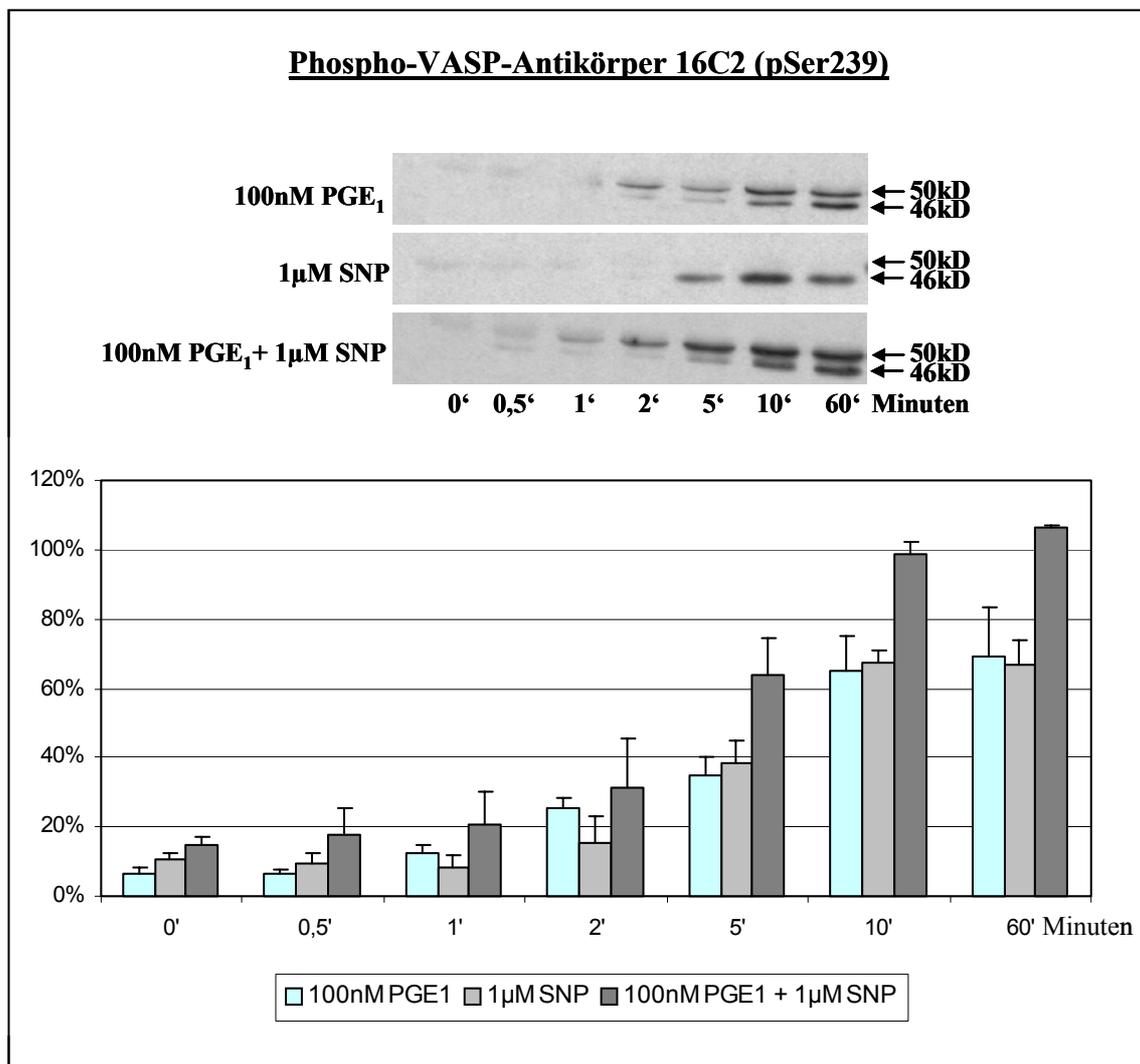


Abb. (13): Westernblot-Analyse gewaschener Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ (100nM) und SNP (1µM) mit dem 16C2-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin²³⁹ (pSer239). Abbildung der Röntgenfilmausschnitte (**oben**) und Mittelwert mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der Quantifizierung der Schwärzung des Röntgenfilms (**unten**). Die 46kD-Bande entspricht VASP, das an Serin²³⁹ phosphoryliert ist, das 50kD-Polypeptid entspricht VASP, das zusätzlich an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷ bevorzugt durch PGE₁ und die von Serin²³⁹ durch SNP stimuliert wird. Anscheinend wird die jeweils andere Phosphorylierungsstelle erst später mitphosphoryliert. Besonders deutlich wird das, wenn man die Stimulationen mit 10µM PGE₁ vergleicht. Serin¹⁵⁷ ist bereits nach 0,5 Minuten deutlich phosphoryliert, dagegen wird die Phosphorylierung an Serin²³⁹ erst nach 10 Minuten maximal, wenn die Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ bereits wieder abnehmend ist. Nach Stimulation mit PGE₁ zeigt sich ein wesentlich schnellerer Anstieg der Phosphorylierung als mit SNP. Hohe Konzentrationen haben sowohl einen schnelleren Anstieg der Phosphorylierung zur Folge, als auch das Erreichen höherer Maxima.

Ergebnis: Die Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷ wird bevorzugt durch PGE₁ und die von Serin²³⁹ durch SNP stimuliert. Die Stimulation mit PGE₁ führt zu einem wesentlich schnelleren Anstieg der Phosphorylierung als die mit SNP.

5.1.4 Synergistischer Effekt von PGE₁ und SNP auf die VASP-Phosphorylierung

Fragestellung: Hat die Kombination von SNP und PGE₁ einen synergistischen Effekt auf die VASP-Phosphorylierung?

Plättchenreiches Plasma wurde mit 100nM PGE₁ und/oder mit verschiedenen SNP Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) 5 Minuten stimuliert. Die Proben wurden mit einem der phosphospezifischen VASP-Antikörper 5C6 oder 16C2 inkubiert und mit Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und der Mittelwert mit Standardfehler berechnet.

Ein verstärkender Effekt war deutlich bei allen drei SNP-Konzentrationen zu sehen. Dies ließ sich sowohl an Serin¹⁵⁷ mit dem 5C6 Antikörper als auch an Serin²³⁹ mit dem 16C2 Antikörper zeigen. Als Beispiel wird die Kostimulation mit 10µM SNP angeführt (*siehe Abb. (14)*). Man sieht hier deutlich die Einzeleffekte der Stimulanzien und die Verstärkung bei gleichzeitiger Stimulation mit beiden Substanzen.

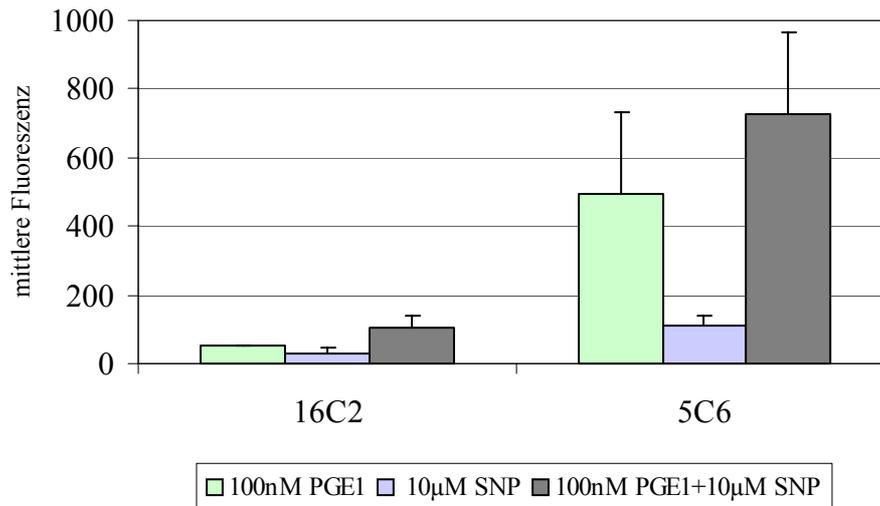


Abb. (14): FACS-Analyse Plättchenreichen Plasmas nach Stimulation mit 100nM PGE₁, 10µM SNP und beiden Substanzen mit dem 16C2-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin²³⁹ und mit dem 5C6-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin¹⁵⁷. Abbildung der Mittelwerte der mittlere Fluoreszenzen mit Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Ergebnis: Es zeigt sich ein verstärkender Effekt der gleichzeitigen Stimulation mit PGE₁ und SNP im Vergleich mit den Einzelstimulationen.

5.1.5 Analyse der VASP-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie

Fragestellung: Ergeben sich bei der FACS-Analyse mit den Pophsfo-VASP Antikörpern 5C6 und 16C2 Ergebnisse, die mit denen der Western Blot Analyse vergleichbar sind?

5.1.5.1 Analyse der VASP-Phosphorylierung in stimulierten Thrombozyten mit dem 5C6-Antikörper in der FACS-Analyse

Die Versuche wurden wie unter 4.1.2 beschriebenen durchgeführt. Wie auch bei der Westernblot-Analyse zeigt sich eine rasche und deutliche Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ nach Stimulation mit 10µM PGE₁ (siehe Abb. (15)). Es entwickelt sich ein Maximum nach etwa 2 Minuten. Dagegen führt eine alleinige Stimulation mit 100µM SNP zu einer deutlich schwächeren Phosphorylierung. Ein Maximum wird hier, genau wie beim Westernblot, nach 5 Minuten erreicht. Kombiniert man beide Stimulanzen (10µM PGE₁ + 100µM SNP), zeigt sich die gleiche Phosphorylierungskinetik wie bei PGE₁ alleine, aber mit einer durchgehend stärkeren Phosphorylierung.

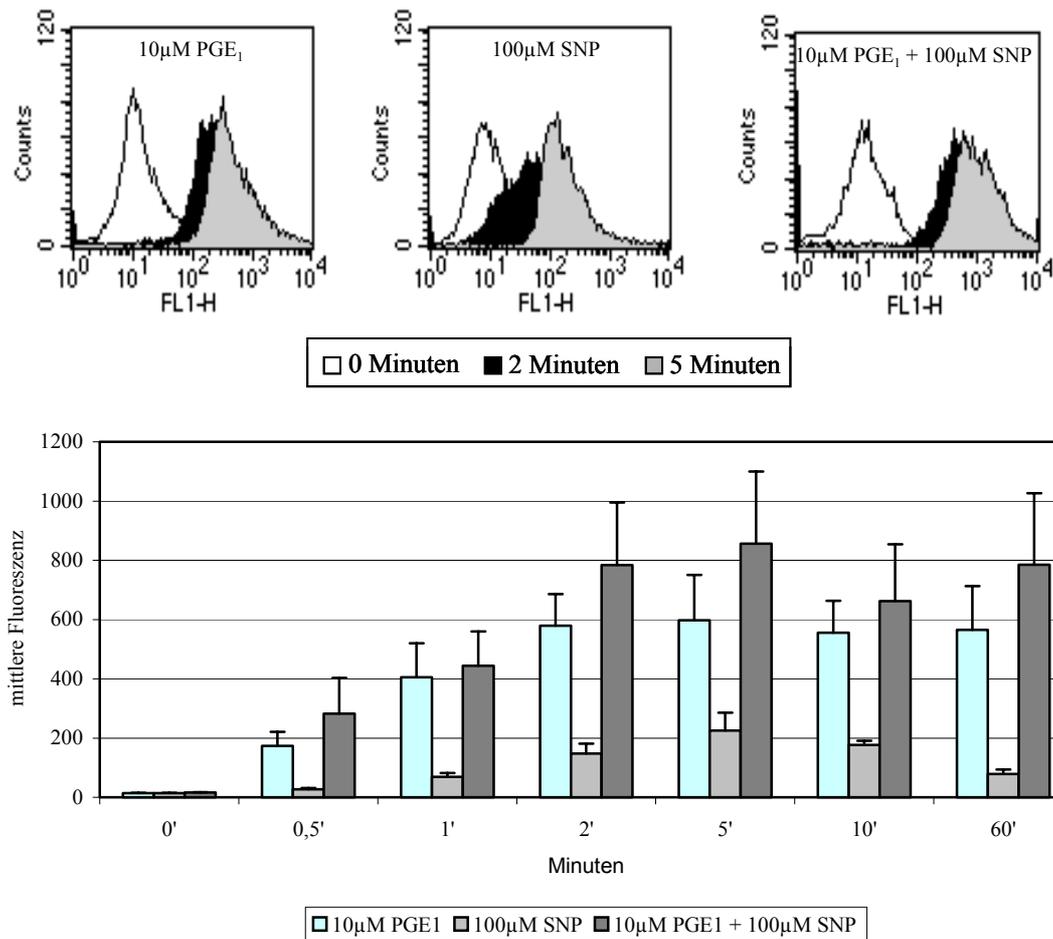
Phospho-VASP-Antikörper 5C6 (pSer157)

Abb. (15): FACS-Analyse von Plättchenreichem Plasma nach Stimulation mit PGE₁ (10µM) und SNP (100µM) mit dem 5C6-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin¹⁵⁷ (pSer157). Abbildung der Histogrammplots (oben) und eine Zusammenfassung der mittleren Fluoreszenz (unten) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Auch bei niedrigen PGE₁ Konzentrationen zeigt sich eine schnelle Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷. Die Phosphorylierung verläuft in diesem Falle etwas langsamer als mit der höheren Konzentration an PGE₁ und das erreichte Maximum ist halb so groß. Eine Stimulation mit 1µM SNP alleine führt in der Durchflusszytometrie an Serin¹⁵⁷ zu gleich starker Phosphorylierung wie bei hundertfach höherer Konzentration, jedoch mit einem initial langsamerem Anstieg. Kombiniert man die Stimulanzien PGE₁ und SNP, dann wird Serin¹⁵⁷ etwas langsamer phosphoryliert als mit PGE₁ alleine, aber die Phosphorylierung bleibt länger stabil. Das Maximum wird nach 5 Minuten erreicht. Bei allen drei Stimulationen zeigt sich jeweils ein Abfall der Phosphorylierung nach Erreichen des Maximums (siehe Abb. (16)).

