

Aus dem Institut für
Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

STROMABWÄRTS DER cGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASE IN THROMBOZYTEN –

Physiologische und diagnostische Relevanz von VASP
und Identifikation neuer Substrate

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

vorgelegt von
Lino Lars Teichmann
aus Köln

Würzburg, Februar 2007

Referent: Prof. Dr. U. Walter

Koreferent: Prof. Dr. R. Schinzel

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2008

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	– 1
A.1	Hämostase	– 1
A.2	Thrombozyten	– 2
A.3	Zielsetzung der Dissertation	– 12
B	Material & Methoden	– 15
B.1	Material	– 17
B.2	Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion	– 27
B.3	Methoden zur Evaluation muriner Thrombozytenfunktion	– 37
B.4	Molekularbiologische Methoden	– 41
B.5	Proteinbiochemische Methoden	– 47
B.6	Zellkultur	– 56
C	Resultate	– 59
C.1	Monitoring von Clopidogrel	– 60
C.2	Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel	– 66
C.3	CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten	– 68
C.4	Charakterisierung von VASP ^{-/-} Mäusen	– 76
D	Diskussion	– 83
D.1	Monitoring von Clopidogrel	– 84
D.2	Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel	– 88
D.3	CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten	– 89
D.4	Charakterisierung von VASP ^{-/-} Mäusen	– 93
E	Zusammenfassung	– 99

INHALTSVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis – 101

Danksagung –

Lebenslauf –

Abbildungsverzeichnis

- A.1 Signalwege der Thrombozyten-Aktivierung – 4
- A.2 Signalwege der Thrombozyten-Inhibition – 11

- C.1 Clopidogrel-Inhibition ADP-induzierter Plättchenaggregation – 62
- C.2 Aggregation, CD62P-Expression, PFA-100 Okklusionszeit und VASP-Phosphorylierung – 63
- C.3 Korrelation individueller PRI(EIA)- u. PRI(FACS)-Werte – 64
- C.4 Korrelation individueller PRI(FACS)- u. Aggregations-Werte – 64
- C.5 Clopidogrel-Inhibition ADP-induzierter Plättchen-Aktivierung (VASP-FACS, VASP -EIA) – 65
- C.6 Effekt von Aspirin auf ADP-ind. Aggregation und PRI(EIA) – 66
- C.7 Clopidogrel-Inhibition Trap6- und AY-NH₂-induzierter Plättchenaggregation – 67
- C.8 Clopidogrel-Inhibition der Serotonin-Sekretion induziert durch Trap6, AY-NH₂, U46619 – 69
- C.9 2D-Phosphoproteom eines Plättchenlysats – 70
- C.10 pCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor – 71
- C.11 pEGFP-C1 Expressionsvektor – 72
- C.12 Ko-Transfektion von EGFP-CAP1 Varianten und cGK1 β – 74
- C.13 Immunpräzipitation von EGFP-CAP1 – 74
- C.14 Keine Phosphorylierung von CAP1 in PtK₂-Zellen – 75
- C.15 Basalexpression von Membranproteinen auf Thrombozyten in WT u. VASP -/- Mäusen – 77
- C.16 GPIIb/IIIa-Aktivierung bei VASP -/- u. WT Mäusen – 78
- C.17 p-Selektin Expression bei VASP -/- u. WT Mäusen – 79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- C.18 Serotonin Sekretion bei VASP $-/-$ u. WT Mäusen – 80
- C.19 Thrombusformation bei VASP $-/-$ u. WT Mäusen (Mikrophotographien) – 81
- C.20 Beeinträchtigte SNP-induzierte Inhibition der Thrombusformation bei VASP $-/-$ Mäusen in der Flusskammer – 82

Tabellenverzeichnis

A.1	Aktivierende G-Protein gekoppelte Rezeptoren	–	3
A.2	Substrate der cAK und cGK in Plättchen	–	10
B.1	Klonierprimer	–	19
B.2	Mutageneseprimer	–	19
B.3	Sequenzierprimer	–	20
B.4	Plasmide	–	20
B.5	Antikörper I	–	21
B.6	Antikörper II, anti-murin	–	22
C.1	Demographische Daten der Probanden	–	61
C.2	CAP1 Plasmidkonstrukte	–	73
D.1	CAP Homologe	–	90

Kapitel A

Einleitung

A.1 Hämostase – 1

A.1.1 Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase – 1

A.2 Thrombozyten – 2

A.2.1 Aktivierung von Thrombozyten – 2

A.2.2 Inhibition von Thrombozyten – 8

A.3 Zielsetzung der Dissertation – 12

A.3.1 Monitoring und Wirkungsweise von Clopidogrel – 12

A.3.2 Identifikation und Charakterisierung von cGK Substraten in Thrombozyten – 13

A.1 **Hämostase**

A.1.1 **Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase**

Das Blut zirkuliert in einem geschlossenen System, ohne dass es zum Sistieren des Blutflusses oder zum Blutaustritt kommt. Physiologisch führt eine Verletzung der Gefäßwand im Rahmen eines Traumas zur lokalen Bildung eines Thrombus, welcher die Gefäßwandverletzung abdichtet ohne den Blutfluss und damit die Versorgung abhängiger Gewebe zu beeinträchtigen. Pathophysiologisch führen degenerative und entzündliche Veränderungen (Vaskulitiden) der Gefäßwand oder deren Kombination (Atherosklerose) ebenfalls zu

A. Einleitung

einer Störung ihrer Integrität und folglich zur Thrombusbildung. Hierbei kann es zum vollständigen Sistieren des Blutflusses und zur Ischämie kommen. Allgemein wird die Bildung eines Gefäßwandthrombus als **Hämostase** (Blutstillung) bezeichnet.

Nach ihrem zeitlichen Ablauf wird eine primäre von einer sekundären Hämostase unterschieden. Eine zentrale Bedeutung im Vorgang der Hämostase kommt den **Thrombozyten** (Blutplättchen) zu. Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürung von Megakaryozyten. Mit 4 μm Durchmesser handelt es sich um die kleinsten Zellen des Blutkreislaufes. Sie sind charakterisiert durch diskoidale Form und das Fehlen eines Zellkerns. Ihre durchschnittliche Konzentration im Blut eines Erwachsenen beträgt 140.000 bis 345.000 pro μl . Ihre Lebenszeit beträgt 7 bis 10 Tage. Die primäre Hämostase umfasst die Adhäsion von Thrombozyten im Bereich der Gefäßwandläsion und die sich anschließende Interaktion mit weiteren Blutplättchen (Aggregation). Sie resultiert in der Bildung eines primär hämostatischen Thrombus. Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade und der proteolytischen Spaltung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) kommt es zur Bildung von Fibrinfibrillen, die zu einer Verfestigung des Thrombus führen, der nun sekundär hämostatischer Thrombus genannt wird.

Intaktes Endothel produziert lokal wirkende Thrombozyteninhibitoren – die bekanntesten sind NO und Prostacyclin (PGI_2) – die eine Adhäsion von Thrombozyten und in Folge die Thrombusbildung verhindern.

A.2 Thrombozyten

A.2.1 Aktivierung von Thrombozyten

Die Aktivierung von Blutplättchen umfasst sowohl die Stimulation aktivierender als auch die Hemmung inhibierender Signalwege. Diese Vorgänge resultieren in der Reorganisation des Zytoskeletts, die zur Änderung der Morphologie (**shape change**) führt, der **Sekretion** intrazellulärer Granula (α -, δ -Granula, Lysosomen) und der **Aktivierung von Oberflächenrezeptoren**, insbesondere des Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa, Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, CD41-CD61). Der aktivierte Fibrinogenrezeptor vermittelt die Quervernetzung von Plättchen über Fibrinogen-Brücken, die als Aggregation bezeichnet wird und zentrale Voraussetzung der Thrombusbildung ist.

Plättchen können durch die Bindung von Proteinen der subendothelialen Matrix (z.B.

Stimulus	Rezeptor	G-Proteine
Thrombin	PAR-1/4	$G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$
	PAR-3	$(G\alpha_q, G\alpha_{12/13})$
Thromboxan A2	TP	$G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$
ADP	P2Y ₁	$G\alpha_q$
	P2Y ₁₂	$G\alpha_i$
Epinephrin	α_{2A}	$G\alpha_z$
Serotonin	5-HT _{2A}	$G\alpha_q$

Tabelle A.1 Aktivierende G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten

Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF) oder löslicher Agonisten (z.B. Thrombin, Thromboxan A2 (TxA2), ADP) aktiviert werden. Diese Proteine zirkulieren im Blut, wobei sie auf zwei Quellen zurückgeführt werden: Sekretion durch bereits aktivierte Thrombozyten (autokrin, parakrin) und Freisetzung aus beschädigten Endothelzellen. Etliche dieser Agonisten interagieren mit heptahelikalen Rezeptoren, die an heterotrimere GTP-bindende Proteine (**G-Proteine**) gekoppelt sind^{67,108} (▷ **Tab. A.1**). G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit und einem $\beta\gamma$ -Heterodimer. Basierend auf strukturellen und funktionellen Homologien werden die $G\alpha$ -Untereinheiten in die Familien $G\alpha_s, G\alpha_i, G\alpha_{q/11}, G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_z$ ¹³⁰ aufgeteilt. $G\alpha_q, G\alpha_{i2}, G\alpha_z$ und $G\alpha_{13}$ sind in der Plättchenaktivierung, $G\alpha_s$ in der Plättchenhemmung involviert.

$G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase C β (PLC β), die durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) den Inositol-1,4,5-trisphosphat- (IP3) und Diacylglycerin-Spiegel (DAG) anhebt. IP3 erhöht die Kalzium-Konzentration durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Neben der Regulation anderer Ca²⁺-abhängiger Enzyme führt die Bindung von Ca²⁺ an Calmodulin zur Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase (MLCK), die die leichte Kette des Myosins phosphoryliert und eine Reorganisation des Zytoskeletts induziert. Die Dephosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC) wird infolge der Aktivierung von $G\alpha_{13}$ über den Rho/Rho-Kinase Signalweg und der hieraus resultierenden Inhibierung der Myosinphosphatase gehemmt^{53,88}. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über die Phosphorylierung der Substrate Pleckstrin und *myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (MARCKS) zur Sekretion von intrazellulären Granula beiträgt. Das $G\alpha_i$ -Protein hemmt die Adenylatzyklase (AC) und reduziert

A. Einleitung

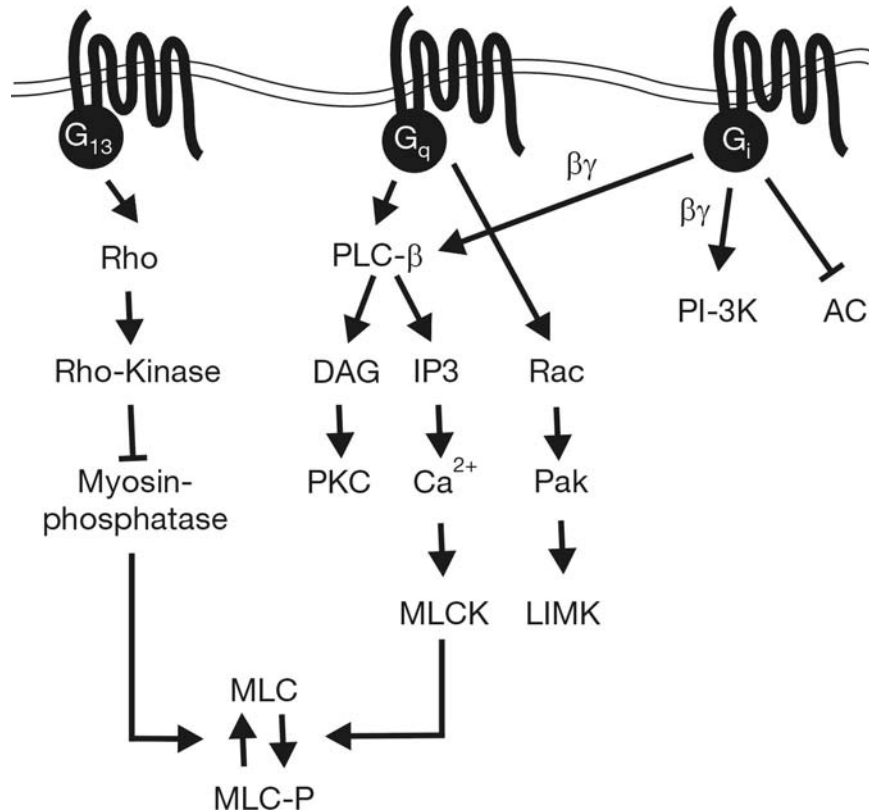


Abbildung A.1 Signalwege der Thrombozyten-Aktivierung. Nach Offermanns et al.¹¹⁴ wird zur effektiven Plättchenaggregation die Aktivierung von G_{α_q}, G_{α₁₃} und G_{α_i} benötigt. In Abwesenheit einer der drei Signalwege kommt es immer noch zur Aggregation, allerdings mit niedrigerer Effektivität. Eine Übersicht darüber, welche Agonisten die verschiedenen G-Proteine aktivieren, gibt > **Tab. A.1, S. 3**. Weitere Informationen sind im Text enthalten.

den intrazellulären cAMP-Spiegel. Die βγ-Untereinheit der G-Proteine aktiviert sowohl die PLC als auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) und ist an der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors beteiligt^{31, 154} (> **Abb. A.1**).

► Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Clopidogrel

Clopidogrel ist ein Thrombozytenaggregationshemmer aus der Klasse der Thienopyridine. Es ist eine racemische Verbindung, bei der das S-Isomer das pharmakologisch aktive Stereoisomer ist. Es handelt sich um ein Pro-Pharmakon, das zunächst in der Leber verstoffwechselt werden muss¹²⁶, was wahrscheinlich über das Cytochrom P-450-1A erfolgt¹²⁵. Der aktive Metabolit hemmt irreversibel den *P2Y₁₂ ADP-Rezeptor*^{45, 71}.

Clopidogrel hat sich als potentes Medikament zur Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse erwiesen. Die CAPRIE-Studie (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of

A.2. Thrombozyten

Ischemic Events) konnte zeigen, dass bei atherosklerotischer Grundkrankheit (kurz zurückliegender Myokardinfarkt, Schlaganfall, pAVK) die Behandlung mit Clopidogrel 75 mg/d gegenüber Aspirin 325 mg/d bei ähnlich guter Verträglichkeit zu einer signifikanten Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse führte²¹. Die therapeutische Überlegenheit von Clopidogrel war aber nicht so groß, dass es ASS als Standardtherapie verdrängt hätte.

Die CURE-Studie (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events) konnte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) ohne ST-Hebung zeigen, dass die zusätzliche Gabe von Clopidogrel zur Standardtherapie (inkl. ASS) das Gesamtrisiko von Tod, Schlaganfall oder Myokardinfarkt um 20% (9,28% vs 11,47%) reduziert¹³⁸. Der Median des Beobachtungszeitraums betrug 9 Monate.

Die COMMIT-Studie (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) wies kürzlich nach, dass auch Patienten mit Myokardinfarkt mit ST-Hebung (STEMI) von einer zusätzlichen Gabe von Clopidogrel (75 mg/d, keine Initialdosis) profitieren. Sowohl das Gesamtrisiko von Tod, Re-Infarkt oder Schlaganfall als auch die Mortalität aufgrund jeglicher Ursache waren signifikant über den Beobachtungszeitraum (Aufnahme bis Entlassung des Patienten aus dem Krankenhaus oder max. 4 Wochen) reduziert²⁶.

Durch PCI-CURE, einer Substudie von CURE, wurde die Vorbehandlung mit Clopidogrel vs. Placebo bei perkutaner Koronarintervention (PCI) bei Patienten mit ACS ohne ST-Hebung verglichen (Basistherapie bestand immer aus ASS, ggfs. Heparin, β -Blocker, ACE-Hemmer etc.) und eine unter Clopidogrel signifikant niedrigere Rate an Myokardinfarkten bzw. (Notfall-) Revaskularisationen ermittelt¹⁰⁰. Diese Ergebnisse wurden durch CREDO bestätigt (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation)¹³⁴ und durch PCI-CLARITY (PCI-Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy) auf Patienten mit STEMI übertragen¹²¹. Die duale Therapie von Clopidogrel zusammen mit ASS hat sich mittlerweile als Standard-Medikation der antithrombozytären Therapie bei PCI etabliert.

Neuere Studien haben jedoch belegt, dass eine bemerkenswerte individuelle Variabilität der Wirkung des Clopidogrels besteht. In Abhängigkeit des Therapie-Schemas zeigen 5–25% der Patienten mit stabiler Angina pectoris kein adäquates Ansprechverhalten^{57,84,107}. Die Clopidogrel-Resistenz scheint einherzugehen mit einem erhöhten Risiko wiederauftretender Atherothrombosen^{58,99}. Der Mechanismus der Clopidogrel-Resistenz ist umstritten. Es werden eine erhöhte Sensitivität ruhender Plättchen, dysfunktionaler Cytochrome P-450 Metabolismus (entweder aufgrund erblicher Defekte oder Interaktion mit anderen Medikamenten bspw. Statinen), genetischer Polymorphismus des P2Y12-

A. Einleitung

Rezeptors, Unterschiede bei der Resorption oder Kombinationen dieser Faktoren diskutiert^{22,40,91,92}.

Trotz der Notwendigkeit, die individuelle Wirksamkeit von Clopidogrel quantitativ zu bestimmen, ist bisher kein Standardverfahren erhältlich. Die bisherigen Methoden (Messung der Aggregation, p-Selektin-Expression, Fibrinogenbindung, Adhäsion etc.) sind unspezifisch und messen nur allgemeine Funktionen der Blutplättchen. Im klinischen Rahmen sind sie von begrenztem Nutzen, weil den Patienten meist mehrere die Plättchenfunktion beeinflussende Substanzen verordnet werden.

Kürzlich ist eine neuartige Methode beschrieben worden, die eine spezifischere Erfassung des Clopidogrel-Effektes erlaubt. Der P2Y₁₂ ADP-Rezeptor ist an ein G α_i -Protein gekoppelt. Seine Aktivierung führt zur Hemmung der Adenylatzyklase und somit zur Abnahme des cAMP-Spiegels. Hieraus resultiert eine Aktivitätsabnahme der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK) und eine verminderte Phosphorylierung ihrer Substrate. Die P2Y₁₂-Aktivität kann daher über den Phosphorylierungsgrad des cAK-Substrates *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP, nähere Beschreibung ▷ **Kap. A.2.2, S. 9**) bestimmt werden. Der Phosphorylierungsgrad kann bisher unter Nutzung des phosphospezifischen Antikörpers 16C2 – dieser erkennt nur die phosphorylierte Variante von VASP – mittels Western-Blot- und FACS-Analyse gemessen werden^{46,128}.

► Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) auf Plättchen

Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) gehören zu einer bisher vier Mitglieder umfassenden Familie G-Protein gekoppelter, heptahelikaler Rezeptoren. Zuerst entdeckt wurde PAR1, der von allen PARs am besten untersucht ist und als Prototyp gilt¹⁴³. PAR1 wird aktiviert durch Bindung an Thrombin, das die extrazellulär gelegene N-terminale Exodomäne des Rezeptors zwischen Arg-41 und Ser-42 schneidet, wodurch ein neuer Amino-Terminus entsteht. Dieser dient als sogenannter *tethered ligand* und vermittelt durch Bindung an den Corpus des Rezeptors die transmembrane Signaltransduktion^{24,143}. PAR1 entspricht somit einem Peptid-Rezeptor der seinen eigenen Liganden trägt. PAR3 und PAR4 werden ebenfalls durch Thrombin aktiviert. PAR2 wird durch Trypsin und durch die Gerinnungsfaktoren Faktor VIIa und Xa, aber nicht durch Thrombin aktiviert. Es ist auffallend, dass die N-terminalen Exodomänen von PAR1 und PAR3 sowohl N-terminal als auch C-terminal zur Thrombin-Schnittstelle Hirudin-ähnliche Sequenzen besitzen, die

A.2. Thrombozyten

mit der Fibrinogen-Bindungsstelle von Thrombin interagieren^{83, 144}. Diese Interaktion erscheint wichtig zur Rezeptoraktivierung bei niedrigen Thrombinkonzentrationen. PAR4 enthält keine Hirudin-ähnliche Sequenz und bedarf zur Aktivierung de facto auch einer höheren Thrombinkonzentration (s.u.).

Neben der Interaktion mit PARs bindet Thrombin auch an GPIIb/IIIa, das Teil eines multifunktionalen Proteinkomplexes ist. Die Bindung an GPIIb/IIIa scheint als Kofaktor bei der Aktivierung der PARs zu dienen³².

Übereinstimmend mit der Vorstellung eines tethered ligand konnten für PAR1, PAR2 und PAR4 synthetische Peptide hergestellt werden, die die ersten 6 Aminosäuren des neuen N-Terminus nachahmen und die den jeweiligen Rezeptor spezifisch aktivieren. Häufig wird für PAR1 das Peptid SFLLRN und für PAR4 AYPGKF bzw. GYPGKF verwendet. Es ist bemerkenswert, dass für PAR3 bisher kein Peptid gefunden werden konnte, das den Rezeptor aktivieren könnte²⁷.

Der Mechanismus der PAR1-Aktivierung ist auffällig irreversibel. Direkt nach Aktivierung wird PAR1 ähnlich wie ein β_2 -Rezeptor phosphoryliert und von der Signaltransduktionskaskade entkoppelt. Statt einer Wiederverwertung wird PAR1 allerdings zu den Lysosomen transportiert und degradiert^{66, 78}. In Fibroblasten und Endothelzellen wird die Reaktionsfähigkeit gegenüber Thrombin durch den Transport von naivem PAR1 aus präformierten intrazellulären Speichern zur Zelloberfläche aufrechterhalten. In Megakaryozyten bedarf es der neuen Proteinsynthese. Plättchen verfügen wahrscheinlich über keinen Mechanismus um das Ansprechvermögen auf Thrombin wiederzuerlangen, einmal aktiviert werden sie in einen Thrombus inkorporiert und nicht wieder verwendet.

Humane Thrombozyten exprimieren PAR1 und PAR4, murine Thrombozyten PAR3 und PAR4. Die alleinige Aktivierung sowohl von PAR1 als auch von PAR4 ist ausreichend zur Aktivierung humaner Plättchen⁸⁵. PAR1 vermittelt die Aktivierung von Plättchen unter niedrigen Thrombinkonzentrationen, wohingegen die alleinige Stimulation von PAR4 nur bei hohen Thrombinkonzentrationen zur Plättchenaktivierung führt. Gleichzeitige Blockade von PAR1 und PAR4 durch anti-PAR1-IgG und anti-PAR4-IgG führte praktisch zu einem vollständigen Verlust des Ansprechens von Plättchen auch gegenüber hohen Thrombinkonzentrationen⁸⁵.

Studien legten zunächst nahe, dass Thrombin und PAR-aktivierende Peptide eine Hemmung der Adenylatzyklase und Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) via $G\alpha_q$ und $G\alpha_i$ bewirken^{52, 81, 139}.

A. Einleitung

Benka et al. demonstrierten durch anti- $G\alpha_q$ -Antikörper, dass PARs an $G\alpha_q$ koppeln¹⁰. Offermanns et al. belegten, dass PARs sowohl an $G\alpha_q$ als auch an $G\alpha_{12/13}$ koppeln¹¹⁵. In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die PAR induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten wesentlich von der gleichzeitigen Stimulation des $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptors P2Y₁₂ abhängt. So führte die Antagonisierung des P2Y₁₂ zu einer verminderten Kollagen- bzw. Thrombin-induzierten Thrombin-Generierung auf der Thrombozytenoberfläche (integraler Bestandteil des Prothrombinasekomplexes bei der Gerinnung)³³ und zu einer verminderten Thrombin-induzierten Phosphorylierung von ERK2 und der Protein Kinase B (PKB, Akt)^{36,87}. Der inhibitorische Effekt der P2Y₁₂ Antagonisierung auf die ERK2- und PKB-Phosphorylierung konnte durch Stimulation mit Epinephrin, das wesentlich über den $G\alpha_z$ -gekoppelten Rezeptor α_{2A} wirkt, kompensiert werden.

Kim et al.⁸⁶ wiesen durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels nach, dass die Hemmung der Adenylatzyklase durch Inkubation von Plättchen mit Thrombin, SFLLRN oder AYPGKF durch Ro 31-8220 (ein Proteinase C selektiver Inhibitor, der die Sekretion und damit die ADP-Freisetzung unterdrückt) bzw. AR-C66096 (ein P2Y₁₂ selektiver Antagonist) unterdrückt werden kann. Bei einem P2Y₁₂ defizienten Patienten führte die Stimulation der Plättchen mit Thrombin, SFLLRN oder AYPGKF ebenfalls zu keiner Hemmung der Adenylatzyklase. AR-C66096 führte aber zu einer rechtsgerichteten Verschiebung der Thrombin- bzw. AYPGKF-induzierten Plättchenaggregation. Hieraus schlossen sie, dass die Hemmung der Adenylatzyklase exklusiv auf der Stimulation ADP-abhängiger $G\alpha_i$ -vermittelter Signalwege beruht und dass Thrombin und PAR-aktivierende Peptide eine $G\alpha_i$ -unabhängige Aggregation verursachen können.

Obwohl zahlreiche Forschungsgruppen an der Entwicklung kleiner nicht-peptidischer PAR1-Antagonisten arbeiten, ist ihr medikamentöses Potential bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen noch weitestgehend unerschlossen¹³³.

A.2.2 Inhibition von Thrombozyten

Intaktes Endothel produziert lokal wirkende Thrombozyteninhibitoren – die bekanntesten sind NO (EDRF = *endothelium derived relaxing factor*) und Prostacyclin (PG-I₂) –, die eine Aktivierung von Thrombozyten und in Folge die Thrombusbildung verhindern. Pharmakologisch kann durch organische Nitrate (Glycerintrinitrat, Isosorbitdinitrat etc.) und Molsidomine exogen NO zugeführt werden. Weiterhin besitzt auch die Gabe von PG-E₁

(Alprostadil) und PG-I₂ (Iloprost) eine zunehmende therapeutische Bedeutung.

Viele Plättchenantagonisten erhöhen die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nucleotide (cGMP, cAMP). PG-I₂ und PG-E₁ binden an G α_s -Protein gekoppelte Prostaglandin-Rezeptoren. Die G α_s Untereinheit aktiviert die AC (Adenylatzyklase), bei der es sich um ein integrales Membranglykoprotein handelt, das die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. Stickstoffmonoxid und andere NO-Donoren stimulieren die GC (Guanylatzyklase). GCs existieren als membrangebundene und lösliche Formen. In Plättchen konnte bisher nur die lösliche Form, die im Zytoplasma lokalisiert ist, nachgewiesen werden.

Die Konzentrationszunahme intrazellulärer zyklischer Nucleotide führt zu einer umfassenden Hemmung der Thrombozytenfunktion. Diese beinhaltet die Hemmung der Adhäsion, der Aggregation und der Degranulation sowie die Abnahme der Anzahl proinflammatorischer Oberflächenproteine.

Zyklische Nucleotide induzieren die Plättchen-Inhibition hauptsächlich durch die Aktivierung der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase (cAK und cGK). cAK I, cAK II β und cGK I β sind die wesentlichen Formen in Plättchen. Bisher konnte nicht schlüssig geklärt werden, wie die Substrate der cAK und der cGK die Plättcheninhibition regulieren. Allerdings konnte bereits eine Reihe von cAK- bzw. cGK-Substraten identifiziert und charakterisiert werden (\triangleright **Tab. A.2**). Die Hemmung beeinflusst die zytosmatische Ca²⁺-Konzentrationszunahme, die Integrinaktivierung und eine Vielzahl Zytoskelett-assoziiierter Proteine (VASP, ABP, GPIIb β , Caldesmon etc.), die in der Reorganisation des Zytoskeletts involviert sind (\triangleright **Abb. A.2**).

► VASP und seine Funktion in Thrombozyten

Im Rahmen der Untersuchung des Phosphorylierungsmusters von humanen Plättchen, die mit Substanzen behandelt wurden, die die intrazelluläre cAMP- bzw. cGMP-Konzentration erhöhen, identifizierten Halbrügge und Walter^{60,61} 1989 ein Protein mit einer apparenten Molekularmasse von 50 kDa, das sowohl durch die cAK als auch die cGK phosphoryliert wird. Das Protein wurde VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein) genannt.

VASP ist ein 39 kDa Protein, das in der SDS-PAGE bei 46 kDa läuft. Es besitzt drei Konsensussequenzen für die cAK und die cGK: Ser 157, Ser 239 und Thr 278, die sowohl in vitro als auch in intakten Thrombozyten phosphoryliert werden. Ser 157 ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der cAK, wohingegen Ser 239 von der cGK bevor-

A. Einleitung

Substrat	cAK	cGK	Vermuteter Effekt der Phosphorylierung
ABP (actin binding protein)	×		Stabilisierung des ruhenden Zytoskeletts ²⁵
Caldesmon	×		Stabilisierung des ruhenden Zytoskeletts ⁶⁸
G α_{13}	×		Inhibition des RhoA/Rho-Kinase Signalweges ⁹⁶
GPIIb β	×		Inhibition der Kollagen-induzierten Polymerisation ^{41, 146}
Hsp27 (heat shock protein 27)		×	Reduzierte Stimulation der Aktin-Polymerisation in-vitro ¹⁹
IP ₃ -Rezeptor / IRAG	×	×	Abnahme der Ca ²⁺ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ^{5, 23, 35}
LASP (LIM and SH3 protein)	×	×	Reduzierte Bindungsaffinität an F-Aktin und Relokalisierung ins Zytosol ¹⁸
PDE3 (Phosphodiesterase 3)	×		Beschleunigte cAMP Degradation ⁹⁵
Rap1b	×	×	Inhibition der Rap1b Aktivierung ^{42, 90, 120, 129}
VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein)	×	×	s. Text

Tabelle A.2 Substrate der cAK und cGK in Plättchen

zugt wird. Thr 278 wird von beiden Kinasen nur schlecht phosphoryliert. Die Phosphorylierung von VASP führt in der SDS-PAGE zu einer Änderung des Molekulargewichts von scheinbaren 46 kDa zu 50 kDa¹⁷. Die Dephosphorylierung erfolgt in vitro durch die Protein-Phosphatasen PP2A, PP2B und PP2C und in humanen Thrombozyten vermutlich durch die PP2A².

VASP gehört zu der Ena/VASP Familie, die folgende Proteine beinhaltet: Ena (Drosophila Enabled), Mena (Mammalian Enabled, Maus), Evl (Ena-VASP-like protein, Maus), Avena (Avian Enabled, Huhn), RNB6 (Ratte), DdVASP (Dictyostelium VASP), Unc 34 (C. elegans). Alle Proteine der Ena/VASP Familie haben eine gleichartige Domänenstruktur. Diese beinhaltet eine hoch konservierte N-terminale und C-terminale Region (*Ena-VASP homology domain* (EVH) 1 bzw. 2) separiert durch variabelere *low complexity regions* (LCR) und *proline rich regions* (PRR)^{50, 59}.

Die Phosphorylierung von VASP korreliert eng mit der Inhibition der Plättchenaggregation und der Deaktivierung des Fibrinogen-Rezeptors GP IIb/IIIa⁷⁶. Die genaue Rolle von VASP bei der Plättcheninhibition ist noch nicht vollständig verstanden. Untersuchungen an Plättchen von VASP defizienten Mäusen (VASP -/- Mäuse) haben aber gezeigt, dass in-vitro VASP defiziente Thrombozyten gegenüber Wildtyp-Thrombozyten eine ver-

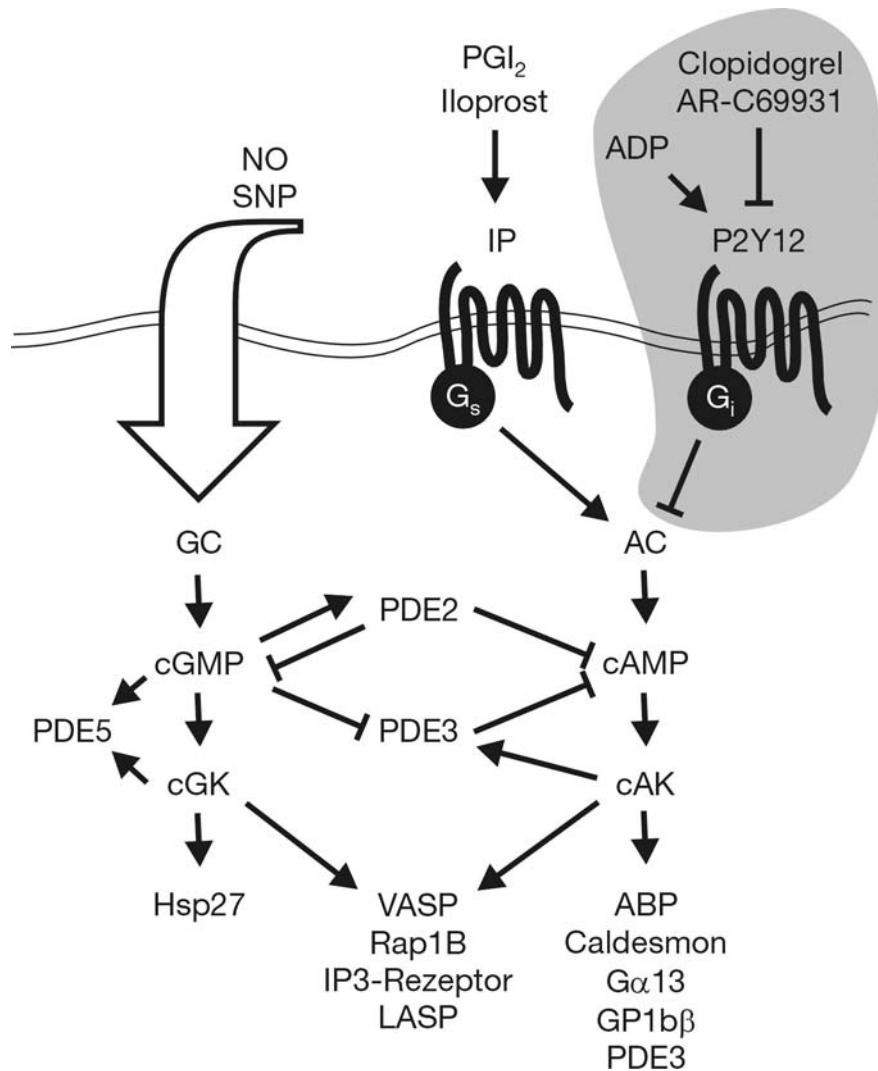


Abbildung A.2 Signalwege der Thrombozyten-Inhibition. Die Thrombozytenhemmung läuft über den cAMP/cAK- bzw. cGMP/cGK-Signalweg. PGI₂ führt G_{α_s}-vermittelt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und damit der cAK. Diese phosphoryliert VASP. Im grau hinterlegten Bereich der Abbildung ist der aktivierende Signalweg über G_{α_i} dargestellt und wie er therapeutisch durch Clopidogrel oder AR-C69931 gehemmt werden kann.

stärkte Plättchenaktivierung nach Kollagen- oder Thrombin-Stimulation aufweisen und eine eingeschränkte Hemmbarkeit durch zyklische Nukleotide^{6,63}. Kürzlich konnte demonstriert werden, dass in-vivo die Adhäsion von VASP^{-/-} Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen gesteigert ist. Unter pathophysiologischen Bedingungen war die Adhäsion an postischämische intestinale Gefäße, atherosklerotisch verändertes Endothel ApoE-defizienter Mäuse und subendotheliale Matrix nach endothelialer Denudation verstärkt⁹⁸.

Eine Ursache der Plättchenhemmung nach VASP-Phosphorylierung könnte darin be-

A. Einleitung

stehen, dass VASP in vitro gleichzeitig mit Gelsolin an die stumpfen Enden von Aktin Filamenten bindet und dabei die F-Aktin-auflösende Funktion des Gelsolin hemmt. Diese stellt Aktin Monomere für die erneute Polymerisation zur Verfügung und ist wesentlich für den *shape change* aktivierter Thrombozyten⁸.

Neuere Arbeiten zeigen, dass VASP auch durch klassische Formen der Protein Kinase C (PKC) an Ser 157 phosphoryliert wird. Die PKC-Isoform PKC δ hingegen scheint die Phosphorylierung an Ser 157 negativ zu regulieren¹¹⁶.

A.3 Zielsetzung der Dissertation

A.3.1 Monitoring und Wirkungsweise von Clopidogrel

Im Rahmen des ersten Teils der Dissertation sollte ein neu etablierter *enzyme-immunoassay* (EIA) evaluiert werden, der die Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors durch Clopidogrel anhand der VASP-Phosphorylierung bestimmt. Die bisherigen Formate zur Messung der VASP-Phosphorylierung – FACS und Westernblot – erscheinen im klinischen Alltag nur eingeschränkt nutzbar. So weist der Westernblot Mängel bei der Quantifizierbarkeit auf und die FACS-Analyse erfordert das Vorhandensein eines in der Anschaffung kostenintensiven Durchflusszytometers. Zusätzlich sollte ein systematischer Vergleich verbreiteter Verfahren (Aggregation, p-Selektin Expression, PFA100) zur Bestimmung der Plättchenreaktivität unter Einbeziehung des VASP-FACS Assays und des neu etablierten EIA durchgeführt werden. Daher führten wir eine klinische Doppelblindstudie mit gesunden Probanden durch, die entweder mit Clopidogrel oder Placebo, aber mit keinen weiteren Medikamenten behandelt wurden.

Mehrere Arbeiten legen nahe, dass die Thrombin- und TxA₂- (Thromboxan A₂) induzierte Plättchenaktivierung in-vitro von der gleichzeitigen Stimulation des G α_i -gekoppelten P2Y₁₂ ADP-Rezeptors abhängig ist. Unklar ist, ob sich die Thrombin- und TxA₂-induzierte Plättchenaktivierung auch in-vivo durch Clopidogrel hemmen lässt. Es wurde daher durch zusätzliche Experimente im Rahmen der oben erläuterten Probandenstudie der Frage nachgegangen, ob die antithrombozytären Eigenschaften des Clopidogrels teilweise auf der indirekten Hemmung der Thrombin und TxA₂-induzierten Plättchenaktivierung beruhen.

A.3.2 Identifikation und Charakterisierung von cGK Substraten in Thrombozyten

Zyklische Nukleotide induzieren die Plättchen-Inhibition durch Aktivierung der cAK und cGK. Mittlerweile konnte eine Reihe von cAK- bzw. cGK-Substraten identifiziert und charakterisiert werden. Trotzdem liegt nach wie vor kein schlüssiges Bild davon vor, wie die Substrate der cAK und der cGK die Plättcheninhibition regulieren. Die Identifikation weiterer Substrate der cGK könnte zum besseren Verständnis beitragen. Da die Inkubation von Thrombozyten mit NO-Donoren innerhalb von Millisekunden zur Plättcheninhibition führt, postulierten wir, dass insbesondere diejenigen Substrate der cGK für den Prozess der Hemmung verantwortlich sind, die frühzeitig durch die cGK phosphoryliert werden. Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde deshalb der Identifikation „früher“ cGK-Substrate nachgegangen.

Zu den bereits bekannten cGK-Substraten gehört VASP. Die genaue Rolle von VASP in der Plättcheninhibition ist bisher nur teilweise verstanden. Die Interpretation bisheriger Daten ist erschwert, weil die Ergebnisse früherer Arbeiten zur Funktion von VASP in Plättchen, aufgrund der Verwendung von Assays mit eingeschränkter Reliabilität (Fibrinogen-Bindung etc.), verifiziert werden müssen. Wir untersuchten daher anhand VASP-defizienter (VASP $-/-$) Mäuse erneut den Einfluss von VASP auf die Plättchenaktivierung unter Verwendung verbesserter, neu etablierter Messverfahren und bestimmten hierbei auch bisher nicht erfasste Parameter.

Kapitel B

Material & Methoden

B.1 Material – 17

- B.1.1 Bakterien – 17
- B.1.2 Zellkultur – 18
- B.1.3 Oligonukleotid-Primer – 19
- B.1.4 Plasmide – 20
- B.1.5 Antikörper – 21
- B.1.6 Enzyme – 22
- B.1.7 Kits – 23
- B.1.8 Thrombozytenaktivatoren und -inhibitoren – 23
- B.1.9 Größenstandards – 23
- B.1.10 Chemikalien und Lösungen – 24
- B.1.11 Geräte – 24
- B.1.12 Software – 26

B.2 Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion – 27

- B.2.1 Abnahme und Präparation der Blutproben – 27
- B.2.2 Zellzählung – 28
- B.2.3 Aggregation – 28
- B.2.4 Serotonin Sekretion – 28
- B.2.5 Sekretion lysosomaler Glykosidasen – 29
- B.2.6 p-Selektin (CD62p) Expression – 30
- B.2.7 Thromboxan A2 Synthase Aktivität – 31
- B.2.8 Thromboxan B2 Sekretion – 31
- B.2.9 ATP Sekretion – 32
- B.2.10 PFA-100 – 32

B. Material & Methoden

B.2.11 VASP Phosphorylierung – 32

B.2.12 Bestimmung der cAMP-Konzentration – 36

B.3 Methoden zur Evaluation muriner Thrombozytenfunktion – 37

B.3.1 VASP -/- Mäuse – 37

B.3.2 Isolierung muriner Thrombozyten – 37

B.3.3 p-Selektin (CD62p) Expression und GP IIb/IIIa Aktivierung – 38

B.3.4 Serotonin Sekretion mit 3H-Serotonin – 38

B.3.5 Sekretion lysosomaler Glykosidasen – 39

B.3.6 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen – 40

B.4 Molekularbiologische Methoden – 41

B.4.1 RNA Isolierung aus humanen Thrombozyten mittels TRIzol – 41

B.4.2 Reverse Transkription mit dem OneStep RT-PCR Kit – 42

B.4.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – 42

B.4.4 Horizontale Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten – 43

B.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten – 43

B.4.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen – 44

B.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren – 44

B.4.8 Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen – 44

B.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten – 45

B.4.10 Identifikation der Plasmide mit Insert – 45

B.4.11 Transformation kompetenter E. coli-Zellen – 46

B.4.12 Aufbewahrung von E. coli-Stämmen als Glycerinkulturen – 46

B.4.13 Isolierung von Plasmid-DNA – 46

B.4.14 Sequenzierung – 46

B.4.15 Einfügen von Punktmutationen durch Splice Overlap Extension – 47

B.4.16 Einfügen von Punktmutationen mit dem Quiksite direct Mutagenesis Kit – 47

B.5 Proteinbiochemische Methoden – 47

B.5.1 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Lämmli – 47

B.5.2 Coomassie Blau-Färbung – 48

B.5.3 Western Blot – 49

- B.5.4 Trocknen von Gelen – 50
- B.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay – 50
- B.5.6 Phosphorylierung von CAP1 in transfizierten eukaryoten Zellen und Immunpräzipitation – 51
- B.5.7 Phosphorylierung von Substraten der cGK in Thrombozyten mit ^{32}P -Orthophosphat und Proteinfällung – 52
- B.5.8 Proteinsolubilisierung für die 2-dimensionale Gelelektrophorese – 52
- B.5.9 2-dimensionale Gelelektrophorese – 54
- B.5.10 Autoradiografie – 55
- B.5.11 Silberfärbung von 2D-Gelen nach Heukeshoven – 55

B.6 Zellkultur – 56

- B.6.1 Kulturbedingungen – 56
 - B.6.2 Passagieren adhärenter Zellen – 56
 - B.6.3 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen – 57
 - B.6.4 Transiente Transfektion mit Metafectene – 57
-

B.1 Material

B.1.1 Bakterien

► Bakterienstämme

Zur Klonierung wurde der Bakterienstamm XL1-Blue (Bullock et al.¹⁶) mit folgendem Genotyp verwendet: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac⁻ [F' proAB⁺ lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*.

► Flüssig- und Festmedien

Trypton (Bacto Tryptone), Hefe-Extrakt (Bacto Yeast Extract) und Casein Hydrolysat wurden von der Fa. DIFCO Laboratoires bezogen.

B. Material & Methoden

LB Medium (Luria Broth):

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl

NZY⁺ Medium, pH 7,5:

1% (w/v) NZ Amin (Casein Hydrolysat), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 12,5 mM MgCl₂^{*}, 12,5 mM MgSO₄^{*}, 0,4% (w/v) Glucose^{*}

* diese Zusatzstoffe werden nach dem Autoklavieren filtersterilisiert hinzugefügt

Zum Gießen der Agarplatten wird 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

► **Zusätze für Medien**

Folgende Zusätze wurden in den angegebenen Endkonzentrationen verwendet:

- 100 - 200 µg/ml Ampicillin
- 25–50 µg/ml Kanamycin
- 1 mM IPTG
- 40 µg/ml X-Gal

B.1.2 Zellkultur

► **Eukaryote Kulturzellen**

PtK₂-Zellen (ATCC CCL-56):

Diese epitheliale Zelllinie aus der Niere der Beutelratte wurde von Herrn Prof. Dr. Wehl-
and (GBF Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

► **Medien**

Die aufgeführten Produkte wurden von der Fa. Life Technologies bezogen.

- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, mit 4,5 g/l Glucose)
- Minimal Essential Medium (MEM)
- Dulbeccos PBS Fötale Kälberserum (FCS)
- Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)

B.1.3 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotide wurden bei der Fa. MWG oder Fa. Eurogentec in Auftrag gegeben

Bezeichnung	Sequenz und Erläuterung
CAP1HuBAM	5' - G T C G G A T C C A T G G C T G A C A T G C A A A A T C T G - 3' BamHI CAP1 bp 1-21
CAP1HuNOT	5' - A A T G C G G C C G C T T A T C C A G C A A T T T C T G T C A C T G T G - 3' NotI CAP1 bp 1428-1404

Tabelle B.1 Klonierprimer

Bezeichnung	Sequenz und Erläuterung
CAP1995sT/A	5' - C A A A C G A G C C G C A A A G A A G G A - 3' *
CAP1995asT/A	5' - T C C T T C T T T G C G G C T C G T T G - 3' *
CAP1S125Asense	5' - G G A G A A G A A C C G A G G C C C A A G T T A A T C A C C T G T C - 3' **
CAP1S125Aanti	5' - G A C A G G T G A T T A A C A A C T T G G C C C T C G G T T C T C T C C - 3' **

Tabelle B.2 Mutageneseprimer

* CAP1 Aminosäure 375, Threonin (A C A) → Alanin (G C A)

** CAP1 Aminosäure 125, Serin (A G C) → Alanin (G C C)

B. Material & Methoden

Bezeichnung	Sequenz und Erläuterung
Bi31	5' - <u>CCAGTTCAAGTACAGC</u> - 3' <i>CAP1 bp973-958</i>
M13 uni (-21), pCR 2.1-TOPO	5' - TGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
M13 rev (-29), pCR 2.1-TOPO	5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3'

Tabelle B.3 Sequenzierprimer

B.1.4 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Bezugsquelle	Verwendung
pCR 2.1-TOPO	Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen	Klonierung
pQE-30	Ampicillin	Qiagen	prokaryote Expression
pcDNA3(+)	Ampicillin, Neomycin	Invitrogen	eukaryote Expression
pEGFP-C1	Kanamycin, Neomycin	BD Biosciences Clontech	eukaryote Expression

Tabelle B.4 Plasmide

Die im Laufe dieser Arbeit entstandenen CAP1-Plasmide sind unter \triangleright **Kap. C.3.2, S. 71**, beschrieben.

B.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Epitop	Spezies/Klasse	Bezugsquelle	Referenz
VASP-16C2	Phospho-S239-VASP, human	RKVpSKQE	Maus, IgG1κ	Nanotools	Smolenski et al., 1998 ¹³²
VASP-16C2 ^{FITC}	Phospho-S239-VASP, human	RKVpSKQE	Maus, IgG1κ	Nanotools	
VASP-IE273	VASP, human	ESVRRPWE	Maus, IgG1κ	Immunoglobine	Abel et al., 1996 ¹
Anti-CD62 ^{FITC}	p-Selektin, human		Maus, IgG1κ	BD Biosciences	
Anti-Kaninchen ^{POD}	IgG, Maus		Ziege	Chemicon	
DELFLIA Anti-Maus ^{Europium}	IgG, Maus		Kaninchen, IgG	PerkinElmer Wallac	
JL-8	GFP und Varianten		Maus, IgG2A	BD Biosciences	

Tabelle B.5 Antikörper I

Abkürzungen:

DELFLIA: Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay, FITC: Fluorescein-isothiocyanat, POD: Peroxidase, GFP: green fluorescent protein

B. Material & Methoden

Bezeichnung	Antigen	Spezies/Klasse	Bezugsquelle	Referenz
JON/A ^{PE}	aktiviertes GP IIb/IIIa, murin	Ratte, IgG2b	Emfret Analytics	Bergmeier et al., 2002 ¹¹
Wug.E6 ^{FITC}	p-Selektin, murin	Ratte, IgG1	Emfret Analytics	
JAQ1 ^{FITC}	GPVI, murin	Ratte, IgG	Emfret Analytics	Nieswandt et al., 2000 ¹¹¹
LucA5 ^{FITC}	GPIIIa, murin	Ratte, IgG2a	Emfret Analytics	
Gon.C2 ^{FITC}	GPV, murin	Ratte, IgG1	Emfret Analytics	
Xia.B4 ^{FITC}	GPIX, murin	Ratte, IgG1	Emfret Analytics	
	GP1b, murin			
Tap.A12 ^{FITC}	Integrin α 5 Kette, murin	Ratte, IgG1	Emfret Analytics	
	Integrin β 1 Kette, murin			
Sam.G4 ^{FITC}	Integrin α 2 Kette, murin	Ratte, IgG2b	Emfret Analytics	
Nyn.H3 ^{FITC}	CD9, murin	Ratte, IgG2a	Emfret Analytics	

Tabelle B.6 Antikörper II, anti-murin

Abkürzungen:

FITC: Fluorescein-isothiocyanat, PE: Phycoerythrin

B.1.6 Enzyme

- Tag Polymerase (PerkinElmer)
- Pfu Polymerase (Stratagene)
- Restriktionsenzyme (New England BioLabs, MBI Fermentas)
- T4 DNA-Ligase (New England BioLabs)
- Taq PCR Master Mix (Qiagen)

- Apyrase (Sigma)
- Complete[®] (Mini) EDTA free Proteaseinhibitor Cocktail (Roche)
- Calyculin A (Biotrend Chemikalien GmbH)

B.1.7 Kits

- OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)
- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Quiksite direct Mutagenesis Kit (Stratagene)

- BCA Protein Assay (Pierce)
- cAMP RIA Biotrak (Amersham Pharmacia Biotech)
- TxB2 EIA (Biotrend)

B.1.8 Thrombozytenaktivatoren und -inhibitoren

- 8-pCPT-cGMP (Biolog)
- ADP (Sigma)
- Adrenalin (Suprarenin[®], Hoechst/Aventis)
- AR-C69931MX (AstraZeneca)
- AY-NH2 (Tocris)
- Clopidogrel (Plavix[®], Sanofi-Synthelabo)
- Iloprost (Ilomedin[®], Schering)
- Kollagen (Horm[®], Nycomed)
- Thrombin, bovin (Roche)
- Thrombin, human (Sigma, Roche)
- TRAP6 (SFLLRN) (Bachem)
- U46619 (Alexis)

B.1.9 Größenstandards

- 100 bp Ladder Plus (0,1–3 kb) (MBI Fermentas)

B. Material & Methoden

- 1 kb Ladder Plus (0,25–10 kb) (MBI Fermentas)
- BenchMark Protein Standard (10–220 kDa) (Life Technologies)
- Kaleidoscope Prestained Protein Standard (3,4–202 kDa) (New England BioLabs)

B.1.10 Chemikalien und Lösungen

- 6×-Loading Buffer (MBI Fermentas)
- ³²P-Orthophosphat (Hartmann Analytic)
- ³H-Serotonin (Amersham Pharmacia Biotech)
- Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (Biorad)
- CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) (Sigma)
- DELFIA Assay Buffer (PerkinElmer Wallac)
- DELFIA Washing Solution (PerkinElmer Wallac)
- DELFIA Enhancement Solution (PerkinElmer Wallac)
- DTT (Dithiothreitol) (Biomol)
- ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech)
- Emulsifier-Safe (Packard)
- Fluoxetin (RBI)
- Luciferin-Luciferase Reagenz (Chrono-lume[®], Chrono-Log)
- o-Phthalaldehyd (Sigma)
- p-Nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminid (Sigma)
- p-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranosid (Sigma)
- p-Nitrophenyl-beta-D-glucuronid (Sigma)
- SB 3-10 (N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat) (Pharmacia)
- Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (Fluka)
- TRIzol (Life Technologies)
- Tween 20 (Serva)

B.1.11 Geräte

- Zentrifugen:
 - Microzentrifuge 5415 C (Eppendorf)
 - 3K-1 (Sigma)

- RC 5B Plus (Sorvall), Rotor SS-34 Rota
- Silenta/K (Hettich)
- Speed Vac plus SC 110 A (Savant)
- Schüttler:
 - Rocking Platform (Biometra)
 - DELFIA Plateshake 1296-003 (PerkinElmer)
 - Schüttelinkubator Certomat H bzw. BS-1 (B.Braun Biotech International)
- Brutschränke:
 - Bakterien (Haereus)
 - Zellkultur TG 150 (Jouan)
- Ultraschallgeräte:
 - Sonifier 250 (Branson)
 - Ultraschallbad Laboson (Benders und Hobein)
- Feinwagen:
 - Analytic LC 4800 P (Satorius)
 - Analytic AC 120 S (Satorius)
- Elektrophoresekammern:
 - Polyacrylamidgele (Anfertigung durch Fa. Noras)
 - Agarosegele Mini Sub DNA Cell (BioRad)
- Protean IEF (Isoelectric Focussing) Chamber (Biorad)
- Gel Trockner:
 - Drygel Sr. SE 1160 (Hoefer Scientific Instruments)
 - 583 Gel Dryer (Biorad)
- Spannungsgeber:
 - Standard Power Pack P25 (Biometra)
 - Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech)
- Ca^{2+} -Messplatz:
 - Fluoreszenzmikroskop Diaphot (Nikon)
 - Xenon Lampe Xenophot HLX (Osram)
 - CCD Camera (Theta-Systems)
- Flusskammer:
 - Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss)
 - Objektiv $63\times$ Achromplan (Zeiss)
 - CCD Kamera Flashbus CVM300 (Visitron)

B. Material & Methoden

- Pumpe 100i Syringe Pump (WPI)
- Sterilbank LaminAir (Holten)
- Durchflusssytometer FACSCalibur (Becton Dickinson)
- Microplate Reader Victor2 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer Wallac)
- Gamma-Counter LB 2104 (Berthold)
- Flüssigkeitsszintillationszähler 1900CA TRI-CARB (Packard)
- Aggregometer Platelet Aggregation Profiler PAP-4 (Biodata Corporation)
- Entwickler X-OMAT M 35 (Kodak)
- Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (PerkinElmer)
- Ultraviolettisch TFX-35M (Life Technologies)
- CCD Kamera XC-ST70 (Intas)
- Microplate Washer (Tecan)
- Luminescence Spectrometer LS 50 (PerkinElmer)
- UV-Photometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech)
- pH-Meter PHM 92 LAB (Radiometer Kopenhagen)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries/Bender und Hobein)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf) Wasserbad E12 (Haake)
- Test tube heater (stuart scientific, Heinse + Ziller)

B.1.12 Software

- Cellquest 3.1 (BD Biosciences)
- Fast Capture Version 2.2.0 (Fast Multimedia)
- FUCAL (Till Photonics)
- L^AT_EX_{2 ϵ}
- MetaMorph Version 4.6 (Univeral Imaging)
- MetaVue Version 5.0r6 (Univeral Imaging)
- Wallac 1420 Version 2.0 (PerkinElmer Wallac)

B.2 Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion

B.2.1 Abnahme und Präparation der Blutproben

Alle Präparationen werden aus frisch entnommenem, venösen Vollblut gesunder Spender vorgenommen, bei denen keine die Thrombozytenfunktion beeinflussende Medikation vorliegt⁴⁷.

Blutabnahme: Die Vena cubitalis wird mit Butterfly-Nadeln der Größe 18 G punktiert. Durch die Wahl großlumiger Punktionsnadeln soll der auf die Blutplättchen wirkende Scherstress und somit eine Präaktivierung reduziert werden. Das Blut wird ohne Aspiration durch freien Fluss gewonnen.

Zitrat-stabilisiertes Vollblut: Die Koagulation wird durch Zugabe von Zitratpuffer zum Vollblut im Verhältnis 1:5 verhindert. Das mit Zitrat stabilisierte Vollblut wird für die meisten Versuche, die Vollblutproben erfordern, in dieser Form eingesetzt.

Platelet-rich plasma (PRP): Zentrifugation des zitierten Vollblutes für 20 min bei 300 g führt zur einer Phasentrennung von PRP, Leukozyten und Erythrozyten. Die obere PRP Phase wird mit einer Plastikpipette abgenommen und in Plastikröhrchen überführt.

Washed platelets (WP): Zur Präparation der WP wird das entnommene Blut mit 15 mM EGTA enthaltendem Zitratpuffer antikoaguliert. Nach Gewinnung des PRP nach dem genannten Verfahren wird dieses für 10 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in Resuspensionspuffer resuspendiert.