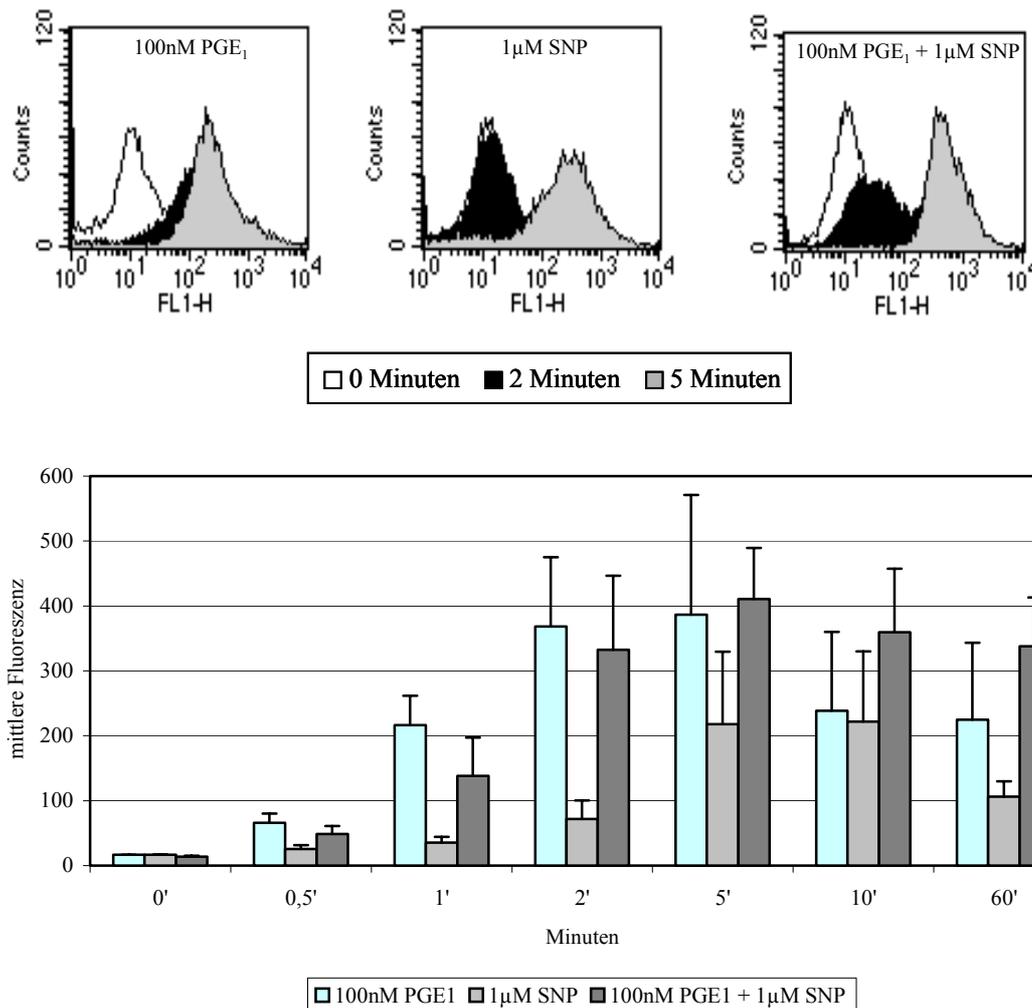
Phospho-VASP-Antikörper 5C6 (pSer157)

Abb. (16): FACS-Analyse von Plättchenreichem Plasma nach Stimulation mit PGE₁ (100nM) und SNP (1µM) mit dem 5C6-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin¹⁵⁷ (pSer157). Abbildung der Histogrammplots (oben) und eine Zusammenfassung der mittleren Fluoreszenzen (unten) aus mind. 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

5.1.5.2 Analyse der VASP-Phosphorylierung in stimulierten Thrombozyten mit dem 16C2-Antikörper in der FACS-Analyse

Stimulation mit PGE₁ führt an Serin²³⁹ scheinbar erst nach Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷ zu einer Phosphorylierung. Der 16C2 Antikörper zeigt erst nach 10 Minuten das stärkste Ausmaß der Phosphorylierung mit Werten, die der Hälfte der Maxima entsprechen, die an Serin¹⁵⁷ gemessen wurden. SNP hingegen führt bevorzugt zu einer Phosphorylierung an Serin²³⁹. Zwar ist die Kinetik der Phosphorylierung vergleichbar mit der an Serin¹⁵⁷ mit einem Maximum nach 5 Minuten und anschließendem Abfall der Phosphorylierung, aber es werden 3fach höhere Werte erreicht. Eine Kostimulation mit

10 μ M PGE₁ und 100 μ M SNP führt erstaunlicher Weise nur zu einer verhältnismäßig schwachen Phosphorylierung mit einem langsamen Anstieg und Maxima, die unterhalb der Werte liegen, die eine alleinige Stimulation mit PGE₁ erzielten (siehe Abb. (17)).

Phospho-VASP-Antikörper 16C2 (pSer239)

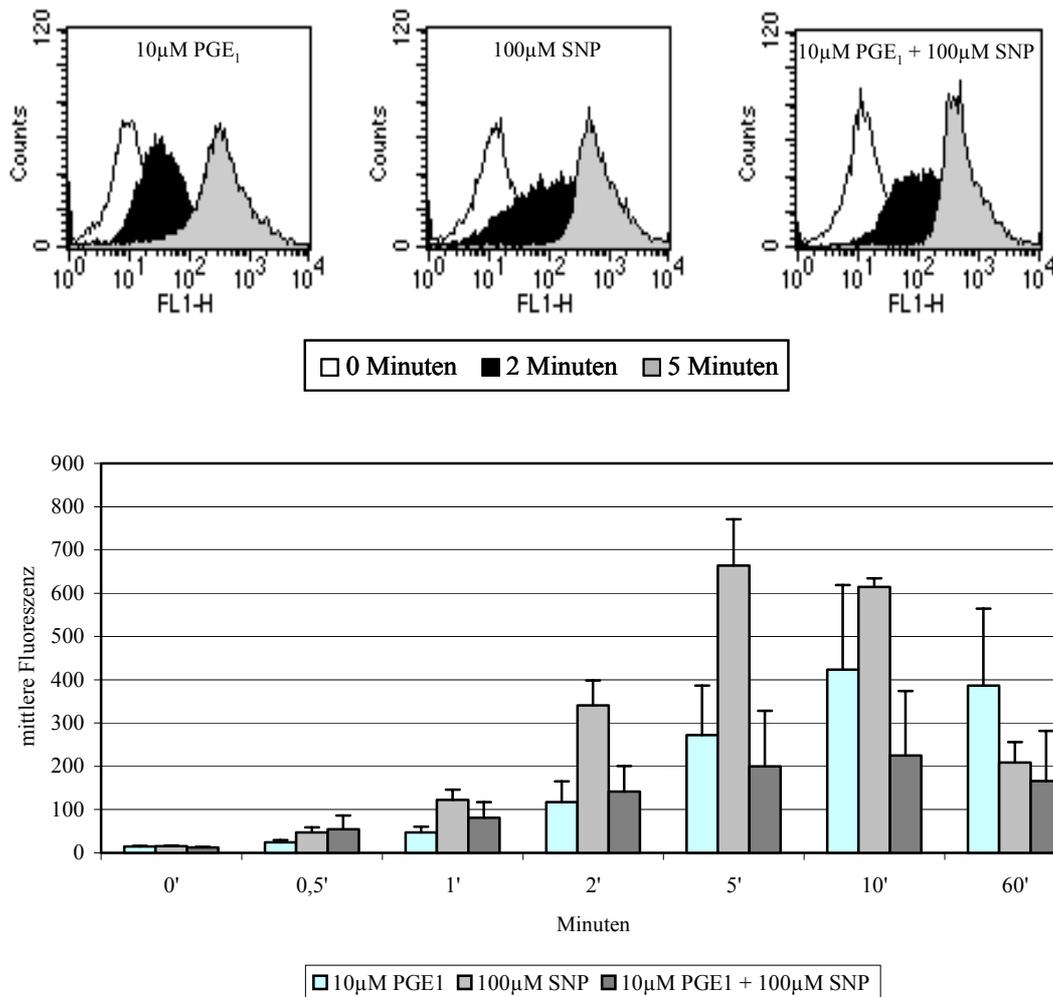


Abb. (17): FACS-Analyse Plättchenreichen Plasmas nach Stimulation mit PGE₁ (10 μ M) und SNP (100 μ M) mit dem 16C2-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin²³⁹. Abbildung der Histogrammplots (oben) und eine Zusammenfassung der mittleren Fluoreszenzen (unten) aus mind. 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Niedrige Konzentrationen an Stimulanzen führen nach Stimulation mit 100nM PGE₁ an Serin²³⁹ zu einer nur sehr schwachen Phosphorylierung mit einem Maximum nach 10 Minuten. Nach Stimulation mit 1 μ M SNP ist zwar eine deutliche Phosphorylierung sichtbar, aber im Vergleich mit der hundertfach höheren Konzentration, kommt es hier zu einem langsameren Anstieg der Phosphorylierung. Das Maximum liegt bei 10

Minuten und es entspricht nur einem Viertel der Phosphorylierung der höheren Konzentration. Allgemein ist ein deutliches Signal erst nach 5 Minuten sichtbar (*siehe Abb. (18)*). Dies trifft auch auf die Kostimulation mit 100nM PGE₁ und 1µM SNP zu. Die Werte übersteigen zwar die der alleinigen Stimulation mit PGE₁, liegen aber deutlich unter denen der SNP-Stimulation.