Vollblut zur Messung der ATP Sekretion und des Phospho-VASP Gehaltes mittels Zytometrie wird nach Konnektion einer Butterfly-Nadel der Größe 18 G mit einer 5 ml Sarstedt Zitrat Monovette (grün) durch sanfte Aspiration gewonnen und ohne weitere Zusätze benutzt, wobei die Zitrat-Endkonzentration bei kompletter Füllung der Monovette 106 mM beträgt. Für die PFA-100 Analysen wurden Sarstedt Zitrat Monovetten (blau) verwendet, bei denen die Zitratendkonzentration 129 mM beträgt.

Alle Versuche mit Thrombozyten werden unter Verwendung von Kunststoffpipetten, -gefäßen etc. durchgeführt, um eine Präaktivierung durch polare Glasflächen zu vermeiden. Für die Stimulationsversuche werden die verwendeten Eppendorf Caps, um das Risiko einer Präaktivierung durch die rauhe Innenwand der Caps zu senken, vorher silikonisiert, indem sie mit Sigmacote (Fa. Sigma) befüllt, nach 3 h entleert, mit demineralisiertem Wasser gewaschen und auf 80 °C für 30 min erhitzt werden.

B. Material & Methoden

Zitratpuffer, pH 6,5:

100 mM Natriumzitrat, 7 mM Zitrat, 140 mM Glucose, 15 mM EGTA*
(*nur bei Präparation von WP)

Resuspensionspuffer, pH 7,4:

145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose

B.2.2 Zellzählung

Die Zelldichte der Zellsuspensionen wird nach 1:100 Verdünnung in PBS (*phosphate buffered saline*) mit dem automatischen Zellzähler Technicon H.3 RTC (Fa. Bayer) oder mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

B.2.3 Aggregation

Die Plättchenaggregation wird am BIO/DATA Platelet Aggregation Profiler Model PAP-4 gemessen. Es handelt sich um ein turbidimetrisches Verfahren, bei dem die Aggregation im Verlauf kontinuierlich über die Transmission der Plättchensuspension bestimmt und als Funktion der Zeit aufgezeichnet wird¹⁴.

Es werden 300 μ l PRP bei 37 °C in einer Mikrogasküvette bei einer Magnetrührfrequenz von 920 rpm gemessen. Das stimulierende Agens wird im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Vor den Messungen wird zunächst von dem jeweiligen Probanden zusätzlich zum PRP auch PPP (*platelet poor plasma*) als Referenzprobe präpariert. Dies geschieht indem 300 μ l PRP für 2 min bei 5000 g zentrifugiert werden und der Überstand, der keine Thrombozyten mehr enthält, als Referenzprobe verwendet wird. Das Aggregometer wird dann mit dem PPP auf 100% Transmission geeicht. Die PPP-Proben simulieren eine maximale Aggregation, weil bei Aggregation die Blutplättchen zu Boden sinken und dadurch aus dem Lichtstrahl entfernt werden.

B.2.4 Serotonin Sekretion

Das Verfahren zur Messung der Serotonin Sekretion wird modifiziert nach der Methode von Holmsen et Dangelmaier⁷⁴ durchgeführt. Der fluorimetrische Assay beruht auf dem Prinzip, dass Serotonin mit OPT (o-Phthalaldehyd) ein Fluorophor bildet³⁴.

Vor Stimulation wird den WP zur Signalverstärkung 4 μ M Fluoxetin zugegeben, bei

B.2. Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion

dem es sich um einen selektiven Serotonin-Wiederaufnahme Inhibitor (SSRI) handelt. Die Serotonin-Wiederaufnahme muss unmittelbar vor der Stimulation erfolgen, weil die Blockade eine langsame Serotoninfreigabe verursacht⁷². 350 μ l aktivierte Probe wird in eine Mischung aus 35 μ l EDTA (50 mM, pH 7,4) und 100 μ l Silikonöl überpipettiert, für 15 sec *gevortext* und für 30 sec bei 14.000 rpm (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert. Zur Bestimmung des gesamten intrazellulären Serotonins wird analog verfahren, wobei auf die Zentrifugation verzichtet wird. Nach Abkühlung der Proben auf Eis, wird 270 μ l der oberen Phase jeder Probe in ein neues Cap pipettiert und mit 60 μ l kalter 100 % (w/v) TCA gefällt. Nach Zentrifugation wird 250 μ l Überstand mit 1 ml OPT-Reagenz für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend die auf Eis abgekühlten Proben 2× mit Chloroform zur TCA-Extraktion gewaschen. Die Emission wird bei λ 475 nm auf dem Fluorimeter Victor2 1420 Multilabel Counter (Fa. Wallac) bei einer Anregungswellenlänge von λ 355 nm gemessen. Eine Standardreihe kann mit Serotoninkreatinsulfat-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen erstellt werden, mit denen wie mit den Proben verfahren wird.

OPT-Reagenz:

0,045% (w/v) o-Phthaldehyd, 9% (v/v) Ethanol, 7,3 N HCl

B.2.5 Sekretion lysosomaler Glykosidasen

Das kolorimetrische Verfahren zur Messung der Sekretion lysosomaler Glykosidasen, beschrieben von Holmsen und Dangelmaier⁷³, wurde im Rahmen der Doktorarbeit neu im Labor etabliert. Zugrunde liegt die Eigenschaft von Glykosidasen p-Nitrophenolglyceride zu spalten. Hierbei entsteht freies p-Nitrophenol dessen Absorption nach Alkalisierung bei 410 nm gemessen wird. Es wird die Sekretion von beta-Hexosaminidase (Substrat: p-Nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminid), beta-Galactosidase (Substrat: p-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranosid) und beta-Glucuronidase (Substrat: p-Nitrophenyl-beta-D-glucuronid) bestimmt.

1 ml aktivierte WP werden in eine Mischung aus 100 μ l EDTA (50 mM, pH 7,4) und 300 μ l Silikonöl überpipettiert, für 15 sec *gevortext* und für 30 sec bei 14.000 rpm (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Gesamtmenge der jeweiligen Glykosidase wird analog verfahren, wobei auf die Zentrifugation verzichtet wird. Nach Abkühlung der Proben auf Eis, wird 600 μ l der oberen Phase in ein neues Cap

B. Material & Methoden

überführt und mit 6 μl 10% (w/v) Triton X-100 versetzt. Für jede der zu bestimmenden Glykosidasen wird je 150 μl Probe entnommen. Zu jedem Ansatz werden 100 μl 0,1 M Zitratphosphatpuffer (bei beta-Hexosaminidase pH 4,5, bei beta-Galactosidase bzw. beta-Glucuronidase pH 5) und 50 μl entsprechendes Substrat pipettiert. Die Inkubationszeit bei 37 °C beträgt für die beta-Hexosaminidase 30 min und für die beta-Galactosidase bzw. beta-Glucuronidase 150 min. Die Inkubation wird mit 250 μl 0,08 M NaOH abgestoppt. Die Absorption wird bei λ 405 nm auf dem Victor2 1420 Multilabel Counter (Fa. Wallac) ermittelt. Eine Standardreihe kann mit p-Nitrophenol-Lösungen unterschiedlicher Konzentration erstellt werden, mit denen wie mit den Proben verfahren wird.

Substratlösungen:

20 mM Substrat, 0,15 M NaCl

B.2.6 **p-Selektin (CD62p) Expression**

Die p-Selektin Expression auf der Zelloberfläche von Thrombozyten wird durchflusszytometrisch bestimmt. Das Verfahren wurde neu etabliert in Anlehnung an das Protokoll des ADIAflo Platelet GP Kits (Fa. American Diagnostica).

20 μl WP werden 5 min nach Aktivierung aus einem 200 μl Ansatz in ein FACS-tube, in das vorher 10 μl anti-CD62p-FITC Maus IgG1 κ (Fa. BD Pharmingen) vorgelegt wird, überpipettiert. Nach 15 min Inkubation bei RT im Dunkeln wird die Probe mit 1,5 ml kalter Dulbeccos PBS abgestoppt und anschließend am Durchflusszytometer FACS-Calibur (Fa. Becton Dickinson) unter Verwendung der Software CELLQuest Version 3.1 vermessen. Als Geräteeinstellungen werden verwendet: *forward scatter* E00, *sideward scatter* 337 V, Fluoreszenzkanal 1 850 V. Alle 3 Parameter werden logarithmisch aufgetragen. Die Thrombozytenpopulation wird anhand ihrer Streu-Charakteristik identifiziert. Bei niedriger Flussrate werden 15.000 Ereignisse auf ihre Fluoreszenzintensität hin analysiert. Eine Präaktivierung der Thrombozyten im Rahmen der Präparation der WP wird bei jedem Probanden durch Vergleich einer nicht aktivierten Probe, die mit anti-CD62p-FITC Maus IgG1 κ inkubiert wird, und einer nicht aktivierten Kontrollprobe, die mit einem Maus IgG1 κ unbekannter Spezifität (Fa. BD Pharmingen) inkubiert wird, das keine Oberflächenantigene von Thrombozyten bindet, überwacht. Bei deutlicher Präaktivierung werden die Messergebnisse dieser Reihe verworfen.

B.2. Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion

Dulbeccos PBS, pH 7,4:

0,20 g/L KCl, 0,20 g/L KH_2PO_4 , 8,00 g/L NaCl, 1,15 g/L NaHPO_4

B.2.7 Thromboxan A2 Synthase Aktivität

Der Assay macht sich zunutze, dass das Cytochrom P450 Enzym Thromboxan A2 Synthase die Reaktion von Prostaglandin H2 zu Thromboxan A2 (TxA2), Malondialdehyd (MDA) und 12-OH-Heptadecatriensäure (HHT) katalysiert, die im Verhältnis 1:1:1 entstehen⁶⁴. Nach der Reaktion von MDA mit Thiobarbitursäure kann das entstehende Produkt quantitativ fluorimetrisch bestimmt werden⁹³.

700 μl aktivierte WP werden mit 400 μl 20% (w/v) TCA in 0,6 M HCl abgestoppt, für 10 min auf Eis gestellt und für 10 min bei 14.000 rpm (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert. 600 μl Überstand werden folgend mit 600 μl 0,53% (w/v) Thiobarbitursäurelösung in Phosphatpuffer für 30 min bei 70 °C und anschließend für 30 min bei RT inkubiert. 700 μl Probe wird schließlich bei einer Anregungswellenlänge von λ 533 nm und einer Emissionswellenlänge von λ 550 nm vermessen. Zur Erstellung einer Kalibrationskurve werden Lösungen bekannter Konzentration des Malondialdehydderivates 1,1,2,2-Tetraethoxypropan verwendet, mit denen wie mit den Proben verfahren wird.

Thiobarbitursäurelösung in Phosphatpuffer, pH 7,4:

10 mM KH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , 0,53% (w/v) Thiobarbitursäure

B.2.8 Thromboxan B2 Sekretion

Zur Bestimmung der Thromboxan B2 (TxB2) Sekretion wird ein kompetitiver EIA der Fa. Biotrend gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Weil das Thrombozyten stimulierende TxA2 nur eine Halbwertszeit von 37 s hat, wird die TxA2 Produktion durch Messung seines stabilen nicht-enzymatischen Hydrierungsproduktes TxB2 bestimmt. 500 μl aktivierte WP werden mit 2,5 μl 2 N HCl versetzt, *gevortext* und sofort in einem Ethanol-Trockeneis-Gemisch für 10 min schockgefroren. Die aufgetauten Proben werden dann für 10 min bei 4 °C bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5415 C) und der Überstand in der SpeedVac bei RT eingetrocknet. Die Proben werden bei -80 °C gelagert und kurz vor der Messung mittels EIA in 400 μl 50 mM Natriumacetatpuffer mit pH 5,8 aufgenommen.

B. Material & Methoden

B.2.9 ATP Sekretion

Die ATP Sekretion wird bestimmt mit dem Chrono-Log Vollblut Lumi-Aggregometer (Fa. Chrono-Log)^{38,82} entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Gemessen wird die Lumineszenzzunahme aufgrund der Reaktion von sezerniertem ATP mit einem Luciferin-Luciferase Reagenz (Chrono-lume[®], Fa. Chrono-Log). Die durch einen Fotoverstärker registrierte Lumineszenz ist proportional zur sezernierten Menge an ATP. Die Spannung wird als Funktion der Zeit aufgetragen. 450 μ l Vollblut werden mit 450 μ l 0,9 % (w/v) NaCl bei 37 °C bei einer Rührfrequenz von 900 rpm in einer Plastikkuvette in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wird die Probe für 3 min mit 100 μ l des Chrono-Lume[®] Reagenz inkubiert und danach im Messkanal mit entsprechenden Agonisten aktiviert. Als Referenzprobe wird zu einer Probe des jeweiligen Probanden statt eines Agonisten 2 nmol ATP dazu pipettiert.

B.2.10 PFA-100

Der PFA 100 (*platelet function analyser*) der Fa. Dade Behring ist ein in-vitro Testsystem zur Ermittlung von Thrombozytendysfunktionen unter Scherstressbedingungen angelehnt an das Verfahren von Kratzer⁸⁹. Das Gerät simuliert die Abläufe in einem verletzten Blutgefäß durch Verwendung von Einmalpatronen, die eine perforierte Kollagen/Epinephrin oder Kollagen/ADP beschichtete Membran enthalten, durch die das zu testende Vollblut angesaugt wird. Gemessen wird die Okklusionszeit, die benötigt wird bis die Perforation vollständig durch Thrombusbildung verschlossen wird. Das Verfahren, von dem gezeigt werden konnte, dass es in der Lage ist, eine ASS induzierte Hemmung auf Thrombozyten nachzuweisen⁹⁷, wird nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Das verwendete Blut wird mit Sarstedt Zitrat Monovetten (blau, \triangleright **Kap. B.2.1, S. 27**) abgenommen.

B.2.11 VASP Phosphorylierung

► Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Phospho-VASP Gehaltes von Thrombozyten wurde durchgeführt durch Adaptation des Verfahrens nach Schwarz¹²⁸. Hierzu wird der FITC (*fluorescein isothiocyanate*) markierte phosphospezifische Antikörper 16C2-FITC verwendet (Fa. Nanotools)¹³², der nur VASP erkennt, das am Serin an Position 239 phosphoryliert ist.

In Abwandlung der Methode nach Schwarz wird 100 μ l zitriertes Vollblut mit Ilo-

B.2. Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion

prost (Endkonzentration 200 nM), einem stabilen Prostaglandin E1 Analog, das eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase induziert, gleichzeitig mit oder ohne einen Thrombozyten aktivierenden Agonisten für 1 min inkubiert. Zur Kontrolle werden weitere Vollblut-Proben jeweils mit den einzelnen Agonisten ohne zusätzliches Iloprost für 1 min inkubiert. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 50 μ l 10% Methanol-freiem Formaldehyd gestoppt und die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Proben mit 125 μ l 0,4% Triton X-100 in PBS verdünnt. Nach Permeabilisierung für 10 min wird 5 ml PBS zu jeder Probe hinzugefügt und 200 μ l Ansatz in ein FACS Röhrchen überführt. Die Plättchen werden mit dem Antikörper 16C2-FITC bei einer Konzentration von 1,25 μ g/ml für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert, mit 800 μ l PBS verdünnt und anschließend vermessen. Die Messungen werden durchgeführt auf dem Durchflusszytometer FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson) unter Verwendung der Software CELLQuest 3.1. Als Geräteeinstellungen werden verwendet: *forward scatter* E00, *sideward scatter* 337 V, Fluoreszenzkanal 1 850 V. Alle 3 Parameter werden logarithmisch aufgetragen. Die Thrombozytenpopulation wird anhand ihrer Streu-Charakteristik identifiziert. Bei niedriger Flussrate werden 15.000 Ereignisse auf ihre Fluoreszenzintensität hin analysiert.

► Phospho-VASP DELFIA

Mit dem Phospho-VASP DELFIA der Firma Vasopharm (bisher nicht veröffentlicht) kann fluorimetrisch quantitativ die Phosphorylierung des Proteins VASP am Serin 239 bestimmt werden. Die Detektion von Gesamt-VASP und Phospho-VASP erfolgt mittels des Antikörper IE273 (Fa. Immunoglobine)¹, der VASP unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus erkennt, bzw. 16C2 (Fa. Nanotools)¹³², der spezifisch Ser-239 phosphoryliertes VASP erkennt. Diese Primärantikörper werden über einen polyklonalen Europium markierten Ziege anti-Maus Antikörper (Fa. Perkin Elmer) durch Nutzung des DELFIA Systems nachgewiesen. Der DELFIA (*dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay*) beruht darauf, dass nach Zugabe der sogenannten DELFIA *Enhancement Solution* (Fa. Perkin Elmer) das Lanthanoid Eu^{3+} bei niedrigem pH vom Europium markierten Antikörper dissoziiert und in Gegenwart von Chelatoren fluoreszierende Chelatkomplexe bildet.

96-well Mikrotiterplatten (Protein-Immobilizer Plates transparent, Fa. Exiqon) werden mit GST-Zyxin, das VASP bindet, durch Zugabe von 100 μ l GST-Zyxin-Lösung (5

B. Material & Methoden

$\mu\text{g/ml}$ in PBS) und Inkubation für 3 h bei ständigem Schütteln beschichtet. Anschließend werden die Platten $4\times$ mit PBS-T gewaschen. Die Vollblutproben werden nach Stimulation im Verhältnis 1:1 mit Lysepuffer gemischt und pro *well* $100\ \mu\text{l}$ Lösung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, wobei alle Werte dreifach bestimmt werden. Als Leerwert wird $100\ \mu\text{l}$ PPP aufgetragen. Nach 1 h unter ständigem Schütteln wird die Platte $4\times$ mit PBS-T gewaschen. Jetzt erfolgt die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper, IE273 ($0,1\ \mu\text{g/well}$) bzw. 16C2 ($0,5\ \mu\text{g/well}$), für 1 h auf dem Schüttler. Nach $3\times$ waschen mit der DELFIA *Wash Solution* (Fa. Perkin Elmer) wird die Inkubation mit dem Europium markierten Zweitantikörper ($2,5\ \text{ng/well}$) analog ausgeführt und die Mikrotiterplatte wieder $3\times$ mit DELFIA *Wash Solution* gewaschen. Anschließend wird zu jedem *well* $100\ \mu\text{l}$ DELFIA *Enhancement Solution* pipettiert. Nach 15 min erfolgt die Messung der Fluoreszenz am Fluorimeter Victor2 1420 Multilabel Counter (Fa. PerkinElmer Wallac) unter Nutzung des Softwareprotokolls PD Europium VLO.

Lysepuffer:

40 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM EGTA, 2% (w/v) Desoxycholat, 2% (w/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Na-Pyrophosphat, 1 Tablette/5 ml Lysepuffer Complete EDTA free (Fa. Roche)

PBS, pH 7,4:

13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,81 mM Na_2HPO_4 , 0,174 mM NaH_2PO_4

PBS-T:

0,05% (w/v) Tween 20 in PBS, pH 7,4

► Phospho-VASP POD-EIA

Bei dem Phospho-VASP POD-EIA handelt es sich um ein neu entwickeltes kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Phosphorylierung von VASP an Serin 239. Wie schon beim Phospho-VASP DELFIA erfolgt die Detektion von Gesamt-VASP und Phospho-VASP mittels der Antikörper IE273 (Fa. Immunoglobine)¹ bzw. 16C2 (Fa. Nanotools)¹³². Die Erstantikörper werden in einem zweiten Schritt durch einen Peroxidase konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper (Fa. Chemicon) gebunden. Der Zweitantikörper wird nachgewiesen durch enzymatischen Umsatz des Substrates ABTS (2,2'-Azinodi-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)]-diammonium Salz) (Fa. Roche) durch die Peroxida-

B.2. Methoden zur Evaluation humaner Thrombozytenfunktion

se, bei dem ein Chromogen entsteht.