Phospho-VASP-Antikörper 16C2 (pSer239)

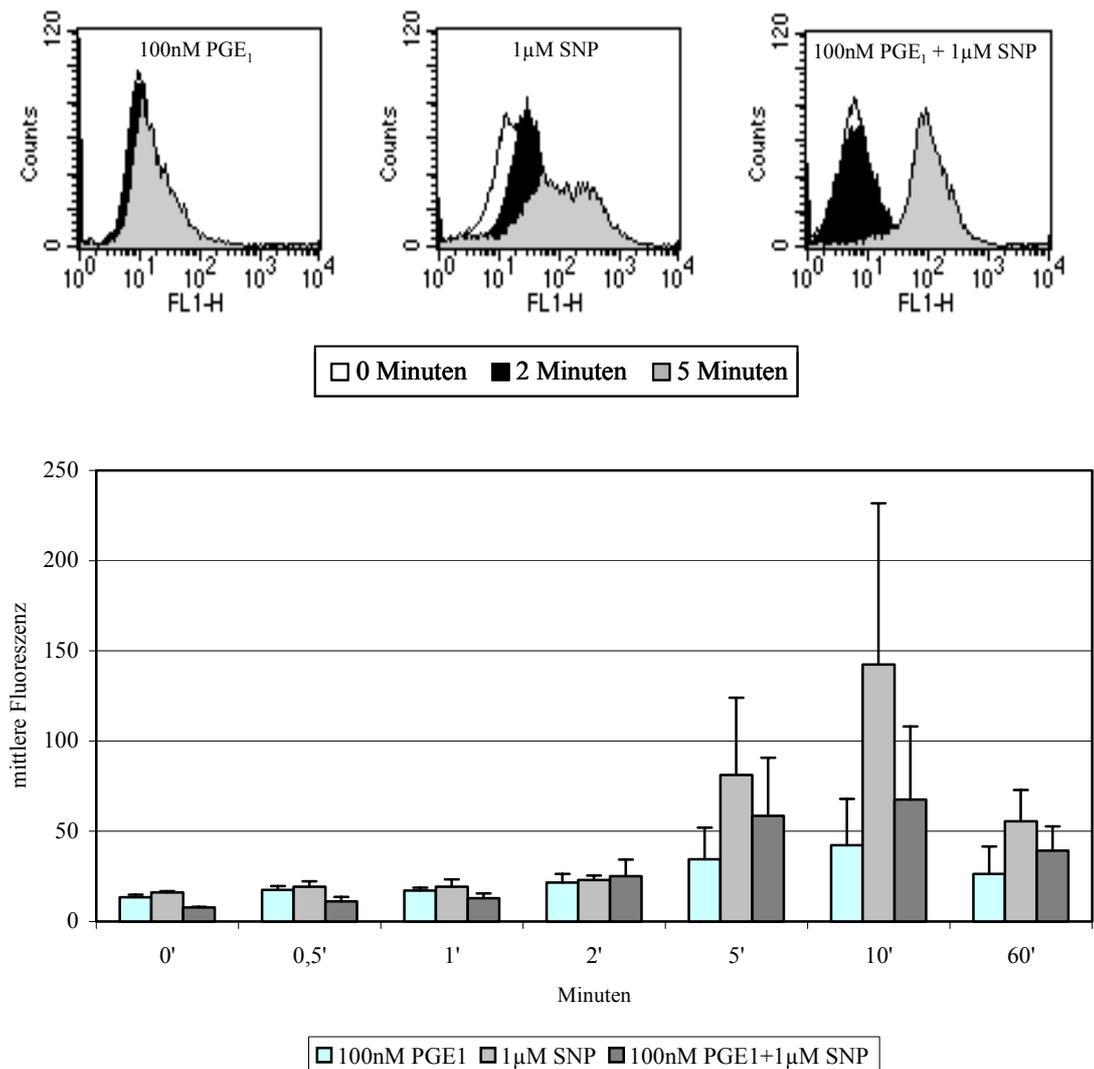


Abb. (18): FACS-Analyse von Plättchenreichem Plasma nach Stimulation mit PGE₁ (100nM) und SNP (1µM) mit dem 16C2-Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Serin²³⁹ (pSer239). Abbildung der Histogrammplots (oben) und eine Zusammenfassung der mittleren Fluoreszenzen (unten) aus mind. 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Durchflusszytometrie und die Westernblot-Analyse vergleichbare Ergebnisse liefern. Auch in der Durchflusszytometrie zeigte sich deutlich, dass Serin¹⁵⁷ bevorzugt durch die Stimulation

mit PGE₁ phosphoryliert wird und die Phosphorylierung von Serin²³⁹ durch SNP stimuliert wird. Außerdem scheint es, dass die jeweils andere Phosphorylierungsstelle erst nach der bevorzugten mitphosphoryliert wurde. Nach Stimulation mit PGE₁ kommt es an Serin¹⁵⁷ zu einer schnellen und starken Phosphorylierung, verglichen mit der Phosphorylierung an Serin²³⁹. Hier ist die Phosphorylierung schwächer und das Maximum wird viel später erreicht. Genau umgekehrt verhalten sich die Phosphorylierungsstellen nach Stimulation mit SNP. Allgemein zeigte sich auch bei der FACS-Analyse, dass nach Stimulation mit PGE₁ sich ein wesentlich schnellerer Anstieg der Phosphorylierung zeigt, als mit SNP. Hohe Konzentrationen an Stimulanzien haben sowohl einen schnelleren Anstieg der Phosphorylierung zur Folge, als auch das Erreichen höherer Maxima.

Ergebnis: Die Durchflusszytometrie und die Westernblot-Analyse liefern vergleichbare Ergebnisse.

5.1.6 Immunfluoreszenz von Thrombozyten mit den phosphospezifischen VASP-Antikörpern

Ziel: Lokalisation von VASP und phosphoryliertem VASP in den Thrombozyten in Bezug auf filamentäres Aktin.

Plättchenreiches Plasma wurde für 20 Minuten zum Adhären auf Deckgläschen gegeben. Die angehefteten Thrombozyten wurden anschließend für 10 Minuten mit 10µM PGE₁ in PBS, 100µM SNP in PBS oder nur PBS stimuliert. Danach wurden die an den Deckgläschen haftenden Thrombozyten in mehreren Schritten fixiert und permeabilisiert (siehe Methoden) und anschließend mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Es wurden entweder FITC-markiertes Phalloidin und ein Antikörper gegen VASP (5C6, 16C2, M4) oder der Antikörper M4 und ein phosphospezifischer VASP-Antikörper (5C6, 16C2) verwendet.

Der 5C6-Antikörper färbt die Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ deutlich an (*siehe Abb. (19)*). Die Färbung der stimulierten Thrombozyten mit den Antikörpern 5C6 und M4 war identisch. Dieses Ergebnis legt nahe, dass phosphoryliertes VASP und VASP ähnlich in der Zelle lokalisiert sind, oder dass der überwiegende Anteil der VASP-Moleküle bereits phosphoryliert ist. Auch bei kürzerer Stimulation und geringerer PGE₁ Konzentration war es mir nicht möglich, einen deutlichen Unterschied herauszuarbeiten (Bilder nicht gezeigt).

Phosphoryliertes VASP und filamentäres Aktin (F-Aktin) (Färbung mit Phalloidin) sind beide in punktförmigen Strukturen in den Thrombozyten verteilt. Die Kolo-kalisation des 5C6 Antikörpers und der Phalloidin-Fluoreszenz zeigt, dass phosphoryliertes VASP an Stellen in den Thrombozyten angereichert ist, die filamentäres Aktin enthalten. Diese Strukturen könnten der Verteilung nach fokalen Kontakten entsprechen.

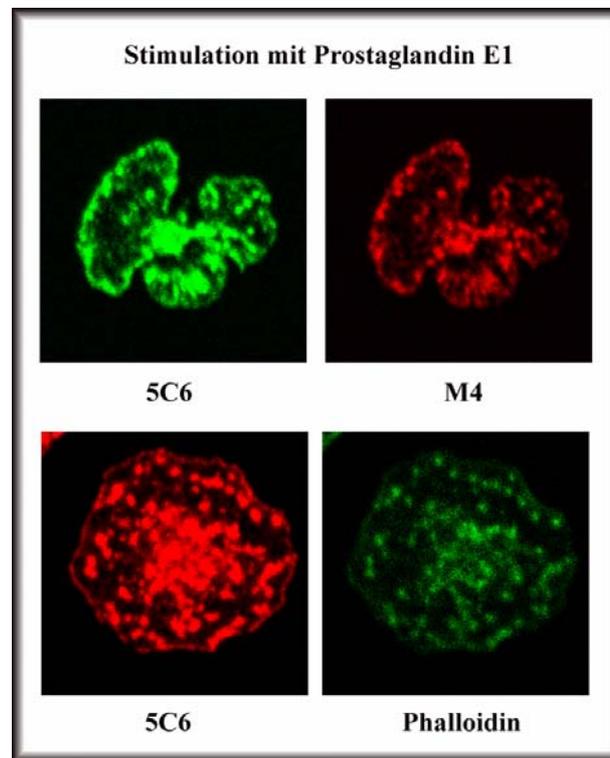


Abb. (19): Darstellung des VASP-Moleküls in mit $10\mu\text{M}$ PGE_1 stimulieren Thrombozyten durch Immunfluoreszenz.

(obere Reihe) Doppelimmunfluoreszenz mit den VASP-Antikörpern 5C6 und M4. (untere Reihe) Doppelfärbung mit dem Antikörper 5C6 und FITC-markiertem Phalloidin.

Genauso wie der 5C6-Antikörper verhielt sich erwartungsgemäß der 16C2-Antikörper. Es war eine deutliche Antikörper-Färbung nach Stimulation mit $10\mu\text{M}$ PGE_1 sichtbar. Auch hier erscheint phosphoryliertes VASP und filamentäres Aktin kolo-kalisiert zu sein (siehe Abb. (20)). Auch ist wiederum die punktförmige Anreicherung von VASP und filamentärem Aktin sichtbar.

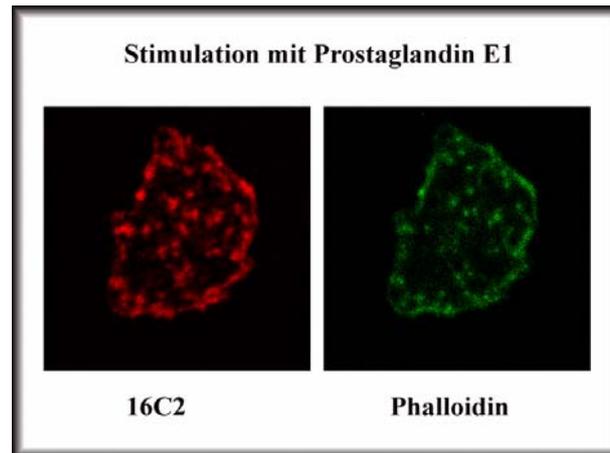


Abb. (20): Darstellung von phosphoryliertem VASP und F-Aktin in mit $10\mu\text{M}$ PGE_1 stimulierten Thrombozyten durch Immunfluoreszenz.

Doppelfärbung mit dem VASP-Antikörper 16C2 und FITC-markiertem Phalloidin.

Um zu überprüfen, wie VASP im unphosphorylierten Zustand in den Thrombozyten verteilt ist, wurden auch unstimulierte Thrombozyten gefärbt. In der Doppelimmunfluoreszenz mit den Antikörpern 5C6 und M4 sieht man, dass 5C6 die Thrombozyten nicht färbt (*siehe Abb. (21)*). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass in Thrombozyten, die nicht unter dem Einfluss cAMP oder cGMP erhöhender Substanzen stehen, VASP nicht an Serin¹⁵⁷ phosphoryliert wird. Das vom Antikörper M4 erkannte VASP ist in unstimulierten Thrombozyten diffuser verteilt als im PGE_1 stimulierten Thrombozyten. Der größte Anteil des filamentären Aktins kolokalisiert nicht mit VASP. Die deutliche Randfärbung der Thrombozyten weist daraufhin, dass das meiste F-Aktin gleichmäßig an die Plasmamembran gebunden zu sein scheint.

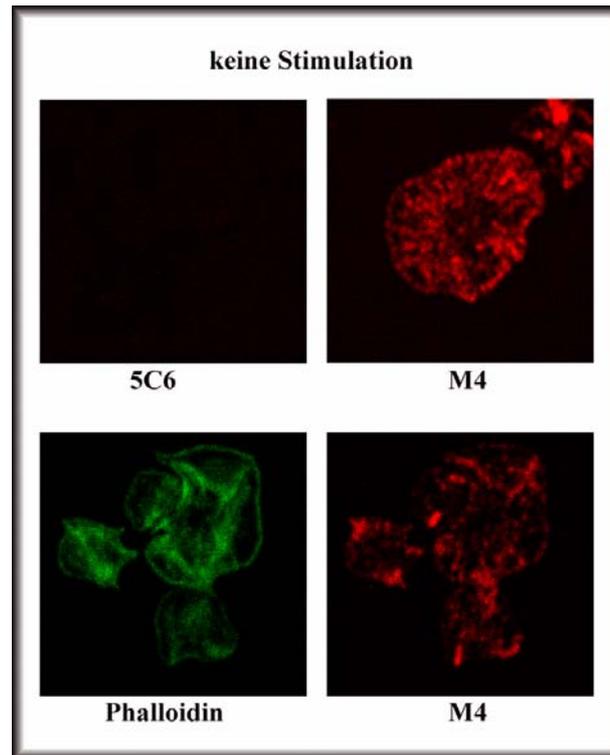


Abb. (21): Fluoreszenzmikroskopie der Verteilung von VASP und F-Aktin in unstimulierten Thrombozyten.