Einschließlich der Inkubation mit den Primärantikörpern entspricht das Vorgehen dem des Phospho-VASP DELFIA. Anschließend wird die Mikrotiterplatte $3 \times$ mit PBS-T gewaschen und nachfolgend je $100 \mu\text{l}$ POD konjugierter Antikörper (Verdünnung 1:2000 in PBS) in jedes well pipettiert. Nach 1 h Inkubation auf dem Schüttler wird die Platte $3 \times$ mit PBS-T gewaschen und $100 \mu\text{l}$ ABTS-Lösung in jedes well pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgt nach 5 min und 20 min am Victor2 1420 Multilabel Counter (Fa. Wallac) bei λ 405 nm.

ABTS Lösung:

1 ABTS-Tablette (Fa. Roche) / 50 ml ABTS-Puffer (Fa. Roche) (1:100 verdünnt in Aq. dest.)

► Evaluation des PRI-Wertes

Die Hemmung von Plättchen durch Clopidogrel, gemessen anhand der VASP-Phosphorylierung, wird als PRI-Wert (*platelet reactivity index*) formuliert. Die Berechnung für den FACS-Assay unterscheidet sich leicht von der für den EIA. Für den FACS-Assay wurde der PRI_{FACS} anhand der MFI-Werte (*mean fluorescence intensity*) der mit Prostglandin E_1 (PGE_1) bzw. Prostglandin I_2 (PGI_2) behandelten Plättchen (gemessen mit 16C2-FITC) in Abwesenheit ($\text{MFI}_{(\text{PGE}_1)}$) oder Anwesenheit von ADP ($\text{MFI}_{(\text{PGE}_1 + \text{ADP})}$) berechnet (s. Gleichung B.1)^{7,56}.

$$\text{PRI}_{\text{FACS}} = \frac{\text{MFI}_{(\text{PGE}_1)} - \text{MFI}_{(\text{PGE}_1 + \text{ADP})}}{\text{MFI}_{(\text{PGE}_1)}} \quad (\text{B.1})$$

Für den EIA wird der PRI_{EIA} anhand des Verhältnisses berechnet, das sich nach Behandlung der Plättchen mit PGE_1 (bzw. PGI_2) aus den Signalen ergibt, die über die Antikörper IE273 (Gesamt-VASP, $A_{405(\text{VASP})}$), der VASP unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus erkennt, und 16C2 ($A_{405(\text{pVASP})}$), der an Position Ser-239 phosphoryliertes VASP erkennt, detektiert werden. Dies geschieht in Abwesenheit ($R_{(\text{PGE}_1)}$, Gleichung B.2) oder Anwesenheit von ADP ($R_{(\text{PGE}_1 + \text{ADP})}$, Gleichung B.3). $R_{(\text{PGE}_1)}$ gibt das relative Ausmaß der VASP-Phosphorylierung durch die cAK an. $R_{(\text{PGE}_1 + \text{ADP})}$ repräsentiert das relative Ausmaß der VASP-Phosphorylierung nach cAK-Inhibition durch ADP. Falls der ADP-Rezeptor vollständig blockiert, ist entspricht $R_{(\text{PGE}_1 + \text{ADP})}$ nahezu $R_{(\text{PGE}_1)}$. Der PRI_{EIA}

B. Material & Methoden

spiegelt das relative Ausmaß der VASP-Dephosphorylierung wider, das auf die Stimulation der Plättchen mit ADP zurückzuführen ist. Daher ist er ein Maß für das Ansprechen von Plättchen auf ADP (Gleichung B.4).

$$R_{(PGE_1)} = \frac{A_{405}(pVASP, PGE_1)}{A_{405}(VASP, PGE_1)} \quad (B.2)$$

$$R_{(PGE_1+ADP)} = \frac{A_{405}(pVASP, PGE_1+ADP)}{A_{405}(VASP, PGE_1+ADP)} \quad (B.3)$$

$$PRI_{EIA} = \frac{R_{(PGE_1)} - R_{(PGE_1+ADP)}}{R_{(PGE_1)}} \quad (B.4)$$

Falls der P2Y₁₂-ADP-Rezeptor durch Clopidogrel gehemmt wird, kann ADP zu keiner Abnahme der VASP-Phosphorylierung mehr führen und der PRI konvergiert gegen 0. Falls aber die Behandlung mit Clopidogrel ineffektiv ist (*low responder*), verursacht ADP eine VASP-Dephosphorylierung und der PRI erreicht Werte von $\gtrsim 0,5$.

B.2.12 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Zur Bestimmung der cAMP Konzentration in Thrombozyten wird der kompetitive Radioimmunoassay Biotrak für cAMP-¹²⁵J der Fa. Amersham Pharmacia Biotech eingesetzt.

Es werden 300 μ l PRP im Verhältnis 1:100 stimuliert und anschließend 10 s lang bei 10.000 rpm (Eppendorf 5415 C) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 μ l 70% (v/v) Ethanol resuspendiert. Nach 30 minütiger Lagerung auf Eis werden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Cap überführt. Anschließend wird das Pellet in 300 μ l 70% (v/v) Ethanol aufgenommen und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird zum Überstand des vorherigen Schrittes pipettiert und die gesamte Lösung bei RT in der SpeedVac vakuumgetrocknet. Das resultierende Pellet wird in 500 μ l 50 mM Natriumacetatpuffer mit pH 5,8 gelöst⁴⁶. Der Gehalt an cAMP der Proben wird nun mit dem kompetitiven Radioimmunoassay Biotrak für cAMP-¹²⁵J der Fa. Amersham Pharmacia Biotech gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Die radioaktive Emission wird in einem γ -Counter (Berthold LB 2104) gemessen.

B.3 Methoden zur Evaluation muriner Thrombozytenfunktion

B.3.1 VASP -/- Mäuse

Bei den hier verwendeten VASP -/- Mäusen handelt es sich um die F5-Generation der von Hauser et al. ursprünglich hergestellten und beschriebenen VASP -/- Mäuse⁶³, die anschließend auf einen C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt wurden.

B.3.2 Isolierung muriner Thrombozyten

Alle Präparationen werden mit frisch entnommenem venösen Vollblut von Mäusen vorgenommen. Die Mäuse werden mit Ether narkotisiert. Ihnen wird mit ca. 3 cm langen heparinisierten Kapillaren (Fa. Hartenstein) 700 μ l Blut retroorbital entnommen. Die Koagulation wird verhindert durch 300 μ l Heparin/TBS-Puffer. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm (Eppendorf 5415 C) wird das PRP und ca. 1 mm der unteren Erythrozytenphase abgenommen und in ein neues Cap überführt. Nach nochmaliger Zentrifugation für 8 min bei 1000 rpm wird das PRP möglichst ohne Erythrozyten in ein neues Cap pipettiert. Um die Thrombozyten zu waschen wird 1 μ M Prostacyclinlösung (Ilomedin[®], PgI₂) im Verhältnis 1:200 dem PRP zugefügt und für 5 min bei 2800 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren wird das Pellet im ursprünglichen Volumen des PRP in Tyrodes Puffer resuspendiert und der Zellsuspension 10 U/ml Apyraselösung im Verhältnis 1:50 und 1 μ M Prostacyclinlösung im Verhältnis 1:200 zugefügt. Anschließend wird die Zellsuspension für 5 min bei 2800 rpm zentrifugiert, das Pellet im ursprünglichen Volumen des PRP in Tyrodes Puffer resuspendiert und 10 U/ml Apyraselösung im Verhältnis 1:50 hinzugefügt. Die WP werden nun für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der für jeden Versuch spezifischen Verdünnung der WP in Tyrodes Puffer, wird kurz vor der Stimulation Ca²⁺ zugegeben, wobei die Kalzium-Endkonzentration 1 mM betragen soll.

Heparin/TBS-Puffer, pH 7,3:

3,16 g/L Tris-Cl, 9 g/L NaCl, 20.000 IE/L Heparin

Tyrodes Puffer (modifiziert), pH 7,0:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,36 mM Na₂HPO₄, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose, 0,36% (w/v) BSA

B. Material & Methoden

B.3.3 p-Selektin (CD62p) Expression und GP IIb/IIIa Aktivierung

Die p-Selektin Expression auf der Zelloberfläche von Thrombozyten und die Aktivierung des GP IIb/IIIa werden simultan durchflusszytometrisch bestimmt. Das Verfahren wurde neu etabliert in Anlehnung an das Protokoll von Nieswandt¹¹¹. CD62p wird durch den FITC (Fluorescein-isothiocyanat) markierten Antikörper Wug.E6 und die Aktivierung des GP IIb/IIIa durch den PE (Phycoerythrin) markierten Antikörper JON/A (beide Antikörper zur Verfügung gestellt von B. Nieswandt, Fa. Emfret)¹¹ detektiert.

Für diesen Versuch werden die WP vor Stimulation 20-fach in Tyrodes Puffer verdünnt. Für jede Probe werden je 10 μ l beider Antikörper in ein FACS-tube und 50 μ l WP vorgelegt. Nach Stimulation werden die Proben 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 500 μ l kalter Dulbeccos PBS abgestoppt und direkt am Durchflusszytometer FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson) unter Verwendung der Software CELLQuest Version 3.1 vermessen. Als Geräteeinstellungen werden verwendet: *forward scatter* E01, *sideward scatter* 380 V, Fluoreszenzkanal 1 650 V, Fluoreszenzkanal 2 580 V, Kompensation FL1 -2,4% FL2, Kompensation FL2 -7,0% FL1. Alle 4 Parameter werden logarithmisch aufgetragen. Die Thrombozytenpopulation wird anhand ihrer Streu-Charakteristik identifiziert. Bei niedriger Flussrate werden 15.000 Ereignisse auf ihre Fluoreszenzintensität hin analysiert.

Dulbeccos PBS, pH 7,4:

0,20 g/L KCl, 0,20 g/L KH₂PO₄, 8,00 g/L NaCl, 1,15 g/L NaHPO₄

B.3.4 Serotonin Sekretion mit 3H-Serotonin

Radioaktiv markiertes Serotonin liegt, nachdem es von den Thrombozyten aufgenommen wurde, nach kurzer Zeit im Gleichgewicht mit endogenem Serotonin vor und verhält sich funktionell wie dieses⁷⁵. Das Verhältnis von sezerniertem Serotonin zu gesamtem intrazellulären Serotonin nach Aktivierung der Thrombozyten wird durch die Inkubation mit bzw. Aufnahme von radioaktivem Serotonin nicht verändert. Das Verfahren zur Messung der Serotoninsekretion wurde in Anlehnung an das Protokoll von Gerrard⁴⁸ neu im Labor etabliert.

Die ersten Schritte der Plättchenpräparation erfolgen wie in Kapitel \triangleright **B.3.2 (S. 37)** beschrieben. Nach erstmaliger Resuspension des Pellets und Zugabe von Apyrase und

B.3. Methoden zur Evaluation muriner Thrombozytenfunktion

Prostacyclinlösung werden 500 μl in Tyrodes Puffer resuspendierter Thrombozyten zunächst 45 min lang bei 37 °C mit 2 μCi ^3H -Serotonin inkubiert. Anschließend folgen die weiteren Schritte zur Präparation von WP, wobei die Zellsuspension am Ende 8-fach in Tyrodes Puffer verdünnt wird. Nach Zusatz von Ca^{2+} wird vor Stimulation zu 400 μl Probe 4 μl 400 μM Fluoxetin gegeben. Hierbei handelt es sich um einen selektiven Serotonin-Wiederaufnahme Inhibitor (SSRI). Die Serotonin-Wiederaufnahme muss unmittelbar vor der Stimulation erfolgen, weil die Blockade eine langsame Serotoninfreigabe verursacht⁷². Zur Bestimmung des gesamten intrazellulären Serotonins wird statt eines Agonisten 8 μl 10% (w/v) Triton X-100 zu 400 μl Probe pipettiert und die Suspension kurz *gevortext*. 5 min nach Aktivierung werden den Proben 80 μl eiskaltes 0,05 M EDTA enthaltendes 0,633 M Formaldehyd zugesetzt und die Proben für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf 5415 C) für 2 min wird je 450 μl Überstand in ein mit 5 ml Emulsifier-Safe (Fa. Packard) gefülltes 20 ml Polyethylenfläschchen (Fa. Packard) überführt und die β -Strahlung im Flüssigkeitsszintillationszähler 1900CA TRI-CARB (Fa. Packard) bestimmt.

B.3.5 Sekretion lysosomaler Glykosidasen

Das fluorimetrische Verfahren zur Messung der Sekretion lysosomaler Glykosidasen, wurde von Holmsen und Dangelmaier⁷³ adaptiert und im Rahmen der Doktorarbeit neu im Labor etabliert. Glykosidasen hydrolysieren 4-Methylumbelliferonglykoside, wobei 4-Methylumbelliferon entsteht. Dieses fluoresziert bei λ 450 nm nach Anregung bei λ 365 nm. In diesem Versuch wird die Sekretion von beta-Hexosaminidase bestimmt.

Die WP werden nach der Präparation 2-fach in modifiziertem Tyrodes Puffer verdünnt. 70 μl aktivierte WP werden in eine Mischung aus 7 μl EDTA (50 mM, pH 7,4) und 50 μl Silikonöl überpipettiert, für 15 sec *gevortext* und für 30 sec bei 14.000 rpm (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert. Zur Bestimmung der gesamten intrazellulären beta-Hexosaminidasen wird mit einer unstimulierten Probe analog verfahren, wobei auf die Zentrifugation verzichtet wird. Nach Abkühlen der Proben auf Eis, wird 50 μl der oberen Phase in ein neues Cap überführt und mit 1 μl 5% (w/v) Triton X-100 versetzt. Jede Probe wird für 6 min bei 37 °C mit 75 μl Methylumbelliferylglucosamid-Lösung inkubiert und anschließend mit 1 ml 0,2 M Glycin-NaOH, pH 10,7, abgestoppt. Die Fluoreszenz wird bei λ 450 nm auf dem Fluorimeter Victor2 1420 Multilabel Counter (Fa. PerkinElmer Wallac) bei einer Anregungswellenlänge von λ 365 nm gemessen. Eine Standardreihe

B. Material & Methoden

kann mit 4-Methylumbelliferon-Lösungen unterschiedlicher Konzentration erstellt werden. Mit diesen muss wie mit den Proben verfahren werden.

Methylumbelliferylglucosamid-Lösung, pH 4,0:

100 mM NaHPO₄, 7 mM Zitrat, > 2,5 mM Methylumbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosamid (gesättigte Lösung)

B.3.6 **Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen**

Die Methode zur Messung der Thrombozytenadhäsion und der Thrombusbildung auf einem mit fibrillären Kollagen beschichteten Objektträger unter Flussbedingungen wurde erstmals beschrieben von Heemskerk et al.⁶⁵. Das Verfahren simuliert in vitro die Bedingungen eines Endotheldefektes, bei dem die subendotheliale Matrix exponiert wird. Die Messungen erfolgten im Labor von Bernhard Nieswandt (Rudolf Virchow Zentrum, Universität Würzburg).

Murines Vollblut (1 Vol.), das wie unter ▷ **Kap. B.3.2 (S. 37)** beschrieben entnommen wird, wird mit modifiziertem Tyrodes Puffer (0,5 Vol.) gemischt. Für einige Experimente wurden die Blutproben bei RT mit dem gegen GPVI gerichteten monoklonalen Antikörper JAQ1 (70 µg/ml) für 5 min oder mit 100 µM Iloprost bzw. 100 µM SNP für 1 min vorinkubiert. Unmittelbar vor Messung wird den Proben 1 mM Ca²⁺ und 1 mM Mg²⁺ zugefügt. Rechteckige Objektträger (24 mm × 60 mm) werden mit 100–150 µl 500 µg/ml Horm[®] Kollagen-Lösung (Fa. Nycomed) überschichtet und bei 37 °C für 1 h getrocknet. Anschließend wird die Oberfläche des Objektträgers mit 1% BSA enthaltendem modifiziertem Tyrodes Puffer geblockt, um unbeschichtete Bereiche mit BSA abzuschirmen. Die Perfusion wird durchgeführt wie von Briedé beschrieben¹⁵. Ein beschichteter Objektträger wird an eine transparente, rechtwinklige Flusskammer mit einer Tiefe von 50 µm angebracht und mit modifiziertem Tyrodes Puffer vorgespült. Daraufhin wird eine mit der Blutprobe gefüllte Spritze über einen Schlauch mit der Flusskammer verbunden. Gegebenenfalls wird eine zweite Spritze, die einen Thrombozyten aktivierenden Agonisten enthält, mit dem Schlauchsystem verbunden, so dass die Blutprobe direkt vor Eintritt in die Flusskammer im Verhältnis 1:1 mit dem den Agonisten enthaltenden modifizierten Tyrodes Puffer gemischt werden kann. Die Perfusion wird durchgeführt für 7 min unter Nutzung der pulsfreien Pumpe 100i Syringe Pump (Fa. WPI) unter „hohen“

B.4. Molekularbiologische Methoden

Scherstressbedingungen (7,53 ml/h, äquivalent zu einer Scherrate von 1000 s^{-1}). Während der Perfusion werden mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Fa. Zeiss) bei $63\times$ Vergrößerung (Objektiv $63\times$ Achroplan, Fa. Zeiss) mit der CCD-Kamera (*charged coupled device*) Flashbus CVM300 (Fa. Visitron) Phasenkontrastbilder (Phasenkontrast Stufe 1) in Echtzeit aufgenommen¹¹⁰. Die Aufnahme erfolgt mit der Software Metavue Version 5.0r6. Danach wird die Kammer für weitere 4 min mit modifiziertem Tyrodes Puffer unter gleichen Scherstressbedingungen gespült, um nicht adhärenzte Zellen zu entfernen. Es werden nun mind. 5 Phasenkontrastbilder von unterschiedlichen Gesichtsfeldern bei $63\times$ Vergrößerung aufgenommen.

Die Bildanalyse wird durchgeführt mit der Software Metamorph Version 4.6. Die Auswertung erfolgt durch die Berechnung der prozentualen Oberflächenbedeckung durch Thromben und der Auszählung der Einzelzelladhäsionen. Hierbei werden Aggregate >3 Thrombozyten als Thrombus definiert. Durch Vergleich mit den Echtzeitaufnahmen, die während der Perfusion aufgenommen werden, lässt sich zusätzlich ein Eindruck von der Festigkeit der Thrombozytenadhäsion bzw. Thrombusformation auf der Kollagenoberfläche gewinnen.

B.4 Molekularbiologische Methoden

B.4.1 RNA Isolierung aus humanen Thrombozyten mittels TRIzol

Die Isolierung von RNA aus Thrombozyten gelingt mit dem Phenol haltigen Reagenz TRIzol (Fa. Gibco Life Technologies) in einem Schritt¹⁴⁰.

Ein mehrfach gewaschenes Thrombozytenpellet, präpariert aus 80 ml Vollblut (\triangleright **Kap. B.2.1, S. 27**), wird mit 7,5 ml TRIzol resuspendiert und *gevortext*. Nach Zusatz von 2 ml Chloroform wird das Gemisch wieder *gevortext*, in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt, 2,5 min bei RT stehen gelassen und für 15 min bei 4°C und 10.000 rpm (Sorvall RC5B, Rotor SS-34) zentrifugiert. Im Anschluss wird die obere farblose RNA-enhaltende Phase abgenommen und die RNA mit 3,75 ml Isopropanol präzipitiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wird die RNA für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C pelletiert. Nach Dekantierung wird das RNA Pellet mit 4 ml 80% (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 10.000 rpm). Folgend wird das Pellet bei RT für ca. 1 h getrocknet bis es transparent erscheint und in $100 \mu\text{l}$ RNase freiem H_2O resuspendiert. Um die Reinheit der RNA zu

B. Material & Methoden

überprüfen, wird der Quotient der Absorptionwerte $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ bestimmt, der zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte. Die Integrität der RNA kann im Agarosegel nach Ethidiumbromid Färbung kontrolliert werden. Bei humaner RNA sollte die 18S ribosomale RNA als klar konturierte Bande bei 1,9 kb und die 28S ribosomale RNA bei 5,0 kb erscheinen. Die RNA wird bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

B.4.2 Reverse Transkription mit dem OneStep RT-PCR Kit

Die Reverse Transkription und anschließende PCR Amplifikation der kodierenden Sequenz von CAP1 wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit (Fa. Qiagen) vorgenommen. Der Versuch wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die CAP1-spezifischen Primer, die unter \triangleright **Kap. B.1.3 (S. 19)** aufgelistet sind, wurden in einer Endkonzentration von $0,6\text{ }\mu\text{M}$ eingesetzt. Das PCR Produkt wurde nachfolgend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt.

B.4.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR wurde von Saiki et al.¹²² beschrieben. Die Reaktionsbedingungen der Polymerasen werden den Gebrauchsanleitungen entnommen. Die $10\times$ -Amplifikationspuffer werden vom jeweiligen Hersteller bezogen.

Ein Standardreaktionsansatz enthält:

PCR-Standardreaktionsansatz:

10 μl $10\times$ -Amplifikationspuffer, 200–250 μM dNTP-Mix, 1 μM
Oligonukleotid-Primer 1, 1 μM Oligonukleotid-Primer 2, 50–100 ng
DNA template, 2,5 U Tag-Polymerase oder Pfu-Polymerase

ad 100 μl ddH₂O

Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3–5 min wird folgendes Standardprogramm durchlaufen:

PCR-Standardprogramm (20–30 Zyklen):

1 min Denaturierung, 95 °C

1 min Annealing, 50–60 °C

1–2 min Extension, 72 °C

Danach folgt ein finaler Syntheseschritt bei 72 °C für 3–5 min. Durch Agarosegel-Elektrophorese wird das Reaktionsprodukt überprüft. Als DNA templates wurden Plasmid-DNA, PCR-Produkte oder cDNA verwendet.

B.4.4 **Horizontale Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

DNA Fragmente werden für analytische oder präparative Zwecke mittels horizontaler Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt¹²³. Entsprechend der Größe der DNA-Fragmente wird die Agarosekonzentration der Gele zwischen 0,5% (w/v) und 2% (w/v) variiert. Die Agarose wird in 1×-TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, 0,5–1 µg/ml des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zugesetzt und die Lösung luftblasenfrei in die horizontale mit einem Kamm ausgestattete Elektrophoresekammer (Fa. BioRad) gegossen. Ein Größenstandard (Fa. MBI Fermentas) und die Proben werden nach Zugabe von 6×-Loading Buffer (Fa. MBI Fermentas) in die slots gefüllt. Als Laufpuffer dient 1×-TAE-Puffer. Die Auftrennung erfolgt in Abhängigkeit der DNA-Fragmentlänge bei 40–150 V (3–6 V/cm). Die Banden werden visualisiert durch Anregung des auf dem Ultraviolettisch TFX-35M (Fa. Life Technologies) (λ 312 nm) orange fluoreszierenden Ethidiumbromids. Fotos werden mit der CCD Video Kamera XC-ST70 (Fa. Intas) und der Software Fast Capture Version 2.2.0 aufgenommen.

50×-TAE:

2,0 M Tris, 57,1% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA

B.4.5 **Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Abtrennung des PCR-Amplifikationsproduktes von den dNTPs, Oligonukleotiden und der Polymerase, die im Ansatz enthalten sind, erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wird von der Säulenmembran mit 50 µl ddH₂O eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wird die Säule mit dem

B. Material & Methoden

Elutionsmittel für 1 min vor der Zenrifugation inkubiert und das Eluat fallweise erneut geladen.

B.4.6 **Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente, die durch horizontale Gel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, werden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dafür wird zunächst das jeweilige Fragment nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten und das Standardprotokoll durchgeführt. Die DNA wird von der Säulenmembran mit 50 μl ddH₂O eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wird die Säule mit dem Elutionsmittel für 1 min vor der Zenrifugation inkubiert und das Eluat fallweise erneut geladen.

B.4.7 **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird durch Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer (Fa. Perkin Elmer) bei λ 260 nm Wellenlänge bestimmt. Hierbei gilt folgende Formel: $Konzentration \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = OD_{260\text{nm}} \times V \times F$, wobei V der Verdünnungsfaktor ist und F bei dsDNA dem Wert 50, bei RNA 40, bei ssDNA 33 und bei Oligonukleotiden 20 entspricht.

B.4.8 **Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktion von DNA werden der vom Hersteller des Restriktionsenzym mitgelieferte 10 \times Puffer und gegebenenfalls BSA verwendet. Für analytische Spaltungen wird 0,5–5 μg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μl verdaut. Für 1 μg DNA wird 5–10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz wird für 1,5–2 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert. Für präparative Spaltungen wird als Gesamtvolumen 50 μl gewählt und die eingesetzten Mengen an DNA und Restriktionsenzym entsprechend angepasst. Analytische Ansätze werden anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt. Aus präparativen Ansätzen werden nach Zugabe von 50 μl ddH₂O die DNA-Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt.

B.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wird der vom Hersteller mitgelieferte Ligationspuffer, der das benötigte ATP enthält, eingesetzt. Die Ligation erfolgt in nachstehendem Ansatz:

Ligationsansatz:

2 μ l 10 \times Ligationspuffer, 20–40 U T4 DNA-Ligase, 50 ng Plasmid-DNA, 250–1000 ng Insert-DNA

ad 20 μ l ddH₂O

Der Ansatz wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

B.4.10 Identifikation der Plasmide mit Insert

Nach der Ligation eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid muss anschließend die Insertion überprüft werden. Dies geschieht entweder durch analytische Spaltung oder durch eine PCR direkt aus der Bakterienkultur. Falls notwendig kann durch beide Verfahren auch die Orientierung des DNA-Fragmentes im Plasmid ermittelt werden.

Für die PCR wird folgender Ansatz verwendet:

PCR-Ansatz:

1 μ l Bakterienkultur, 100 ng Oligonukleotid-Primer 1, 100 ng Oligonukleotid-Primer 2, 10 μ l Tag PCR Master Mix (Fa. Qiagen)

ad 20 μ l ddH₂O

Es wird folgendes PCR-Protokoll durchlaufen:

PCR-Programm (20–30 Zyklen):

1 min Denaturierung, 94 °C

1 min Annealing, 50 °C

1 min Extension, 72 °C

Bei positiven Klonen wird deren Plasmidpräparation angeschlossen.

B. Material & Methoden

B.4.11 Transformation kompetenter E. coli-Zellen

Die kompetenten Zellen wurden nach der Kalzium-Chlorid-Methode präpariert^{29,136}.

Zu 100 μl auf Eis aufgetauten, kompetenten E. coli wird $\approx 10 \mu\text{l}$ 0,1–0,5 ng/ μl Plasmid enthaltende Lösung gegeben und der Ansatz für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend werden die Bakterien einem Hitzeschock von 42 °C für genau 45 sec unterzogen und wieder für 2 min auf Eis gestellt. Zum Ansatz wird 1 ml LB-Medium pipettiert und die Suspension bei 37 °C für 45 bis 60 min geschüttelt. Anschließend werden die Zellen bei 13.000 rpm (Eppendorf 5415 C) für 1 min zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 μl abgenommen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Der Ansatz wird dann auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und die Platte bei 37 °C für 16 h im Brutschrank umgedreht inkubiert.

B.4.12 Aufbewahrung von E. coli-Stämmen als Glycerinkulturen

Eine Übernachtskultur des jeweiligen E. coli-Stammes wird im Verhältnis 1:1 mit sterilem 80% (v/v) Glycerin gemischt, 30 min bei RT inkubiert und bei -80 °C gelagert.

B.4.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Entsprechend der benötigten Menge an Plasmid-DNA erfolgt die Plasmid-Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (bis 50 μg), dem Qiagen Plasmid Midi Kit (bis 100 μg) oder dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (bis 500 μg) (alle Kits Fa. Qiagen). Die Präparation wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und als Elutionsmittel der DNA ddH₂O verwendet. Um die Ausbeute zu erhöhen wird im Falle des QIAprep Spin Miniprep Kit die Säule mit dem Elutionsmittel für 1 min vor der Zentrifugation inkubiert und das Eluat fallweise erneut geladen. Die Konzentration wird durch Messung der optischen Dichte bestimmt.

B.4.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Klone wurde von der Fa. MWG nach der Dideoxy-Methode¹²⁴ durchgeführt.

B.4.15 Einfügen von Punktmutationen durch Splice Overlap Extension

Durch *Splice Overlap Extension*⁷⁷ wurden teilweise putative Phosphorylierungsstellen von CAP1 durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in ▷ **Kap. B.1.3 (S. 19)** aufgeführt. Dem Verfahren liegt zugrunde, dass in einem ersten Schritt in zwei getrennten PCR-Reaktionen überlappende DNA-Fragmente hergestellt werden, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Im zweiten Schritt werden die PCR-Produkte zusammen als templates in einer weiteren PCR-Reaktion verwendet. Hierbei komplettieren sich die Fragmente gegenseitig und werden amplifiziert.

B.4.16 Einfügen von Punktmutationen mit dem Quiksite direct Mutagenesis Kit

Weitere putative Phosphorylierungsstellen von CAP1 wurden mit dem *Quiksite direct Mutagenesis Kit* (Fa. Stratagene) durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Der Versuch wird den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in ▷ **Kap. B.1.3 (S. 19)** aufgeführt.

B.5 Proteinbiochemische Methoden

B.5.1 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Lämmli

Es werden vertikale SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem 10% Trenngel und einem 4% Sammelgel bestehen.

B. Material & Methoden

SDS-Gel 10%, pH 8,9:

10% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,375 M Tris-Cl
→ zum Schluss: 0,05% Ammonium Persulfat (APS), 0,00375% (v/v) TEMED

Sammel-Gel 4%, pH 6,7:

4% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,0625 M Tris-Cl
→ zum Schluss: 0,05% Ammonium Persulfat (APS), 0,00375% (v/v) TEMED

Elektrophorese-Puffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Die Gel-Dicke beträgt 1 mm. Die Trenngele werden bis zur Polymerisation mit wasser-gesättigtem Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wird das Sammelgel aufge-gossen und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben werden mit $\frac{1}{2}$ Vol. 3×-SDS-Stopp versetzt und $2 \times$ für 5 min bei 95°C erhitzt und *gevortext*. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 75 Volt begonnen (Sammelgel), nach Übertritt der Proteine in das Trenngel wird die Spannung auf maximal 150 Volt erhöht.

3×-SDS-Stopp, pH 6,7:

200 mM Tris-Cl, 6% (w/v) SDS, 15% (w/v) Glycerin, 10% (w/v) 2-Mercaptoethanol, Bromphenolblau (Na-Salz)

B.5.2 Coomassie Blau-Färbung

Die Gele werden mit Coomassie Brilliant Blau mind. 15 min inkubiert. Anschließend wird mit Entfärbelösung der ungebundene Farbstoff ausgewaschen.

Coomassie Färbelösung:

10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,04% Coomassie Brilliant Blau R-250

Entfärbelösung:

10% (v/v) Isopropanol, 10 (v/v) Essigsäure

B.5.3 Western Blot

Das Gel wird luftblasenfrei auf eine gleichgroße Nitrozellulosemembran zwischen zwei in Transferpuffer vorgequollene Whatman-Papiere und zwei Kunststoff-Vliese gelegt und in eine mit auf 4°C vorgekühltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer gegeben. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulose erfolgt durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung von 60-80 V für 60 Minuten bei 4°C. Die Nitrozellulose zeigt hierbei zur Anode.

Transferpuffer, pH 8,3:

25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% Methanol

Zur Überprüfung der Transfereffizienz und zur Markierung des Molekulargewicht-Standards wird nach dem Transfer die Membran mit 0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure kurz angefärbt, durch Schwenken in deionisiertem Wasser der Hintergrund entfärbt und die Membran zur Dokumentation fotokopiert. Anschließend wird die Membran mit PBS vollständig entfärbt.

Unspezifische Bindungsstellen werden durch Inkubation im Blockmedium für 1 h bei RT abgesättigt. Die Nitrozellulose wird dann mit im Blockmedium verdünnten Antikörpern mind. 60 min unter ständigem Schwenken bei RT inkubiert und darauf folgend 5× mit PBS-TT für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgt durch einen an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und eine Chemilumineszenz-Reaktion. Die Lumineszenz, die bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation eines zyklischen Diazylhydrazids (Luminol) durch Wasserstoffperoxid entsteht, wird zum Nachweis des an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers genutzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT mit dem im Blockmedium verdünnten Sekundärantikörper (1:3000) und 5× Waschen in PBS-TT für je 5-10 Minuten wird die Nitrozellulose für 1 Minute mit Detektionsmix inkubiert, nach Abtropfen der Lösung in Overhead-Folie verpackt und sofort für einige Sekunden bis zu wenigen Minuten auf einem Film exponiert.

B. Material & Methoden

PBS-TT:

0,025% (v/v) Tween-20, 0,15% (v/v) Triton X-100 in PBS

Blockmedium:

4% (w/v) fettfreie Trockenmilch in PBS-TT

Detektionmix:

25% (v/v) ECL (enhanced chemoluminescence)-Reagenz 1 (Luminol),
25% (v/v) ECL-Reagenz 2 (enhancer), 50% (v/v) ddH₂O

B.5.4 **Trocknen von Gelen**

Um ein Polyacryamidgel haltbar zu machen, wird es beidseitig mit feuchter Zellophanfolie bedeckt und in einem Geltdrockner getrocknet. Vorher werden die Gele für min. 30 min in 3% (v/v) Glycerin-Lösung geschüttelt, um ein Reißen während des Trocknungsprozesses zu verhindern. Die Trockenzeit beträgt für 2D-Gele 3–4 h bei 60–80 °C.

B.5.5 **Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay (Fa. Pierce) den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet. Es handelt sich um ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem ausgenutzt wird, dass Bicinchoninsäure mit Cu⁺ Ionen einen purpurnen Farbkomplex bildet, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu²⁺ Ionen (Biuret Reaktion) entsteht. Die Farbzunahme ist über einen weiten Konzentrationsbereich proportional zur Proteinkonzentration. Wie von Smith et al.¹³¹ gezeigt, ist dieses Verfahren im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Lowry⁹⁴ kompatibel mit den meisten ionischen und nicht ionischen Detergenzien und zusätzlich schneller.

Die zu bestimmenden gefällten Proteinmengen werden in hypotonen Puffer aufgenommen und durch Spritzenaufschluss (291/2 gauche Insulinspritze) homogenisiert. Die Farbzunahme wird photometrisch bei einer Wellenlänge von λ 595 nm auf einem ELISA-Reader bestimmt. Als Kalibrationsstandard wird eine Reihe von BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen verwendet, deren Extinktionskoeffizienten mittels Linearer Regression eine Standardkurve ergeben.

Hypotoner Puffer:

10 mM HEPES, 10 mM KCl, 15 mM EDTA, 200 mM Sucrose

B.5.6 Phosphorylierung von CAP1 in transfizierten eukaryoten Zellen und Immunpräzipitation

PtK₂ Zellen werden wie unter ▷ **Kap. B.4.11 (S. 46)** beschrieben entweder mit dem CAP1-pEGFP-C1 Konstrukt alleine oder zusammen mit pCMV-cGK1 β ¹⁰¹ transfiziert. Nach 48 h werden die Zellen mit 1 ml/well (6-well Platte) Phosphat-freiem *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) gewaschen und jedes well mit 800 μ l aufgefüllt. Anschließend werden die Zellen für 1h bei 37°C mit 100 μ Ci ³²P-Orthophosphat inkubiert und darauf folgend mit Puffer alleine oder 10 μ M Forskolin oder 50 μ M 8-pCPT-cGMP für 20 min bei 37 °C stimuliert. Nach dem Waschen mit eiskaltem PBS werden die Zellen 5 min auf Eis mit 300 μ l/well MIPP-Puffer inkubiert, vom Untergrund abgelöst und durch Spritzenaufschluss (291/2 gauche Insulinspritze) homogenisiert. Zu dem Lysat eines wells wird 1 μ l des anti-GFP Antikörpers JL-8 (Fa. BD Biosciences) gegeben und jede Probe zunächst 90 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Danach wird jeder Probe 50 μ l Sepharose A Bead Suspension zugefügt und weitere 90 min inkubiert. Nach 3 \times waschen mit eiskalter PBS (2000 rpm, 1 min) bei 4 °C werden die Proben in 50 μ l SDS-Stopp aufgenommen.

MIPP-Puffer:

20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Na-Deoxycholat, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5 mM Na-Orthovanadat, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10 mM EDTA, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin, 50 mM PMSF, 10 nM Calyculin a, 1/10 Tablette/ml Complete[®] Mini (Fa. Roche)

Sepharose A Bead Suspension:

100 μ l Sepharose A in 1 ml MIPP für 30 min bei RT quellen lassen → 3 \times waschen mit 1 ml MIPP (2000 rpm, 1 min) → resuspendieren in 400 μ l MIPP

B. Material & Methoden

B.5.7 Phosphorylierung von Substraten der cGK in Thrombozyten mit ³²P-Orthophosphat und Proteinfällung

Die Thrombozyten werden aus 40 ml Vollblut wie unter ▷ **Kap. B.2.1 (S. 27)** beschrieben isoliert und das Pellet in 1 ml modifiziertem Resuspensionspuffer resuspendiert. Die WP werden bei 37 °C für 60 min mit 1 mCi ³²P-Orthophosphat inkubiert. Einer von zwei Ansätzen à 500 µl wird 15 s lang mit dem NO-Donor SNP bei einer Endkonzentration von 100 µM stimuliert. Der andere Ansatz wird zum Vergleich nicht stimuliert. Die Proteine der Proben werden mit eiskalter 100% (w/v) TCA bei einer Endkonzentration von 10% (v/v) gefällt, für 1 h auf Eis gestellt und das Präzipitat durch Zentrifugation pelletiert. Die kurze Inkubationszeit folgt der Vorstellung, dass die Substrate der cGK, die innerhalb von Sekunden phosphoryliert werden, für die physiologische Rolle von NO bzw. die Rolle von pharmakologischen NO Donoren und ihren Thrombozyten-hemmenden Eigenschaften besonders relevant sind. Hierdurch sollte die Anzahl der später auf den 2D-Gelen erscheinenden Spots von phosphorylierten Proteinen auf diejenige reduziert werden, die entweder im Rahmen der Basalaktivität von Kinasen phosphoryliert werden oder nach „kurzer“ Stimulation durch SNP entstehen.