(**obere Reihe**) Gleichzeitige Anfärbung von unstimulierten Thrombozyten mit den VASP-Antikörpern 5C6 und M4. (**untere Reihe**) Gleichzeitige Anfärbung von unstimulierten Thrombozyten mit dem VASP-Antikörper M4 und FITC markiertem Phalloidin, das an filamentäres Aktin bindet.

Die Ergebnisse nach Stimulation mit SNP waren identisch mit denen von der Stimulation mit PGE_1 . Deshalb werden die Daten nicht gezeigt.

Ergebnis: Zusammenfassend kann man sagen, dass phosphoryliertes VASP und filamentäres Aktin kolokalisiert in punktuellen Anhäufungen im Bereich der Thrombozytenmembran erscheinen, die der Aktinverteilung nach fokalen Kontakten entsprechen. Ohne Stimulation mit cAMP oder cGMP erhöhenden Substanzen ist in den Thrombozyten keine Phosphorylierung des VASP-Proteins mit dem 5C6-Antikörper nachweisbar. Außerdem scheint VASP diffuser in den Thrombozyten verteilt zu sein. VASP erscheint in unphosphorylierter Form nicht eindeutig mit Aktin zu kolokalisieren. Auch Aktin erscheint flächiger über die Thrombozyten verteilt.

Meine Ergebnisse zeigten:

- *Die Antikörper 5C6 und 16C2 binden jeweils nur an die für sie spezifische phosphorylierte Aminosäure.*
- *Der Antikörper 5C6 ist ein guter Marker für die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ durch die PKA.*
- *Die PKA bevorzugt Serin¹⁵⁷ vor Serin²³⁹ und phosphoryliert Serin¹⁵⁷ mit einer schnelleren Zeitkinetik als die PKG.*
- *Durchflusszytometrie und Westernblot liefern vergleichbare Ergebnisse für die Analyse der VASP Phosphorylierung.*
- *Die Durchflusszytometrie ist mit wesentlich geringeren Mengen Blut durchführbar und liefert schneller Ergebnisse als die quantitative Auswertung von Immunoblots.*
- *VASP kolokalisiert im phosphorylierten Zustand mit filamentären Aktin in punktuellen Anhäufungen im Bereich der Thrombozytenmembran, die der Aktinverteilung nach für fokale Kontakte sprechen.*

5.2 Teil 2:**Ziel:**

Untersuchung der Rolle des Proteins VASP bei der Proliferation und Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen in Megakaryozyten und Thrombozyten.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich vor allen Dingen auf den Einfluss einer cGMP analogen Substanz (8-pCPT-cGMP) auf die Ausdifferenzierung und die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen der Maus. 8-pCPT-cGMP stimuliert in den Zellen die PKG und induziert damit eine Phosphorylierung des Substratproteins VASP (Waldmann et al. 1987). Vor wenigen Jahren gelang es VASP knock out Mäuse zu züchten (Hauser et al. 1999). Diese Mäuse entsprechen vom Phänotyp her Wildtypmäusen. Histologisch zeigten sie eine mäßige Hyperplasie der Megakaryopoese

im Knochenmark, außerdem fielen die Thrombozyten durch eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung auf, auslösbar durch Agonisten wie zum Beispiel Thrombin. Besonderes Interesse galt daher der Frage, ob ein Unterschied zwischen Wildtypmäusen und VASP knock out Mäusen in Bezug auf die Entwicklung der Megakaryozyten besteht.

Hierfür wurden Sca-1 positive Knochenmarksstammzellen (siehe Methoden) sowohl aus Wildtyp- als auch aus VASP knock out Mäusen isoliert. Pro Mulde einer Zellkulturplatte wurden je 10000 Stammzellen in MarrowMAX™ Kulturmedium kultiviert. Es wurden Maus-Interleukin 6, Thrombopoetin und humanes Interleukin 11 (je 10ng/ml) zugefügt. Die Schälchen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an 8-pCPT-cGMP (25µM; 50µM) stimuliert und an den Tagen 9 und 12 geerntet. Es wurden sowohl von den Wildtypmäusen, als auch von den VASP knock out Mäusen mindestens je drei von einander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Sca-1 und CD41 gefärbt und anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie im Bezug auf ihre Proliferation und Ausdifferenzierung analysiert.

5.2.1 Entsprechen die isolierten Zellen der gesuchten Stammzellpopulation?

Als erstes wurde getestet, ob die isolierten Zellen zur Stammzellpopulation gehörten. Die Zellen wurden nach Isolation und Separation mit Antikörpern gegen Sca-1 oder CD41 gefärbt und der prozentuale Anteil gegenüber Kontrollfärbungen durch Durchflusszytometrie mit Hilfe des Densityplots ermittelt. Als Kontrolle für den Sca-1-Antikörper wurde FITC-rat IgG2a,κ isotyp control Immunglobulin verwendet. Der CD41-Antikörper wurde mit einer Färbung ohne 1. Antikörper verglichen. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Es zeigte sich das im Mittel mehr als 95% der Zellen Sca-1 positiv waren, dagegen waren durchschnittlich nur 5,5% der Zellen CD41 positiv (*siehe Abb. (22)*).

Dieses Ergebnis zeigt, dass fast alle isolierten Zellen der gewünschten Stammzellpopulation entsprachen.

Oberflächenantigene der Stammzellen nach Isolation und Separation

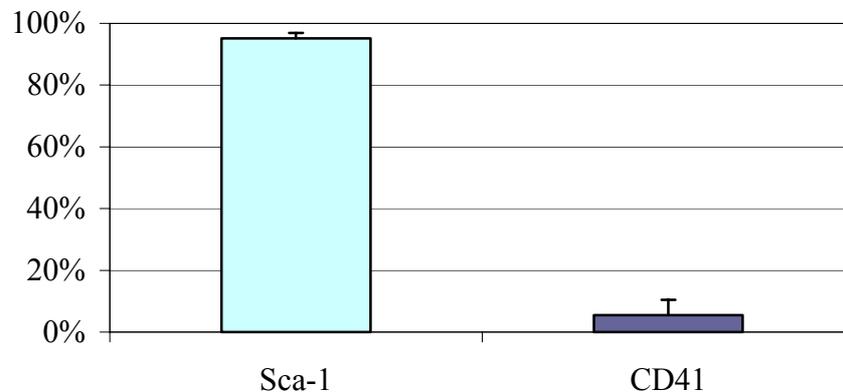


Abb. (22): Verteilung der Oberflächenantigene der Mausstammzellen nach Isolation und Separation.

Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen Sca-1 oder CD41. Auswertung mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Mehr als 95% der Zellen entsprechen der gesuchten Stammzellpopulation.

5.2.2 Proliferation

Die Zellen wurden wie beschrieben (siehe Methoden) geerntet und mit Hilfe des LeucoCOUNT™-Kits (Becton Dickinson) gezählt. Die unstimulierten Zellen wurden gleich 100% gesetzt und die prozentuale Abweichung der stimulierten Zellen berechnet. Aus diesen Abweichungen wurden Mittelwert und Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Fragestellung: Welchen Einfluss hat 8-pCPT-cGMP auf die Proliferation der Stammzellen von VASP Wildtypmäusen und VASP knock out Mäusen?

5.2.2.1 Proliferation der Stammzellen der VASP Wildtypmäuse

8-pCPT-cGMP wirkt konzentrationsabhängig auf hämatopoetische Stammzellen von Wildtypmäusen (siehe Abb.(23)). Konzentrationen von 25µM 8-pCPT-cGMP hemmen signifikant die Proliferation sowohl am Tag 9 ($p=0,009$), als auch am Tag 12 ($p=0,006$). Nach Stimulation mit 50µM 8-pCPT-cGMP zeigte sich ein konzentrationsabhängiger dualer Effekt auf die Zellproliferation. Konzentrationen von 50µM 8-pCPT-cGMP fördern nämlich signifikant das Wachstum am Tag 9 ($p=0,031$) und am Tag 12 ($p=0,003$). Der Unterschied zur unstimulierten Population ist bei beiden Konzentrationen am Tag 12 ausgeprägter als am Tag 9.

Proliferation: Stammzellen von VASP Wildtypmäusen

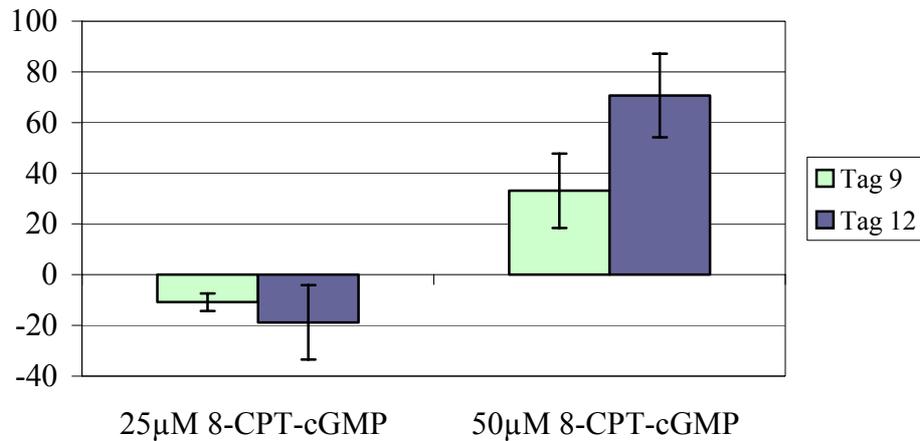


Abb. (23): Prozentuale Proliferation der Stammzellen von VASP Wildtypmäusen nach Stimulation mit 25 oder 50 μM 8-pCPT-cGMP im Vergleich zur unstimulierten Population. Analyse am Tag 9 und Tag 12. Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Ergebnis: 8-pCPT-cGMP wirkt konzentrationsabhängig auf hämatopoetische Stammzellen von Wildtypmäusen. Niedrige Konzentrationen hemmen die Proliferation und hohe Konzentrationen fördern das Wachstum (dualer Effekt).

5.2.2.2 Proliferation der Stammzellen der VASP knock out Mäuse

8-pCPT-cGMP wirkt auf hämatopoetische Stammzellen von VASP knock out Mäusen proliferationsfördernd (*siehe Abb. (24)*). Nach Stimulation mit 25 μM 8-pCPT-cGMP zeigte sich am Tag 9 ein tendenzieller Anstieg der Proliferation ($p=0,064$) und am Tag 12 eine signifikante Proliferationsförderung ($p=0,001$). Nach Stimulation mit 50 μM 8-pCPT-cGMP kommt es am Tag 9 zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation ($p=0,029$) und es zeigte sich eine tendenzielle Proliferationsförderung ($p=0,056$) an Tag 12.

Proliferation: Stammzellen von VASP knock out Mäusen

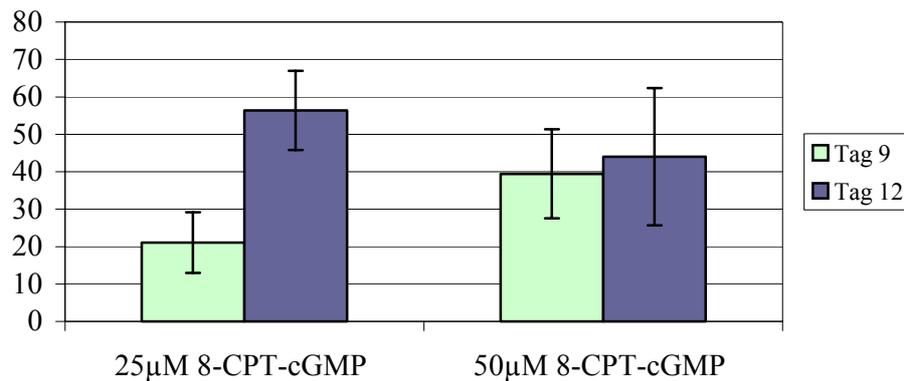


Abb. (24): Prozentuale Proliferation der Stammzellen von VASP knock out Mäusen nach Stimulation mit 25 oder 50 μM 8-pCPT-cGMP im Vergleich zur unstimulierten Population. Analyse am Tag 9 und Tag 12. Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Ergebnis: 8-pCPT-cGMP fördert unabhängig von der Konzentration die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen von VASP knock out Mäusen.

5.2.3 Ausdifferenzierung zu CD41 positiven Zellen

Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet und mit Antikörpern gegen Sca-1 und CD41 gefärbt (siehe Methoden). Stammzellen verlieren im Laufe ihrer Ausdifferenzierung in Richtung Megakaryozyten das Sca-1-Antigen und werden für CD41 positiv. Dies ist ein Oberflächenantigen, das sowohl auf Megakaryozyten als auch auf Thrombozyten zu finden ist (Phillips et al. 1988). Anschließend wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert und mit Hilfe des Densityplots der Anteil an CD41 positiven Zellen ermittelt. Der Wert ohne Stimulation wurde gleich 100% gesetzt und die prozentuale Abweichung der Werte der stimulierten Zellen berechnet. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Fragestellung: Welchen Einfluss hat 8-pCPT-cGMP auf die Differenzierung der Stammzellen von VASP Wildtypmäusen und VASP knock out Mäusen?

5.2.3.1 Differenzierung der Stammzellen der VASP Wildtypmäuse

8-pCPT-cGMP wirkt konzentrationsabhängig auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von Wildtypmäusen (siehe Abb. (25)). Verwertbare Ergebnisse konnten

hier nur an Tag 9 ermittelt werden. Konzentrationen von 25µM 8-pCPT-cGMP führen tendenziell zu einer Förderung der Ausdifferenzierung zu CD41 positiven Zellen ($p=0,057$). Hohe Konzentrationen (50µM 8-pCPT-cGMP) zeigen eine signifikante Hemmung der Ausdifferenzierung ($p=0,0039$). Hier zeigte sich genauso wie bei der Proliferation der Wildtypzellen ein dualer Effekt des cGMP-Analogen.

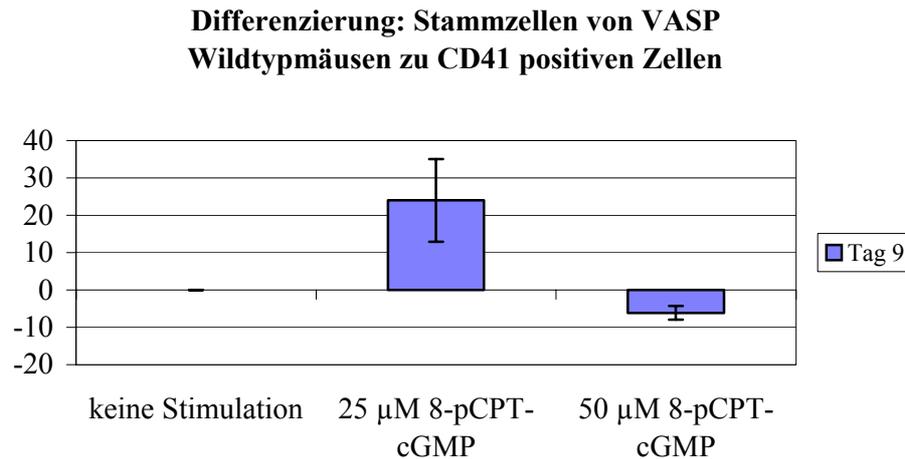


Abb. (25): Prozentuale Ausdifferenzierung der Stammzellen von VASP Wildtypmäusen nach Stimulation mit 25 oder 50µM 8-pCPT-cGMP zu CD41 positiven Zellen im Vergleich zur unstimulierten Population. Analyse am Tag 9. Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Ergebnis: 8-pCPT-cGMP wirkt konzentrationsabhängig auf die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen von Wildtypmäusen. Niedrige Konzentrationen fördern die Bildung von CD41 positiven Zellen und hohe Konzentrationen hemmen die Differenzierung (dualer Effekt).

5.2.3.2 Differenzierung der Stammzellen der VASP knock out Mäuse

8-pCPT-cGMP wirkt auf hämatopoetische Stammzellen von VASP knock out Mäusen hemmend auf die Ausdifferenzierung zu CD41 positiven Zellen (*siehe Abb. (26)*). Verwertbare Ergebnisse konnten hier nur an Tag 9 ermittelt werden. Stimulation mit 25µM 8-pCPT-cGMP führt zu einer signifikanten Hemmung der Ausdifferenzierung ($p=0,0064$) genau wie eine Stimulation mit 50µM 8-pCPT-cGMP ($p=0,0006$). Höhere Konzentrationen haben einen stärkeren Effekt als niedrigere.

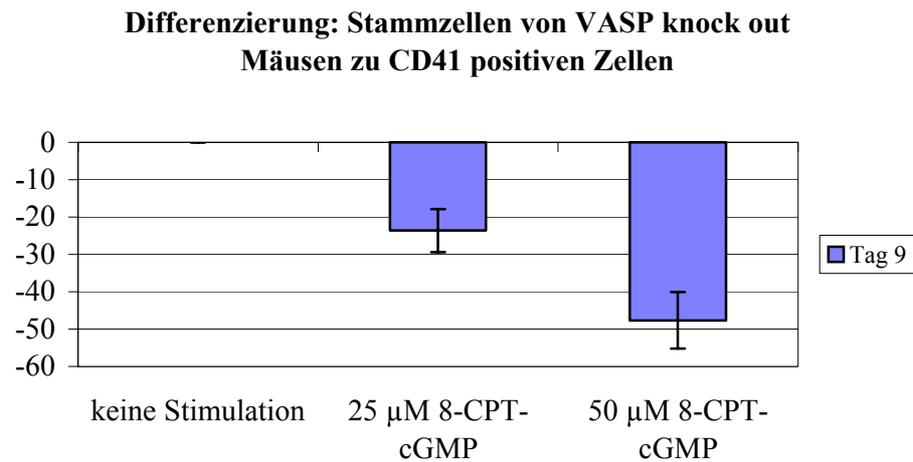


Abb. (26): Prozentuale Ausdifferenzierung der Stammzellen von VASP knock out Mäusen nach Stimulation mit 25 oder 50µM 8-pCPT-cGMP zu CD41 positiven Zellen im Vergleich zur unstimulierten Population. Analyse am Tag 9. Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Ergebnis: 8-pCPT-cGMP hat einen hemmenden Effekt auf die Ausdifferenzierung zu CD41 positiven Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 8-pCPT-cGMP in den Wildtypzellen konzentrationsabhängig wirkt. Niedrige Konzentrationen hemmen das Wachstum, fördern aber die Ausdifferenzierung. Dagegen fördern hohe Konzentrationen die Proliferation, hemmen aber die Differenzierung zu CD41 positiven Zellen. Bei Zellen aus VASP knock out Tieren fördert 8-pCPT-cGMP die Proliferation und hemmt die Differenzierung zu CD41 positiven Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass VASP eine Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen spielt, indem es direkt oder indirekt die Wirkung von differenzierungsfördernden Molekülen wie zum Beispiel dem 8-pCPT-cGMP vermittelt.

Meine Ergebnisse zeigten:

- *8-pCPT-cGMP wirkt konzentrationsabhängig auf hämatopoetische Stammzellen von Wildtypmäusen. Niedrige Konzentrationen hemmen die Proliferation und fördern die Differenzierung zu CD41 positiven Zellen. Hohe Konzentrationen wirken umgekehrt (dualer Effekt).*
- *8-pCPT-cGMP wirkt auf hämatopoetische Stammzellen von VASP knock out Mäusen proliferationsfördernd und hemmt die Ausdifferenzierung zu CD41 positiven Zellen. Höhere Konzentrationen haben einen stärkeren Effekt als niedrigere.*
- *VASP spielt somit eine Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen, indem es direkt oder indirekt die Wirkung von differenzierungsfördernden Molekülen, wie zum Beispiel dem 8-pCPT-cGMP, vermittelt.*

6 Diskussion

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich in mehreren Teilprojekten die Eigenschaften und Funktion von VASP untersucht.

Die wesentlichen Befunde meiner Arbeit sind:

- 1) der 5C6 Antikörper erkennt spezifisch VASP, das an der Stelle Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist.
- 2) Serin¹⁵⁷ wird sowohl cAMP-, als auch cGMP-vermittelt phosphoryliert.
- 3) 8-pCPT-cGMP hat einen dualen, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferation und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von Wildtypmäusen.
- 4) 8-pCPT-cGMP hat einen proliferationsfördernden und einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von VASP knock out Mäusen.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind bei VASP drei Phosphorylierungsstellen bekannt (Serin¹⁵⁷, Serin²³⁹ und Threonin²⁷⁸), die alle sowohl von der PKA als auch der PKG mit überlappender Spezifität phosphoryliert werden. PKA-Aktivierung führt bevorzugt und initial zu einer Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷, die PKG dagegen induziert eine Phosphorylierung bevorzugt an Serin²³⁹ (Butt et al. 1994). Während ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch Serin²³⁹ erkennt, bereits zur Verfügung steht und gut charakterisiert wurde (Smolenski et al. 1998), identifizierte und quantifizierte man bisher die Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ hauptsächlich durch den Mobilitäts-Shift des VASP von 46 auf 50 kDa. Die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch phosphoryliertes Serin¹⁵⁷ erkennt, erlaubt nun die direkte Identifikation und Quantifizierung von phosphoryliertem VASP an dieser Stelle. Durch Transfektion von VASP-Mutanten in Zellen mit kaum vorhandenem endogenem VASP konnte gezeigt werden, dass der Antikörper 5C6 hochspezifisch für an Serin¹⁵⁷ phosphoryliertes VASP ist. Parallel dazu wurde auf gleiche Weise der 16C2-Antikörper mitanalysiert. Es zeigte

sich die bereits von Smolenski et al. beschriebene Spezifität für an Serin²³⁹ phosphoryliertes VASP.

Durch Einsatz der Antikörper gegen phosphoryliertes VASP konnten bereits bestehende Ergebnisse (Butt et al. 1994; Smolenski et al. 1998), die allerdings auf dem Mobilitätsshift von VASP beruhen, wiederholt, bestätigt und ausgebaut werden. VASP wird an Serin¹⁵⁷ bevorzugt durch die PKA über cAMP-erhöhende Substanzen (hier PGE₁) phosphoryliert. An Serin²³⁹ wird VASP bevorzugt durch die PKG über cGMP-erhöhende Substanzen (hier SNP als NO-Donor) phosphoryliert. Es zeigte sich, dass Serin¹⁵⁷ und Serin²³⁹ von beiden Kinasen modifiziert werden, da es beim alleinigen Einsatz von PGE₁ oder SNP auch zu einer Phosphorylierung der anderen Phosphorylierungsstelle kam. Diese wurde aber im Zeitverlauf verzögert und schwächer phosphoryliert als die bevorzugte Phosphorylierungsstelle.

Auch zeigte sich ein synergistischer Effekt der VASP-Phosphorylierung durch gleichzeitige Aktivierung der PKA und der PKG (Nolte et al. 1994). Dies konnte nun sowohl mit dem 5C6- als auch dem 16C2-Antikörper bestätigt werden. Die Stärke und die Geschwindigkeit der Phosphorylierung von VASP ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten Stimulantien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde PGE₁ und SNP verwendet. Hohe Konzentrationen führen zu einer schnelleren und stärkeren Phosphorylierung als niedrige. Der Antikörper 5C6 kann genauso, wie bereits bei dem 16C2-Antikörper beschrieben (Smolenski et al. 1998), phosphoryliertes VASP in intakten und fixierten Zellen erkennen. Die dritte bekannte Phosphorylierungsstelle ist Threonin²⁷⁸. Bisher gelang es noch nicht einen spezifischen Antikörper dagegen herzustellen. Von Butt et al. durchgeführte Versuche lassen vermuten, dass deren Phosphorylierung von geringerer Wichtigkeit ist, da sie erst nach vollständiger Phosphorylierung von Serin¹⁵⁷ und Serin²³⁹ zu erfolgen scheint.