Modifizierter Resuspensionspuffer, pH 7,4:

145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 3 mM EGTA, 0,1 mM ASS, 0,1 U/ml Apyrase

B.5.8 Proteinsolubilisierung für die 2-dimensionale Gelelektrophorese

► Proteinsolubilisierung

Die 2D-Gelelektrophorese stellt die bisher höchstaflösende Technik zur Proteinseparation dar. Allerdings konnten Proteine, die nach dem GRAVY-Index (*grand average of hydrophathy*) als hydrophob klassifiziert werden, lange Zeit praktisch nicht detektiert werden¹⁵⁰, auch wenn ihnen als potentiellen Membranproteinen besonderes Interesse zukommt. Der hier verwendete Puffer zur Solubilisierung von Proteinen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit, um zumindest teilweise hydrophobe Proteine auf 2D-Gelen erfassen zu können, folgendermaßen entwickelt:

Aufbrechen nicht kovalenter Bindungen: Als Chaotrope, die in der Lage sind Proteine zu entfalten und hydrophobe Reste zu exponieren, werden Harnstoff und Thio-

B.5. Proteinbiochemische Methoden

harnstoff in Kombination, wie von Rabilloud¹¹⁸ eingeführt, verwendet. Als Detergentien, zur Solubilisierung hydrophober Aminosäurereste, werden die Sulfobetaine CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) und SB 3-10 (N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat) gewählt, wobei letzteres in Gegenwart hoher Konzentrationen von Harnstoff schlecht löslich ist^{51,118}.

Aufbrechen von Disulfidbrücken: Zur Reduktion von Disulfid-Brückenbindungen wird entweder DTT (Dithiothreitol)¹¹⁷ oder das wasserlösliche Tris(2-carboxyethyl)phosphin⁶² angewendet.

Enzym-Inhibition: Proteasen werden durch Complete Mini (Fa. Roche) und Phosphatasen durch Calyculin a inhibiert.

► Proteinsolubilisierung in einem Schritt

200 µg Protein wird in 100 µl Solubilisierungspuffer 1/1 solubilisiert und 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Je 50 µl Probe (entspricht 100 µg Protein) wird nun mit 300 µl Laufpuffer versetzt.

Solubilisierungspuffer 1/1:

5 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10, 6 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, 40 mM Tris, 0,4% (w/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (pH Bereich 3–10) (Fa. Biorad), $\frac{1}{4}$ Tablette/ml Complete[®] Mini (Fa. Roche), 10 nM Calyculin a

Laufpuffer:

9 M Harnstoff, 1% (w/v) DTT, 2% (w/v) CHAPS, 0,8% (w/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (pH Bereich 3–10) (Fa. Biorad), $\frac{1}{4}$ Tablette/ml Complete[®] Mini (Fa. Roche), 10 nM Calyculin a

► Differentielle Solubilisierung

Eine differentielle Solubilisierung durch sequentielle Extraktion von Proteinen aus einem Zelllysate bietet gegenüber einer Solubilisierungsstrategie in einem Schritt insbesondere drei Vorteile. Zum einen ist es möglich Membranproteine anzureichern und sie von löslicheren Proteinen zu trennen. Zum anderen wird die Anzahl überlappender Spots auf einem 2D-Gel reduziert, was insbesondere die spätere Identifikation der Proteine erleichtert. Weiterhin können Proteine, die nur in geringen Mengen in Zellen vorkommen, besser

B. Material & Methoden

detektiert werden, weil durch die Präfraktionierung insgesamt größere Mengen an Proteinen aufgetrennt werden können, verteilt auf mehrere Gele. Deswegen wurde ein 3-Schritt sequentielles Solubilisierungsprotokoll von Molloy¹⁰⁴ adaptiert unter Verwendung von Reagentien mit einer stärkeren Solubilisierungskraft als die traditionell eingesetzten Reagentien (▷ **Kap. B.5.8, S. 52**).

500 µg Protein werden in 500 µl Solubilisierungspuffer 1/3 aufgenommen. Die Proben werden 2× für 5 min *gevortext* und für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Danach werden die Proben abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden entnommen und mit 250 µl Laufpuffer versetzt. Der restliche Überstand wird verworfen und die Pellets in Solubilisierungspuffer 2/3 resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgt analog zu oben, wobei die im Solubilisierungspuffer 3/3 aufgenommenen Pellets ohne vorherige Abzentrifugation in 250 µl Laufpuffer aufgenommen werden.

Solubilisierungspuffer 1/3:

40 mM Tris, Complete[®] Mini, 10 nM Calyculin a

Solubilisierungspuffer 2/3:

8 M Urea, 4% (w/v) CHAPS, 100 mM DTT, 40 mM Tris, $\frac{1}{4}$ Tablette/ml Complete[®] Mini, 10 nM Calyculin a

Solubilisierungspuffer 3/3:

5 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB3-10, 6 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, 40 mM Tris, 0,4% (w/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (pH Bereich 3–10), (Fa. Biorad) $\frac{1}{4}$ Tablette/ml Complete[®] Mini (Fa. Roche), 10 nM Calyculin a

Laufpuffer:

9 M Urea, 1% (w/v) DTT, 2% (w/v) CHAPS, 0,8% (w/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (pH Bereich 3–10) (Fa. Biorad), $\frac{1}{4}$ Tablette/ml Complete[®] Mini (Fa. Roche), 10 nM Calyculin a

B.5.9 2-dimensionale Gelelektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung wird ausgeführt auf dem Gerät Protean-IEF Cell (Fa. BioRad) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Je 350 µl Zellsuspension wird auf einen 17 cm langen ReadyStrip IPG Streifen mit einem immobilisierten pH Gradienten (linearer pH-Bereich 3–10) (Fa. BioRad) geladen

B.5. Proteinbiochemische Methoden

und für ca. 16 h bei 50 V rehydriert. Durch den Einsatz immobilisierter pH Gradienten wird das Problem des Gradientendriftes überwunden¹³. Fokussiert wird für 30 min bei 250 V, 30 min bei 500 V, 1 h von 500 V bis 1000 V, 5 h von 1000 V bis 8000 V und 5 h bei 8000 V. Die Streifen werden nun in 10 ml Äquilibrations-Puffer + 100 mg DTT und danach 10 ml Äquilibrations-Puffer + 200 mg Jodacetamid äquilibriert. Die Streifen werden anschließend sofort auf vertikale SDS Gele (10 % Acrylamid/Bisacrylamid) aufgetragen und mit 1% (w/v) Agarose in Elektrophorese-Puffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 40 mA bei 4 °C.

Äquilibrationspuffer, pH 8,8:

50 mM Tris-Cl, 6 M Harnstoff, 30% (w/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 1 ml Bromphenolblaulösung (30 mg Bromphenolblau in 10 ml 50 mM Tris pH 6.8)

SDS-Gel 10%, pH 8,9:

10% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,375 M Tris-Cl

→ zum Schluss: 0,05% Ammonium Persulfat, 0,00375% (v/v) TEMED

Elektrophorese-Puffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

B.5.10 **Autoradiografie**

Kodak X-OMAT AT Filme (Fa. Kodak), 24 × 30 cm, werden mit den getrockneten, radioaktiven Gelen exponiert (2D Gele 6–72 h) und anschließend entwickelt.

B.5.11 **Silberfärbung von 2D-Gelen nach Heukeshoven**

Die Silberfärbung wird nach dem Verfahren von Heukeshoven⁶⁹ durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet folgende Schritte, wobei für jeden Schritt jeweils 250 ml Lösung pro 2D-Gel benötigt werden:

B. Material & Methoden

Protokoll Silberfärbung:

Fixierung: Lösung A, über Nacht

Inkubation: Lösung B, 2 h

Wässern: Aq. dest., 4 × 15 min

Färbung: Lösung C, 30 min

Wässern: Aq. dest., 30 s

Spülen: Lösung D, 1 min

Entwicklung: Lösung E, 3–7 min

Stoppen: Lösung F, min. 20 min

Waschen: Aq. dest., min. 10 min

Quellen: Lösung G, 1 h

Lösungen:

A: 50% (v/v) Ethanol MEK vergällt, 10% (v/v) Essigsäure

B: 30% (v/v) Ethanol MEK vergällt, 0,5 M Natriumacetat (wasserfrei), 0,25 (w/v) Glutardialdehyd, 0,1 (w/v) Natriumthiosulfat

C: 0,0037% (v/v) Formaldehyd, 0,1 (w/v) Silbernitrat

D: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat

E: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat, 0,0037% (v/v) Formaldehyd

F: 0,05 M EDTA

G: 3% (v/v) Glycerin

B.6 Zellkultur

B.6.1 Kulturbedingungen

PtK₂-Zellen (*Potorous tridactylis kidney epithelial cells*):

Die PtK₂-Linie ist eine epitheliale Zell-Linie aus der Niere der Beutelratte. Die Kultivierung erfolgt in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 10% FCS und Zugabe von Penicillin/Streptomycin. Die Zellen werden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

B.6.2 Passagieren adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zellen werden mit Dulbeccos PBS gespült und mit einem geringen Volumen Trypsin/EDTA bis zum Abrunden der Zellen bei 37 °C inkubiert oder mit einem Schaber von der Bodenfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen werden in eine mit Medium befüllte Kulturflasche gegeben und in den Brutschrank gestellt.

B.6.3 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Die adhärennten Kulturzellen werden abgelöst, abzentrifugiert (200 g, 5 min, RT), in wenig Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen werden in einer Styroporbox 4 h bei -20 °C und dann für 1–2 Tage bei -80 °C gelagert. Danach werden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wird die Zellsuspension kurz bei 37 °C angetaut und möglichst schnell in ein mit 10 ml warmem Medium gefülltes 15 ml Greinerröhrchen gegeben. Die Zellen werden abzentrifugiert, in 1 ml warmem Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert.

Zur Kontrolle der Zellen können vor Zentrifugation 1–2 Tropfen der Zellsuspension mit 2 µl Trypanblau angefärbt werden. Tote Zellen färben sich blau.

Einfriermedium:

10% FCS, 10% DMSO, 1% AM/AC in DMEM

B.6.4 Transiente Transfektion mit Metafectene

Die Zellen werden bei 40% Konfluenz in einer 6-well Platte transfiziert. 3 µl Metafectene in 100 µl DMEM werden mit 1 µg Plasmid-Konstrukt in 100 µl DMEM zusammengegeben und 17 min bei RT inkubiert. Die Zellen einer well werden mit PBS gewaschen und jedes well mit 1 ml DMEM inkl. FCS und Penicillin/Streptomycin befüllt. Die 200 µl Transfektionsansatz werden zugefügt und nach 4 h bei 37 °C ein weiterer ml DMEM inkl. FCS und Penicillin/Streptomycin. Bei Verwendung von EGFP-Konstrukten kann am nächsten Tag die Transfektion fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

Kapitel C

Resultate

C.1 Monitoring von Clopidogrel – 60

- C.1.1 Clopidogrel Probandenstudie – 60
- C.1.2 Effekt von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Plättchen-Aggregation – 60
- C.1.3 Effekt von Clopidogrel auf die CD62P-Expression – 61
- C.1.4 Effekt von Clopidogrel auf den PFA100-Wert – 61
- C.1.5 Messung der VASP-Phosphorylierung – 62
- C.1.6 Effekt von Clopidogrel auf die VASP-Phosphorylierung – 63
- C.1.7 Effekt von Aspirin auf die VASP-Phosphorylierung – 64

C.2 Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel – 66

- C.2.1 Einfluss des P2Y₁₂ auf die PAR-ind. Aggregation – 66
- C.2.2 Einfluss des P2Y₁₂ auf die PAR- und TP-ind. Serotonin-Sekretion – 67

C.3 CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten – 68

- C.3.1 Phosphorylierung von CAP1 in intakten humanen Thrombozyten nach SNP Stimulation – 68
- C.3.2 Klonierung von CAP1 und CAP1 Mutanten – 71
- C.3.3 Transiente Expression von CAP1 und CAP1 Mutanten in PtK₂-Zellen – 73
- C.3.4 Keine Phosphorylierung von CAP1 durch cGK 1 β und cAK in PtK₂-Zellen – 75

C.4 Charakterisierung von VASP -/- Mäusen – 76

- C.4.1 Plättchendichte und Membranprotein-Expression – 76
- C.4.2 GP IIb/IIIa Aktivierung (Integrin α IIb β 3) – 76
- C.4.3 p-Selektin Expression und Serotonin Sekretion – 78

C.1 Monitoring von Clopidogrel

C.1.1 Clopidogrel Probandenstudie

Die Studie wurde nach positivem Votum der Würzburger Ethikkommission dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und nachfolgend der Regierung von Unterfranken angezeigt. Die Probanden wurden durch die Gerling Industrie Service GmbH versichert. Der erste Teil der Studie wurde von September 2002 bis November 2002 und der zweite Teil von November 2003 bis Dezember 2003 (mit geringen Modifikationen des Protokolls) durchgeführt. An der Studie nahmen insgesamt 10 weibliche und 14 männliche, gesunde Probanden im Alter zwischen 23 und 39 Jahren teil, die keine die Thrombozytenfunktion beeinflussende Medikamente einnahmen. 18 Probanden wurden mit Plavix[®] (Fa. Sanofi-Synthelabo) (Wirkstoff Clopidogrel) und 6 Probanden mit Placebo behandelt. Die demographischen Merkmale der Studienteilnehmer sind in ▷ **Tab. C.1** wiedergegeben.

Im Falle von Plavix[®] wurde initial eine *loading dose* von 4×75 mg und folgend täglich 1×75 mg für weitere 7 Tage eingenommen²⁸. Blut wurde vor Beginn der Medikation, jeweils 12 h nach Medikamenteneinnahme für weitere 3 Tage und 12 h nach der letzten Medikamenteneinnahme entnommen. Die Probanden wurden über den Zeitraum der Studie auf unerwünschte Arzneiwirkungen, z.B. Blutungen, untersucht, wobei keine beobachtet wurden.

In diesem Kapitel verglichen wir die Daten der Clopidogrel- und Placebogruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch *one-way ANOVA*.

C.1.2 Effekt von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Plättchen-Aggregation

Der Mittelwert der ADP-induzierten Aggregation nahm gegenüber dem Ausgangswert vor Medikamenteneinnahme ($t = 0$ h) bereits 12 h nach erstmaliger Clopidogrel-Einnahme

C.1. Monitoring von Clopidogrel

(300 mg Initialdosis) auf 40% und nach 60 h (Fortführung der Medikation mit 75 mg Clopidogrel täglich) auf 31% ab. In der Placebo-Gruppe wurde keine Inhibition der Aggregation beobachtet (▷ **Abb. C.1**). Ein *dot-plot* mit individuellen Aggregationswerten vor ($t = 0$ h) und 12 h nach Clopidogrel- bzw. Placebo-Einnahme ist in ▷ **Abb. C.2** wiedergegeben. Die Aggregationsmessungen von insgesamt 4 Probanden (3 in der Clopidogrel- und 1 in der Placebogruppe) misslangen aus technischen Gründen zum Zeitpunkt $t = 0$ h bzw. $t = 12$ h. Die Aggregationsdaten dieser Probanden sind in den Abbildungen daher nicht miteinbezogen. Gemäß der Definition von Gurbel et al.⁵⁷ sind 4 der 15 verbleibenden Clopidogrel-behandelten Probanden *weak-responder*. Ein ähnlich hoher Anteil findet sich auch in anderen Studien wieder^{57, 107}. Clopidogrel hatte keinen Einfluss auf die Kollagen- ($10 \mu\text{g/l}$) oder die U46619-induzierte ($2 \mu\text{mol/l}$) Aggregation (Daten nicht abgebildet).

C.1.3 Effekt von Clopidogrel auf die CD62P-Expression

Wir konnten keinen Unterschied zwischen der ADP-induzierten ($5 \mu\text{mol/l}$) Oberflächenexpression von p-Selektin zum Zeitpunkt $t = 0$ h und einem beliebigen Zeitpunkt nach Clopidogrel-Einnahme erkennen (▷ **Abb. C.2**). In dieser Studie konnte durch p-Selektin-Messung nicht zwischen der Clopidogrel- und Placebogruppe unterschieden werden.

C.1.4 Effekt von Clopidogrel auf den PFA100-Wert

Wir konnten keinen Unterschied zwischen der Okklusionszeit (in-vitro Blutungszeit), gemessen mit Kollagen/ADP-Einmalpatronen, vor ($t = 0$) und zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Clopidogrel-Einnahme feststellen (▷ **Abb. C.2**). Wie bei p-Selektin konnte auch mit dem PFA100 nicht zwischen der Clopidogrel- und Placebogruppe unterschieden werden. Die gleichen Resultate erhielten wir bei Verwendung der Kollagen/Epinephrin-Einmalpatronen (Daten nicht abgebildet).

	Clopidogrel-Gruppe	Placebo-Gruppe
n	18	6
Mittelwert (SD) Alter, Jahre	29,6 (4,9)	27,0 (3,1)
M/F, n	10/8	4/2
Mittelwert (SD) body mass index, kg/m^2	21,9 (2,4)	22,5 (1,7)
Mittelwert (SD) Plättchendichte, $\times 10^9/l$	267 (62)	256 (62)

Tabelle C.1 Demographische Daten der Probanden

C. Resultate

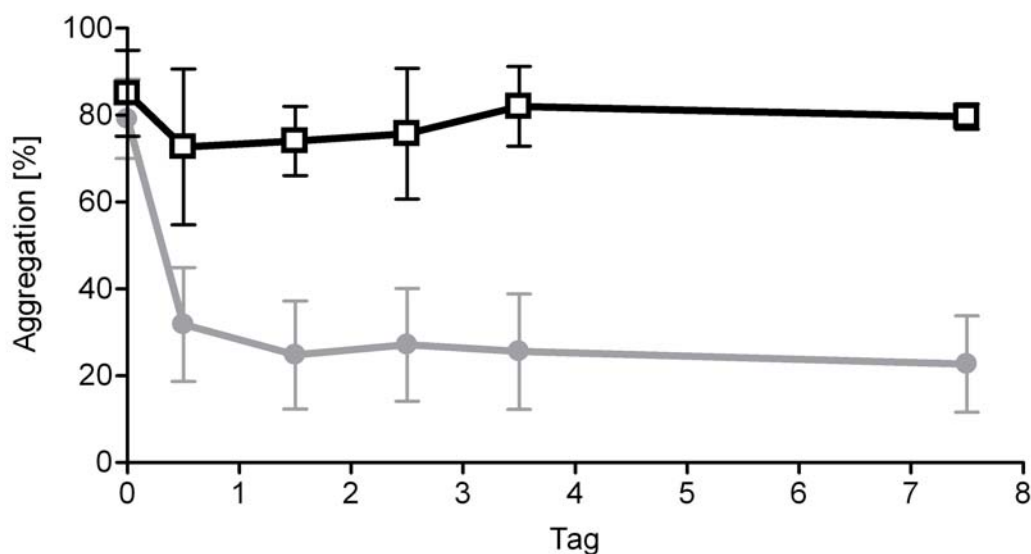


Abbildung C.1 Clopidogrel-Inhibition der ADP-induzierten ($5 \mu\text{M}$ ADP) Plättchenaggregation. Die Plättchenaggregation wurde in der Clopidogrel- (300 mg Initialdosis und 75 mg 1 \times tgl. Erhaltungsdosis, $n = 15$) und in der Placebo-Gruppe ($n = 5$) turbidimetrisch auf einem BIO/DATA Platelet Aggregation Profiler Model PAP-4 gemessen. Clopidogrel-Gruppe \bullet , Placebo-Gruppe \square . Mittelwert \pm SD.