Neueste Forschungsergebnisse deuten an, dass die cGMP-induzierte Phosphorylierung von VASP an Serin²³⁹ beim Menschen nicht PKG-abhängig ist. (Li et al. 2003) zeigten, dass es nach Hemmung der PKG und Zugabe von cGMP-erhöhenden Substanzen sowohl zu einer Phosphorylierung an Serin²³⁹ als auch an Serin¹⁵⁷ kommt. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, lässt sich gut erklären, warum es nach Stimulation mit PGE₁ zu einer schnelleren VASP-Phosphorylierung als nach Stimulation mit SNP kommt, wenn man sich der These anschließt, dass die VASP-Phosphorylierung durch cGMP indirekt über die PKA vermittelt wird. Allerdings stellt sich die Frage, warum es nach Stimulation mit SNP

zuerst und vermehrt zu einer Phosphorylierung an Serin²³⁹ kommt und nach Stimulation mit PGE₁ die Präferenzen bei Serin¹⁵⁷ liegen, wenn doch beides direkt beziehungsweise indirekt über die PKA vermittelt sein soll? Möglich wäre, dass nur die PKA essentiell für die VASP-Phosphorylierung in intakten Zellen ist, die PKG hingegen normalerweise zur VASP-Phosphorylierung durch cGMP-erhöhende Substanzen beiträgt, aber im Notfall komplett von der PKA kompensiert werden kann.

Schwarz et al. zeigte 1999, dass die Durchflusszytometrie mit dem 16C2-Antikörper bei der Identifizierung und Quantifizierung von phosphoryliertem VASP eine dem Westernblot äquivalente Methode ist. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dann zeigt sich auch hier, dass sich beide Methoden gleich gut für die Identifikation und Quantifizierung von VASP eignen. Dies wurde unabhängig voneinander für den 5C6-Antikörper demonstriert und konnte für den 16C2-Antikörper bestätigt werden. Die Qualität der Ergebnisse ist bei beiden Antikörpern gleich gut. Der Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass sie im Gegensatz zum Westernblot nicht nur mit gewaschenen Thrombozyten, sondern auch mit Plättchenreichem Plasma oder sogar Vollblut durchgeführt werden kann. Allein der Versuchsablauf bringt im Vergleich zum Westernblot eine immense Zeitersparnis und benötigt deutlich weniger Probenmaterial. Die Ergebnisse zeigten, dass VASP in normalen unbehandelten Zellen nicht nur an der Position Serin²³⁹ (Smolenski et al. 1998), sondern auch an der Position Serin¹⁵⁷ keine erkennbare basale Phosphorylierung aufweist. Dies konnte in den Westernblot-Versuchen, aber besonders deutlich mit Hilfe der Immunfluoreszenz gezeigt werden.

Der neue 5C6-Antikörper eignet sich auch zum Einsatz in der Immunfluoreszenz. Man kann mit Hilfe fluoreszierender Zweitantikörper die Lage von phosphoryliertem VASP in den Zellen detektieren und durch die gleichzeitige Anfärbung von Bestandteilen des Zytoskeletts Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen von VASP mit anderen zellulären Proteinen ziehen.

Die Analyse von phosphoryliertem VASP hat sich als nützlich erwiesen bei NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren (Becker et al. 2000; Stasch et al. 2002), bei PDE5-Inhibitoren wie Dipyridamole (Aktas et al. 2003), und bei dem ADP-Rezeptor (P2Y_{AC})-Inhibitor Clopidogrel (Schwarz et al. 2001). In aktuellen Studien konzentriert man sich auf die FACS-Analyse von phosphoryliertem VASP in Vollblut, um das klinische Monitoring der antithrombotisch/antiaggregatorischen Kapazität des Endothels als Indikator des kardiovaskulären Krankheitsstatus und den Erfolg medikamentöser Therapie zu etablieren.

Studien mit glatten Gefäßmuskelzellen zeigen durch Stimulation mit Serum eine direkte Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ über die Proteinkinase C (PKC) (Chitaley et al. 2004). Die PKC wurde bisher mit Regulierungen im Zytoskelett und mit fokalen Kontakten assoziierten Aktionen in Zusammenhang gebracht (Woods and Couchman 1992; Haller et al. 1998; Keenan and Kelleher 1998; Ziegler et al. 2002). In zukünftigen Experimenten wäre es interessant zu untersuchen, ob auch in Thrombozyten eine direkte PKC-vermittelte VASP-Phosphorylierung stattfindet. Es stellt sich auch die Frage, ob es noch weitere Kinasen oder Substanzen gibt, die eine VASP-Phosphorylierung induzieren, die zum Beispiel an Threonin²⁷⁸ oder bisher unbekanntem Phosphorylierungsstellen stattfindet. Und wenn es sie gibt, welche Funktionen oder biochemische Bedeutungen gibt es noch zu entdecken?

Ein weiterer Aspekt der Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses von cGMP-analogen Substanzen (hier 8-pCPT-cGMP) auf die Proliferation und die Ausdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen der Maus hin zu Megakaryozyten. Thrombopoetin spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Megakaryopoese und der Bildung des Plättchenfaktors 4 (Caen et al. 1999). Sowohl bei in vitro als auch bei in vivo Experimenten wurde gezeigt, dass TPO einen ausreichenden Stimulus für eine vollständige Entwicklung der Megakaryozyten darstellt (Gurney et al. 1994; Kaushansky et al. 1994; Kaushansky 1995). Stammzellfaktor, Interleukin-3, Interleukin-6, Interleukin-11 und Basis Fibroblasten Wachstumsfaktor tragen zusätzlich zur Megakaryozytenbildung bei (Broudy et al. 1995; Ku et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Stammzellen in einer Kombination aus TPO, IL-6 und IL-11 kultiviert. Diese Kombination hatte sich bereits bei (Shiraga et al. 1999) bewährt, um die Entwicklung von hämatopoetischen Mausstammzellen zu Megakaryozyten und deren Proliferation positiv zu beeinflussen, was hier nur bestätigt werden kann. Zusätzlich wurde der Einfluss von 8-pCPT-cGMP in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen und von VASP knock out Mäusen untersucht. Über dessen Einfluss auf die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen lagen noch keine Ergebnisse vor. Abhängig vom Zelltyp war bekannt, dass cGMP wachstumsfördernde oder wachstumshemmende Effekte hat. In glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), Mesangiumzellen und diversen Fibroblasten wird die Proliferation durch cGMP gehemmt. Dieser Effekt scheint hauptsächlich PKG-

vermittelt zu sein, obwohl es auch unter gewissen Bedingungen zur Kreuzaktivierung der PKA kommt (Reviewed bei Pilz and Casteel 2003). Der antiproliferative Effekt korreliert mit der Hemmung von Wachstumsfaktor induzierter extrazellulär stimuli-responsiver Kinasen Aktivität (ERK), gesteigerter mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Phosphatase Aktivität (Hutchinson et al. 1997; Yu et al. 1997; Suhasini et al. 1998) und der Modulation zellzyklusassoziierter Gene und einer Minderung der ET-1 Synthese (Fujisaki et al. 1995; Mitsutomi et al. 1999). Im Gegensatz zu dem wachstumshemmenden Einfluss auf VSMC und Fibroblasten steigert cGMP das Wachstum bei Endothelzellen. Der proliferative Effekt in den Endothelzellen korreliert mit einer gesteigerten ERK1/2-Aktivität und steht vielleicht im Zusammenhang mit einer gesteigerten Produktion von Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels (Hood and Granger 1998; Parenti et al. 1998; Doi et al. 2001; Zhang et al. 2003). Wir kamen zu dem Ergebniss, dass sich bei hämatopoetischen Stammzellen in der Ausdifferenzierung zu Megakaryozyten ein konzentrationsabhängiger, dualer Effekt von 8-pCPT-cGMP zeigte. Konzentrationen von 25µM 8-pCPT-cGMP hemmen signifikant die Proliferation der Zellen. Dagegen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proliferation mit 50µM 8-pCPT-cGMP im Vergleich zur unstimulierten Stammzellpopulation. Entgegengesetzt verhielten sich die Zellen im Grad ihrer Ausdifferenzierung, die in diesem Fall prozentual mit dem Anteil der CD41-positiven Zellen bestimmt wurde. Die niedrigere Konzentration zeigte tendenziell mehr CD41-positive Zellen als die unstimulierte Zellpopulation. Bei 50µM 8-pCPT-cGMP zeigte sich eine signifikante Hemmung der Differenzierung.

Besonderes Augenmerk galt der Rolle von VASP beziehungsweise phosphoryliertem VASP in diesem Zusammenhang. Deshalb wurden auf gleiche Weise hämatopoetische Stammzellen von VASP knock out Mäusen untersucht. Diese Mäuse wurden von (Hauser et al. 1999) generiert. Diese waren fruchtbar und makroskopisch nicht von den Wildtypmäusen zu unterscheiden. Auch histologisch bestand der einzige Unterschied in einer milden Hyperplasie der Megakaryopoese im Knochenmark. Es zeigte sich eine verstärkte thrombininduzierte Aktivierung der Thrombozyten mit normalen GP IIb/IIIa - und erhöhten P-Selektin-Werten . Bei der Hyperplasie der Megakaryopoese scheint es sich hier um eine Kompensation des vermehrten Thrombozytenumsatzes zu handeln (Hauser et al. 1999). Auf die VASP knock out Zellen hatte 8-pCPT-cGMP einen signifikanten proliferationsfördernden Einfluss. Dagegen wurde die Ausdifferenzierung zu CD41-positiven Zellen signifikant gehemmt. Dies war bei höheren Konzentration

deutlicher der Fall als bei niedrigeren. Da (Hood and Granger 1998) beschrieben, dass in Thrombozyten ERK aktiviert wird, müssten sich die Megakaryozyten als deren Vorläufer ähnlich verhalten. Hierüber könnte man schließen, dass cGMP-Analoga genau wie bei den Endothelzellen zu einer Proliferationsförderung der Zellen führen. Warum allerdings niedrige Konzentrationen zu einer signifikanten Hemmung führen ist unklar. Da es diesen Unterschied nicht bei den knock out Zellen gibt, sondern sich dort eine signifikante Proliferationsförderung zeigt, lässt sich vermuten, dass VASP-abhängige Reaktionswege mit in die Proliferation und die Zelldifferenzierung eingreifen.

Bei Maus- und Mensch-Thrombozyten wurde ein Unterschied in Bezug auf die cGMP-Analoga induzierte VASP-Phosphorylierung berichtet. Beim Menschen kommt es auch nach Blockade der PKG zu einer VASP-Phosphorylierung an Serin²³⁹ über die PKA. Bei Mäusen zeigte sich dagegen eine PKG-abhängige Phosphorylierung an Serin²³⁵ (zu Serin²³⁹ analoge Stelle bei der Maus) (Li et al. 2003). Dies konnte auch anhand von PKG knock out Mäusen gezeigt werden, da es hier nicht möglich war, eine cGMP induzierte VASP-Phosphorylierung zu erreichen (Massberg et al. 1999).

Der Anstieg von intrazellulärem cGMP aktiviert die PKG (Haslam et al. 1999). Die PKG reguliert die Funktion mehrere intrazellulärer Moleküle und Reaktionswege unter anderem von VASP (Halbrügge et al. 1990) und ERK (Hood and Granger 1998; Li et al. 2001).

(Chen et al. 2004) veröffentlichten kürzlich Daten, die vermuten lassen, dass bei glatten Muskelzellen eine VASP-Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ einen proliferationsfördernden Effekt hat. Dagegen beschrieben sie einen NO-vermittelten hemmenden Effekt, wenn VASP an Serin²³⁹ phosphoryliert war. Es ist möglich, dass VASP in Megakaryozyten eine ähnliche Rolle übernimmt. Man könnte die These aufstellen, dass es über die PKG zu einer Aktivierung von ERK kommt, die die Proliferation der Zellen fördert. Gleichzeitig kommt es cGMP-vermittelt zu einer Phosphorylierung von VASP. Verhält sich VASP in Megakaryozyten wie in Thrombozyten, würde es über die PKG hauptsächlich zu einer Phosphorylierung an Serin²³⁵ kommen, bei höheren Konzentrationen käme es zusätzlich zu einer Phosphorylierung an Serin¹⁵⁷ entweder direkt über PKG oder durch Aktivierung der PKA durch die hohen cGMP-Konzentrationen. Dies würde den konzentrationsabhängigen dualen Effekt erklären.

Für zukünftige Experimente stehen noch viele Fragen über biochemische Zusammenhänge und Einflüsse auf die Zelldifferenzierung und Proliferation offen.

Eine interessante Frage ist zum Beispiel, ob die Ploidie der VASP knock out Megakaryozyten nach Stimulation mit 8-pCPT-cGMP höher ist als in den unstimulierten beziehungsweise den Megakaryozyten der Wildtypmäuse. (Rojnuckarin et al. 1999) zeigten den Einfluss von MAP-Kinasen und ERK1 und ERK2 auf die Poliploidisierung der Megakaryozyten. Auch wenn man in diesem Zusammenhang zusätzlich die Ergebnisse von (Li et al. 2003) betrachtet. Er beschreibt, dass cGMP einen biphasische Thrombozytenantwort induziert, die aus einem frühen vorübergehenden stimulatorischen Effekt besteht, der die Thrombozytenaggregation fördert und einem verzögerten hemmenden Effekt, der ein übermäßiges Thrombuswachstum verhindert. cGMP induziert intrazellulär die Aktivierung von ERK und des MAPK-Reaktionswegs und die Phosphorylierung von ERKs (Hood and Granger 1998; Komalavilas et al. 1999; Li et al. 2001). (Li et al. 2003) zeigte, dass diese Phosphorylierung PKG-abhängig ist.

Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Reaktionsweg auch schon in den Megakaryozyten aktiv ist, ist sehr hoch. Dies würde nun über die PKG zu einer zusätzlichen Aktivierung der MAP-Kinasen führen. Bei den VASP knock out Mäusen wäre dieser Weg aktiv, aber eine eventuelle Gegenregulation über VASP nicht möglich. Deswegen müssten VASP knock out Megakaryozyten unter dem Einfluss von cGMP erhöhenden Substanzen einen höheren Ploiditätsgrad aufweisen.

Zukünftige Visionen sind, Megakaryozyten in solchem Umfang in vitro zu züchten, dass man sie Patienten mit Thrombozytopenie oder Dysfunktionen der eigenen Thrombozyten in größeren Mengen infundieren kann, oder dass man direkt in vivo auf die Megakaryopoese einwirken kann.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit wurden in mehreren Teilprojekten die Eigenschaften und Funktionen des Vasodilatator stimulierenden Phosphoproteins (VASP) untersucht.

Es wurde ein neuer Antikörper (5C6) charakterisiert, der für an Serin¹⁵⁷ phosphoryliertes VASP spezifisch sein sollte. Es konnte gezeigt werden, dass der 5C6 Antikörper spezifisch VASP erkennt, welches an der Stelle Serin¹⁵⁷ phosphoryliert ist. Auch konnten mit dem neuen Antikörper Ergebnisse bestätigt werden, die vorher mit anderen Methoden erhoben wurden, nämlich, dass Serin¹⁵⁷ sowohl cAMP- als auch cGMP-vermittelt phosphoryliert wird. Der Antikörper 5C6 stellte sich als ein guter Marker für die Phosphorylierung von VASP an Serin¹⁵⁷ durch die PKA dar und ermöglichte, die Zeitkinetik der VASP-Phosphorylierung zu beschreiben.

In einem weiteren Projekt wurde die Rolle des Proteins VASP bei der Proliferation und Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen zu Megakaryozyten und Thrombozyten untersucht. Die Stammzellen wurden zusätzlich zu Wachstumsfaktoren mit unterschiedlichen Dosen eines cGMP-Analogons stimuliert. Es zeigte sich hierbei, dass 8-pCPT-cGMP einen dualen, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferation und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von Wildtypmäusen hat. Niedrige Dosen hemmten die Proliferation und förderten die Differenzierung, dagegen hatten höhere Konzentrationen einen proliferationsfördernden und differenzierungshemmenden Effekt auf die Stammzellen. Im Vergleich hierzu ergab eine Stimulation mit 8-pCPT-cGMP bei VASP knock out Mäusen immer einen proliferationsfördernden Effekt, hingegen einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen. Bei den knock out Zellen führten höhere Konzentrationen lediglich zu einer stärkeren Reaktion als niedrige.

8 Literaturverzeichnis

- Abel, K., G. Mieskes, et al. (1995). "Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets." FEBS Lett **370**(3): 184-8.
- Akira, S., T. Taga, et al. (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol **54**: 1-78.
- Aktas, B., A. Utz, et al. (2003). "Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies." Stroke **34**(3): 764-9.
- Anguita, J., S. W. Barthold, et al. (1999). "Selective anti-inflammatory action of interleukin-11 in murine Lyme disease: arthritis decreases while carditis persists." J Infect Dis **179**(3): 734-7.
- Becker, E. M., P. Schmidt, et al. (2000). "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets." J Cardiovasc Pharmacol **35**(3): 390-7.
- Becker, R. P. and P. P. De Bruyn (1976). "The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation." Am J Anat **145**(2): 183-205.
- Beckerle, M. C. (1998). "Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*." Cell **95**(6): 741-8.
- Behnke, O. and A. Forer (1998). "From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream." Eur J Haematol Suppl **61**: 3-23.
- Broudy, V. C., N. L. Lin, et al. (1995). "Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro." Blood **85**(7): 1719-26.
- Butt, E., K. Abel, et al. (1994). "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 **269**(20): 14509-17.
- Caen, J. P., Z. C. Han, et al. (1999). "Regulation of megakaryocytopoiesis." Haemostasis **29**(1): 27-40.
- Carver-Moore, K., H. E. Broxmeyer, et al. (1996). "Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice." Blood **88**(3): 803-8.

- Chen, L., G. Daum, et al. (2004). "Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Regulates Proliferation and Growth Inhibition by Nitric Oxide in Vascular Smooth Muscle Cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol.
- Chitaley, K., L. Chen, et al. (2004). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C." FEBS Lett **556**(1-3): 211-5.
- Cramer, E. M., F. Norol, et al. (1997). "Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand." Blood **89**(7): 2336-46.
- Daniel, J. L., C. Dangelmaier, et al. (1999). "Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation." Thromb Haemost **82**(4): 1322-6.
- de Sauvage, F. J., K. Carver-Moore, et al. (1996). "Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin." J Exp Med **183**(2): 651-6.
- Debili, N., L. Coulombel, et al. (1996). "Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow." Blood **88**(4): 1284-96.
- Demetri, G. D. (2000). "Pharmacologic treatment options in patients with thrombocytopenia." Semin Hematol **37**(2 Suppl 4): 11-8.
- Denis, C. V., K. Kwack, et al. (2001). "Interleukin 11 significantly increases plasma von Willebrand factor and factor VIII in wild type and von Willebrand disease mouse models." Blood **97**(2): 465-72.
- D'Hondt, V., Y. Humblet, et al. (1995). "Thrombopoietic effects and toxicity of interleukin-6 in patients with ovarian cancer before and after chemotherapy: a multicentric placebo-controlled, randomized phase Ib study." Blood **85**(9): 2347-53.
- Diener, H. C., L. Cunha, et al. (1996). "European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke." J Neurol Sci **143**(1-2): 1-13.
- Doi, K., T. Ikeda, et al. (2001). "C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(6): 930-6.
- Dramsi, S. and P. Cossart (1998). "Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 137-66.
- Eigenthaler, M., C. Nolte, et al. (1992). "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 **205**(2): 471-81.
- Fielder, P. J., A. L. Gurney, et al. (1996). "Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets." Blood **87**(6): 2154-61.
- Fujisaki, H., H. Ito, et al. (1995). "Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression." J Clin Invest **96**(2): 1059-65.
- Gainsford, T., H. Nandurkar, et al. (2000). "The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor." Blood **95**(2): 528-34.
- Gawaz, M. (1999). Das Blutplättchen. Stuttgart, Thieme.
- Geiger, J., J. Brich, et al. (1999). "Specific impairment of human platelet P2Y₁(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(8): 2007-11.
- Geiger, J., P. Honig-Liedl, et al. (1998). "Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors." Eur J Pharmacol **351**(2): 235-46.
- Geitler, L. (1953). "Endomitose und endomitotische Polyploidisierung." Protoplasmatologica **6**: 1-89.
- Gertler, F. B., A. R. Comer, et al. (1995). "Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties." Genes Dev **9**(5): 521-33.
- Gertler, F. B., K. Niebuhr, et al. (1996). "Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics." Cell **87**(2): 227-39.
- Gonda, T. J., E. M. Macmillan, et al. (1993). "Differentiation state and responses to hematopoietic growth factors of murine myeloid cells transformed by myb." Blood **82**(9): 2813-22.
- Gordon, M. S., W. J. McCaskill-Stevens, et al. (1996). "A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy." Blood **87**(9): 3615-24.

- Gordon, M. S., J. Nemunaitis, et al. (1995). "A phase I trial of recombinant human interleukin-6 in patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia." Blood **85**(11): 3066-76.
- Gurney, A. L., K. Carver-Moore, et al. (1994). "Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice." Science **265**(5177): 1445-7.
- Haffner, C., T. Jarchau, et al. (1995). "Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP." Embo J **14**(1): 19-27.
- Halbrügge, M., C. Friedrich, et al. (1990). "Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators." J Biol Chem **265**(6): 3088-93.
- Halbrügge, M. and U. Walter (1989). "Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets." Eur J Biochem **185**(1): 41-50.
- Haller, H., C. Lindschau, et al. (1998). "Integrin-induced protein kinase Calpha and Cepsilon translocation to focal adhesions mediates vascular smooth muscle cell spreading." Circ Res **82**(2): 157-65.
- Hansen, M. and N. T. Pedersen (1978). "Circulating megakaryocytes in blood from the antecubital vein in healthy, adult humans." Scand J Haematol **20**(4): 371-6.
- Haslam, R. J., N. T. Dickinson, et al. (1999). "Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets." Thromb Haemost **82**(2): 412-23.
- Hauser, W., K. P. Knobloch, et al. (1999). "Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8120-5.
- Hofmann, W. K., U. Kalina, et al. (2000). "Defective megakaryocytic development in myelodysplastic syndromes." Leuk Lymphoma **38**(1-2): 13-9.
- Hollen, C. W., J. Henthorn, et al. (1991). "Elevated serum interleukin-6 levels in patients with reactive thrombocytosis." Br J Haematol **79**(2): 286-90.
- Hollen, C. W., J. Henthorn, et al. (1992). "Serum interleukin-6 levels in patients with thrombocytosis." Leuk Lymphoma **8**(3): 235-41.
- Hood, J. and H. J. Granger (1998). "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells." J Biol Chem **273**(36): 23504-8.

- Horstrup, K., B. Jablonka, et al. (1994). "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition." Eur J Biochem **225**(1): 21-7.
- Hutchinson, H. G., P. T. Trindade, et al. (1997). "Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res **35**(1): 158-67.
- Ignarro, L. J. (1989). "Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins." Semin Hematol **26**(1): 63-76.
- Ihle, J. N. (1995). "Cytokine receptor signalling." Nature **377**(6550): 591-4.
- Italiano, J. E., Jr., P. Lecine, et al. (1999). "Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes." J Cell Biol **147**(6): 1299-312.
- Jackson C, A. J., Pestina T, Stenberg P. (1997). Thrombopoiesis and thrombopoietins: molecular, cellular, preclinical, and clinical biology.
- Jacobsson, S., J. Carneskog, et al. (1996). "Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy in chronic myeloproliferative disorders and reactive thrombocytosis." Eur J Haematol **56**(5): 287-92.
- Jin, J. and S. P. Kunapuli (1998). "Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8070-4.
- Jordan, M., I. G. Otterness, et al. (1995). "Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist." J Immunol **154**(8): 4081-90.
- Kaser, A., G. Brandacher, et al. (2001). "Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis." Blood **98**(9): 2720-5.
- Kaufman, R. M., R. Airo, et al. (1965). "Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung." Blood **26**(6): 720-31.
- Kaushansky, K. (1995). "Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production." Blood **86**(2): 419-31.
- Kaushansky, K. (2003). "Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis." J Thromb Haemost **1**(7): 1587-92.

- Kaushansky, K., S. Lok, et al. (1994). "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin." Nature **369**(6481): 568-71.
- Keenan, C. and D. Kelleher (1998). "Protein kinase C and the cytoskeleton." Cell Signal **10**(4): 225-32.
- Keilbach, A., P. Ruth, et al. (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem **208**(2): 467-73.
- Kelemen, E., I. Cserhati, et al. (1958). "Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera." Acta Haematol **20**(6): 350-5.
- Kobayashi, Y., M. Ozawa, et al. (1993). "Megakaryocytic ploidy in myelodysplastic syndromes." Leuk Lymphoma **9**(1-2): 55-61.
- Koike, Y., A. Yoneyama, et al. (1998). "Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations." Thromb Haemost **79**(6): 1106-10.
- Komalavilas, P., P. K. Shah, et al. (1999). "Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **274**(48): 34301-9.
- Kondo, M. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell: 661-72.
- Kopf, M., H. Baumann, et al. (1994). "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice." Nature **368**(6469): 339-42.
- Krantz, S. B. (1991). "Erythropoietin." Blood **77**(3): 419-34.
- Ku, H., Y. Yonemura, et al. (1996). "Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice." Blood **87**(11): 4544-51.
- Kuter, D. J. and R. D. Rosenberg (1995). "The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit." Blood **85**(10): 2720-30.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.

- Lazarus, H. M., E. F. Winton, et al. (1995). "Phase I multicenter trial of interleukin 6 therapy after autologous bone marrow transplantation in advanced breast cancer." Bone Marrow Transplant **15**(6): 935-42.
- Leng, S. X. and J. A. Elias (1997). "Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production." J Immunol **159**(5): 2161-8.
- Levine, R. F., A. Eldor, et al. (1993). "Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs." Eur J Haematol **51**(4): 233-46.
- Li, Z., J. Ajdic, et al. (2003). "A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans." Blood **101**(11): 4423-9.
- Li, Z., X. Xi, et al. (2001). "A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3." J Biol Chem **276**(45): 42226-32.
- Li, Z., X. Xi, et al. (2003). "A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation." Cell **112**(1): 77-86.
- Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, et al. (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." Trends Biochem Sci **22**(8): 307-12.
- Massberg, S., S. Gruner, et al. (2004). "Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice." Blood **103**(1): 136-42.
- Massberg, S., M. Sausbier, et al. (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." J Exp Med **189**(8): 1255-64.
- Mattia, G., F. Vulcano, et al. (2002). "Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release." Blood **99**(3): 888-97.
- McCarty, J. M., K. H. Sprugel, et al. (1995). "Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count." Blood **86**(10): 3668-75.
- Melamed, M. R., E. E. Clifton, et al. (1966). "The megakaryocyte blood count." Am J Med Sci **252**(3): 301-9.
- Mitsutomi, N., C. Akashi, et al. (1999). "Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells." Eur J Pharmacol **364**(1): 65-73.

- Nagata, Y., Y. Muro, et al. (1997). "Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis." J Cell Biol **139**(2): 449-57.
- Nicholson, C. D., R. A. Challiss, et al. (1991). "Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes." Trends Pharmacol Sci **12**(1): 19-27.
- Niebuhr, K., F. Ebel, et al. (1997). "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 **16**(17): 5433-44.
- Nolte, C., M. Eigenthaler, et al. (1994). "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 **48**(8): 1569-75.
- Odell, T. T., J. R. Murphy, et al. (1976). "Stimulation of megakaryocytopoiesis by acute thrombocytopenia in rats." Blood **48**(5): 765-75.
- Offermanns, S. (2000). "The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation." Biol Chem **381**(5-6): 389-96.
- Papayannopoulou, T., M. Brice, et al. (1996). "Insights into the cellular mechanisms of erythropoietin-thrombopoietin synergy." Exp Hematol **24**(5): 660-9.
- Parenti, A., L. Morbidelli, et al. (1998). "Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium." J Biol Chem **273**(7): 4220-6.
- Pfeifer, A., P. Ruth, et al. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-49.
- Phillips, D. R., I. F. Charo, et al. (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." Blood **71**(4): 831-43.
- Pilz, R. B. and D. E. Casteel (2003). "Regulation of gene expression by cyclic GMP." Circ Res **93**(11): 1034-46.
- Rabellino, E. M., R. B. Levene, et al. (1984). "Human megakaryocytes. III. Characterization in myeloproliferative disorders." Blood **63**(3): 615-22.
- Ravid, K., J. Lu, et al. (2002). "Roads to polyploidy: the megakaryocyte example." J Cell Physiol **190**(1): 7-20.

- Redlich, C. A., X. Gao, et al. (1996). "IL-11 enhances survival and decreases TNF production after radiation-induced thoracic injury." J Immunol **157**(4): 1705-10.
- Reinhard, M., M. Halbrugge, et al. (1992). "The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts." Embo J **11**(6): 2063-70.
- Reinhard, M., K. Jouvenal, et al. (1995). "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 U S A **92**(17): 7956-60.
- Robbins (1999). Origin and Differentiation of Hematopoietic Cells. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- Rojnuckarin, P., J. G. Drachman, et al. (1999). "Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis." Blood **94**(4): 1273-82.
- Rubin, C. I., D. L. French, et al. (2003). "Stathmin expression and megakaryocyte differentiation: a potential role in polyploidy." Exp Hematol **31**(5): 389-97.
- Ruggeri, Z. M. (2003). "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions." J Thromb Haemost **1**(7): 1335-42.
- Sands, B. E., S. Bank, et al. (1999). "Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease." Gastroenterology **117**(1): 58-64.
- Schoffski, P., F. Tacke, et al. (2002). "Thrombopoietin serum levels are elevated in patients with hepatitis B/C infection compared to other causes of chronic liver disease." Liver **22**(2): 114-20.
- Schrezenmeier, H., J. C. Marsh, et al. (1995). "A phase I/II trial of recombinant human interleukin-6 in patients with aplastic anaemia." Br J Haematol **90**(2): 283-92.
- Schwarz, U. R., J. Geiger, et al. (1999). "Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects." Thromb Haemost **82**(3): 1145-52.
- Schwarz, U. R., U. Walter, et al. (2001). "Taming platelets with cyclic nucleotides." Biochem Pharmacol **62**(9): 1153-61.

- Shiraga, M., A. Ritchie, et al. (1999). "Primary megakaryocytes reveal a role for transcription factor NF-E2 in integrin alpha IIb beta 3 signaling." J Cell Biol **147**(7): 1419-30.
- Sieff, C. (1998). The anatomy and physiology of hematopoiesis.
- Smolenski, A., C. Bachmann, et al. (1998). "Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody." J Biol Chem **273**(32): 20029-35.
- Stasch, J. P., K. Dembowski, et al. (2002). "Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies." Br J Pharmacol **135**(2): 344-55.
- Stefanich, E., T. Senn, et al. (1997). "Metabolism of thrombopoietin (TPO) in vivo: determination of the binding dynamics for TPO in mice." Blood **89**(11): 4063-70.
- Stenberg, P. E. and J. Levin (1989). "Mechanisms of platelet production." Blood Cells **15**(1): 23-47.
- Sahasini, M., H. Li, et al. (1998). "Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway." Mol Cell Biol **18**(12): 6983-94.
- Tacke, F., C. Trautwein, et al. (2002). "Quantification of hepatic thrombopoietin mRNA transcripts in patients with chronic liver diseases shows maintained gene expression in different etiologies of liver cirrhosis." Liver **22**(3): 205-12.
- Taylor, C. E. and G. V. Heimer (1974). "Measuring immunofluorescence emission in terms of standard international physical units." J Biol Stand **2**(1): 11-20.
- Teramura, M., S. Kobayashi, et al. (1996). "Effect of interleukin 11 on normal and pathological thrombopoiesis." Cancer Chemother Pharmacol **38 Suppl**: S99-102.
- Thiery, J. P. and M. Bessis (1956). "[Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells]." C R Hebd Seances Acad Sci **242**(2): 290-2.
- Tilg, H., E. Trehu, et al. (1994). "Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55." Blood **83**(1): 113-8.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

- Trepicchio, W. L., M. Bozza, et al. (1996). "Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production." J Immunol **157**(8): 3627-34.
- Trepicchio, W. L., M. Ozawa, et al. (1999). "Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions." J Clin Invest **104**(11): 1527-37.
- Trepicchio, W. L., L. Wang, et al. (1997). "IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB." J Immunol **159**(11): 5661-70.
- Trowbridge, E. A., J. F. Martin, et al. (1984). "The origin of platelet count and volume." Clin Phys Physiol Meas **5**(3): 145-70.
- van Gameren, M. M., P. H. Willemse, et al. (1994). "Effects of recombinant human interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study." Blood **84**(5): 1434-41.
- Veldhuis, G. J., P. H. Willemse, et al. (1995). "Toxicity and efficacy of escalating dosages of recombinant human interleukin-6 after chemotherapy in patients with breast cancer or non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **13**(10): 2585-93.
- Vigon, I., J. P. Mornon, et al. (1992). "Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5640-4.
- Vitrat, N., K. Cohen-Solal, et al. (1998). "Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis." Blood **91**(10): 3711-23.
- Waldmann, R., S. Bauer, et al. (1986). "Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets." Eur J Biochem **158**(1): 203-10.
- Waldmann, R., M. Nieberding, et al. (1987). "Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases." Eur J Biochem **167**(3): 441-8.
- Wall, M. E., S. H. Francis, et al. (2003). "Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2380-5.
- Walmsley, M., D. M. Butler, et al. (1998). "An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis." Immunology **95**(1): 31-7.

- Weber, J., J. C. Yang, et al. (1993). "Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies." J Clin Oncol **11**(3): 499-506.
- Woods, A. and J. R. Couchman (1992). "Protein kinase C involvement in focal adhesion formation." J Cell Sci **101 (Pt 2)**: 277-90.
- Yu, S. M., L. M. Hung, et al. (1997). "cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway." Circulation **95**(5): 1269-77.
- Zhang, R., L. Wang, et al. (2003). "Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat." Circ Res **92**(3): 308-13.
- Ziegler, W. H., U. Tigges, et al. (2002). "A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C." J Biol Chem **277**(9): 7396-404.
- Zimmer, M., T. Fink, et al. (1996). "Cloning of the VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) genes in human and mouse: structure, sequence, and chromosomal localization." Genomics **36**(2): 227-33.
- Zimmet, J. and K. Ravid (2000). "Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system." Exp Hematol **28**(1): 3-16.

Die Arbeit widme ich meinen Eltern, als Dank für ihre
Unterstützung und Liebe.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Martin Eigenthaler, Anna
Kobsar, Brigitta Schinke und Prof. Walter für die gute und
freundliche Betreuung bedanken.

Danken möchte ich insbesondere auch der Marianne und Dr. Fritz
Walter Fischer Stiftung, die mich mit einem zweijährigen
Promotionsstipendium finanziell großzügig unterstützt und es mir
ermöglicht hat, mich voll auf meine Arbeit zu konzentrieren.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Katharina Krohne
Wohnort: Wollmatingerstr. 28
78467 Konstanz
Tel: 0179-7932367
e-mail: krohne@gmx.net
Geburtstag und -ort: 15.11.1977 in Heidelberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule (Mönchhofschule in Heidelberg)
1988 – 1991 Gymnasium (Bunsengymnasium in Heidelberg)
1991 – 1997 Gymnasium (Sieboldgymnasium in Würzburg)
Mai 1997 Abitur

Berufsausbildung:

Nov. 1997-Sept. 1999 Vorklinisches Studium / Universität Würzburg
Sept. 1999-Juni 2004 Klinisches Studium / Universität Würzburg
Aug. 2000 1. Staatsexamen
April 2003 2. Staatsexamen
PJ: April 2003- März 2004 1. Tertian in der Chirurgie im Universitätsklinikum von Santiago de Compostela / Spanien
2. Tertian in der Inneren Medizin in der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg (Gastroenterologie/Intensiv)
3. Tertian in der Neurochirurgie der Universität Würzburg
Mai 2004 3. Staatsexamen
1.10.2004 Erlangung der Vollapprobation
Seit Aug. 2004 ÄiP/Assistentin im Zentrum für Innere Medizin des Klinikums Konstanz

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Famulaturen:

April 2000 Neurologie Hospital Sant Pau / Barcelona / Spanien
März 2001 kardiologisch-internistische Praxis Dr. Stefan Heise / Würzburg
März 2002 Neurologie Universitätsklinik Würzburg
Aug. 2002 Klinische Biochemie

Seit Okt. 2000 Doktorarbeit im Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ulrich Walter

Aug. 2001- Aug. 2003 Erhalt eines Promotionsstipendiums der Marianne und Dr. Fritz-Walter-Fischer-Stiftung

Aug. 2001- Okt. 2001 Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. Renate Pilz in San Diego / Kalifornien / USA

Konstanz, den 16.01.2005