C.1.5 Messung der VASP-Phosphorylierung

Die VASP-Phosphorylierung wurde mit zwei Assays (FACS und EIA) unter Verwendung des monoklonalen Antikörper 16C2 bestimmt. Dieser erkennt spezifisch Ser-239 phosphoryliertes VASP¹³².

Der Mittelwert (Standardabweichung) des Verhältnisses $\frac{pVASP}{VASP}$ gemessen mittels EIA nahm in der Gegenwart von 40 nmol/l Iloprost von 0,042 (0,14) auf 0,80 (0,14) ($p < 0,001$) zu. Dies entspricht einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und somit einer Plättchen-Inhibition. ADP ($5 \mu\text{mol/l}$) senkte die VASP-Phosphorylierung im Mittel um 55 (16) %. Im FACS-Assay erhöhte 40 nmol/l Iloprost das pVASP-Signal 3–4-fach (MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität), 9,8 (1,4) gegenüber 34,7 (5,4)). In Gegenwart von $5 \mu\text{mol/l}$ ADP nahm das Iloprost-induzierte Signal im Mittel um 51 (14) % ab.

Die mit beiden Assays (FACS und EIA) ermittelten PRI-Werte korrelierten mit $r^2 = 0,750$ ($r = 0,866$; 95% Konfidenzintervall, 0,821–0,890; \triangleright **Abb. C.3**). Der statistische Test mit der Nullhypothese, dass keine Korrelation besteht, ergab $p < 0,001$.

C.1. Monitoring von Clopidogrel

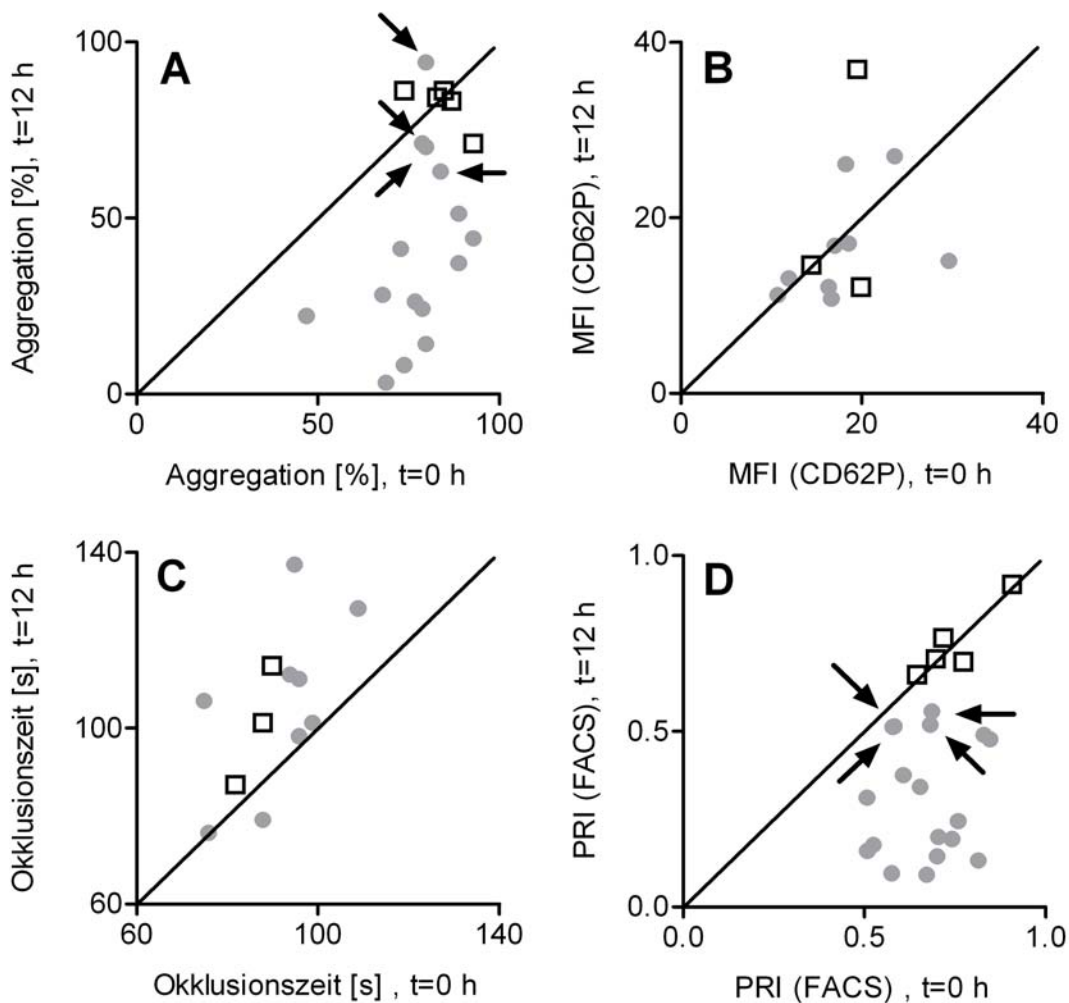


Abbildung C.2 Vergleich individueller Werte der Aggregation, CD62P-Expression, PFA-100 Okklusionszeit und VASP-Phosphorylierung vor ($t = 0\text{h}$) und 12h nach Clopidogrel-Gabe. In (A) wurde die Standardaggregation und in (B) die p-Selektin-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten nach Aktivierung mit $5\ \mu\text{M}$ ADP gemessen. Für die Messung der Okklusionszeit (C) verwendeten wir Kollagen/ADP-Einmalpatronen im PFA100. Als weiteren Parameter wurde mit dem VASP-FACS Assay der PRI(FACS) bestimmt (D), in dessen Berechnung die VASP-Phosphorylierung eingeht (\triangleright Kap. B.2.11, S. 35). Mögliche low-responder sind mit einem Pfeil markiert. Clopidogrel-Gruppe \bullet , Placebo-Gruppe \square .

C.1.6 Effekt von Clopidogrel auf die VASP-Phosphorylierung

Bereits 12 h nach initialer Clopidogrel-Einnahme war der Mittelwert der ADP-induzierten Abnahme der VASP-Phosphorylierung in Iloprost-stimulierten Plättchen deutlich abgeschwächt. Wir konnten einen klaren Effekt sowohl mit dem FACS-Assay [$PRI_{FACS,t=0} = 0,67$ (0,11) gegenüber $PRI_{FACS,t=12} = 0,31$ (0,17); $p < 0,001$; \triangleright Abb. C.5A] als auch mit dem EIA [$PRI_{EIA,t=0} = 0,48$ (0,14) gegenüber $PRI_{EIA,t=12} = 0,20$ (0,14); $p < 0,001$; \triangleright Abb. C.5B] beobachten. Der maximale Effekt trat 48 h nach Einnahme der Initial-

C. Resultate

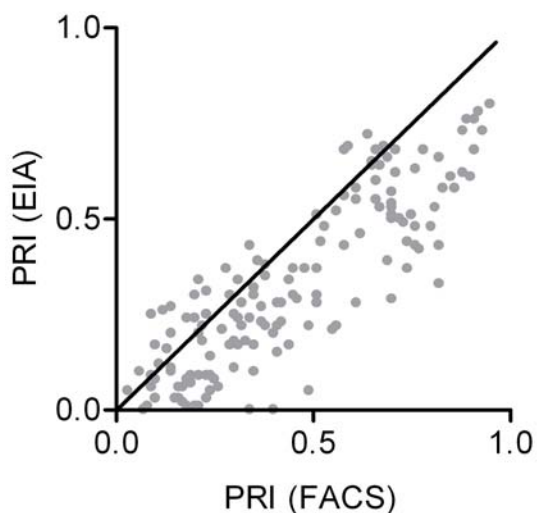


Abbildung C.3 Korrelation individueller PRI(EIA)- und PRI(FACS)-Werte. Anhand aller Werte der Clopidogrel- und der Placebo-Gruppe wurde der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet: $r^2 = 0,750$ ($r = 0,866$; 95% Konfidenzintervall, 0,821–0,890). Der statistische Test mit der Nullhypothese, dass keine Korrelation besteht, ergab $p < 0,001$.

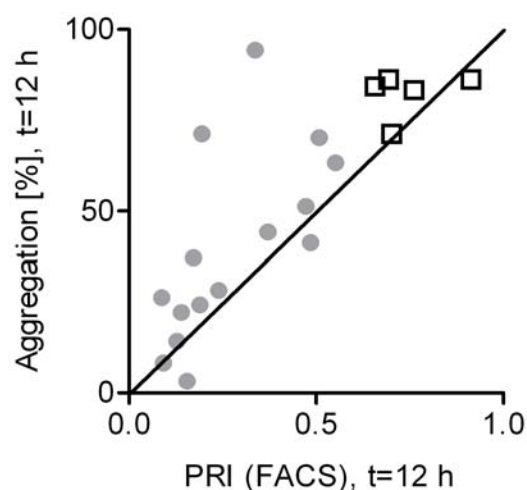


Abbildung C.4 Korrelation individueller PRI(FACS)- und Aggregations-Werte. Die Plättchenaggregation wurde durch $5 \mu\text{M}$ ADP induziert. Dargestellt sind die Werte 12h nach Clopidogrel-Erstgabe. Clopidogrel-Gruppe \bullet , Placebo-Gruppe \square . $r^2 = 0,67$ ($r = 0,81$). Der statistische Test für die Nullhypothese, dass keine Korrelation besteht, ergab $p < 0,001$.

dosis auf. Danach (Tag 4–9) ergaben sich keine weiteren Veränderungen. Die Abnahme der Clopidogrel-induzierten Plättchen-Effekte begann 2 Tage nach Beendigung der Clopidogrel-Einnahme (Tag 11). In den Probanden der Placebo-Gruppe war die ADP-induzierte Aktivierung Iloprost-behandelter Plättchen unbeeinträchtigt. Die individuellen PRI-Werte in der Placebo-Gruppe differierten erheblich mit einer Spanne von 0,57–0,95 (\triangleright **Abb. C.2**).

Die pVASP-Messungen und die Aggregation korrelierten mit $r^2 = 0,67$ ($r = 0,81$). Der statistische Test für die Nullhypothese, dass keine Korrelation besteht, ergab $p < 0,001$ (\triangleright **Abb. C.4**).

C.1.7 Effekt von Aspirin auf die VASP-Phosphorylierung

Obwohl die Einnahme einer Einzeldosis von 100 mg Aspirin die Aggregation (ex-vivo) beträchtlich verminderte, konnten wir keine offensichtliche Beeinflussung der VASP-Phosphorylierung feststellen (\triangleright **Abb. C.6**). Diese Ergebnisse konnten durch in-vitro Experimente verifiziert werden, bei denen der Einfluss von $100 \mu\text{mol/l}$ Aspirin auf die ADP-

C.1. Monitoring von Clopidogrel

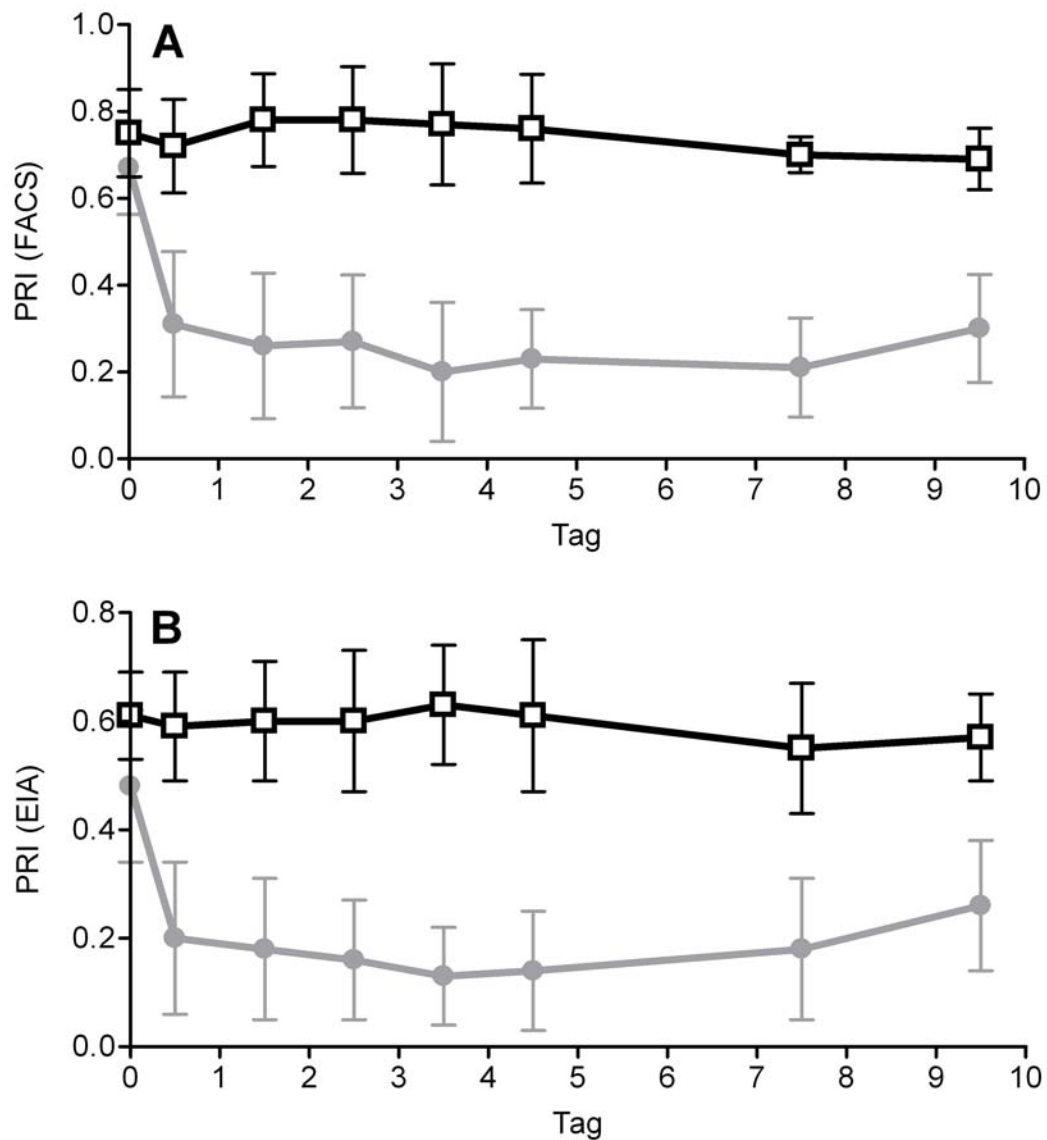


Abbildung C.5 Hemmung der ADP-induzierten ($5 \mu\text{M}$ ADP) Plättchen-Aktivierung durch Clopidogrel gemessen mit dem VASP-FACS und -EIA Assay. Der PRI wurde in der Clopidogrel- (300 mg Initialdosis und 75 mg 1×tgl. Erhaltungsdosis, $n = 18$) und in der Placebo-Gruppe ($n = 6$) sowohl mit dem VASP-FACS (A), als auch mit dem -EIA (B) gemessen. Clopidogrel- und Placebo-Gruppe unterschieden sich ab $t = 12 \text{ h}$ signifikant mit $p < 0,001$. Clopidogrel-Gruppe ●, Placebo-Gruppe □. Mittelwert \pm SD.

induzierte Aggregation und die VASP-Phosphorylierung untersucht wurde (Daten nicht abgebildet).

C. Resultate

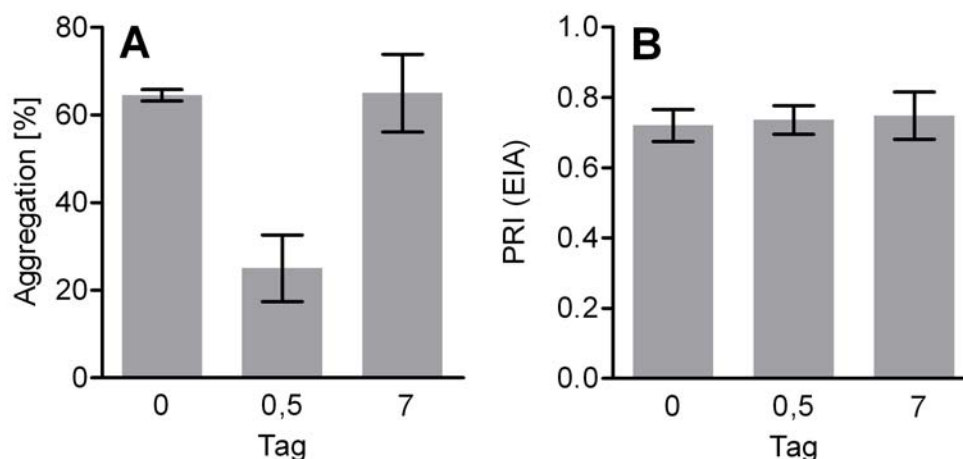


Abbildung C.6 Effekt von Aspirin (100 mg Einfachdosis) auf die ADP-induzierte Aggregation und den PRI(EIA). Die mit 5 μ M ADP induzierte Plättchen-Aggregation (A) und der PRI (B) wurden vor Aspirin-Administration (Tag 0), 12 h und 7 d danach gemessen (n = 6). Mittelwert \pm SD.

C.2 Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel

C.2.1 Einfluss des P2Y12 auf die PAR-induzierte Aggregation

PAR1 wurde durch das synthetische Peptid SFLLRN (Trap6) und PAR4 durch AYPGKF (AY-NH₂) spezifisch aktiviert. In unseren Versuchen nahm der Mittelwert der Trap6- bzw. AY-NH₂-induzierten Aggregation gegenüber dem Ausgangswert vor Medikamenteneinnahme (t = 0 h) bereits 12 h nach initialer Clopidogrel-Einnahme auf 35% bzw. 29% ab (\triangleright **Abb. C.7**). Nach AY-NH₂-Stimulation war die Aggregation nach Clopidogrel-Einnahme zu allen Messzeitpunkten in der Clopidogrel- gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert. Nach Stimulation mit Trap6 lag die Aggregation der Clopidogrel-Gruppe nur zu den Zeitpunkten t = 1,5 d und t = 3,5 d signifikant ($p < 0,05$) unter der der Placebo-Gruppe. Ursächlich waren Schwankungen in der Placebo-Gruppe, die wahrscheinlich auf eine geringe Fallzahl in dieser Gruppe zurückzuführen sind.

Insgesamt zeigte sich demgemäß auch ex-vivo eine deutliche Abhängigkeit der PAR-vermittelten Aggregation vom P2Y12-Rezeptor, die sich bereits in eigenen in-vitro Versuchen mit AR-C69931 gezeigt hatte (Daten nicht abgebildet).

C.2. Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel

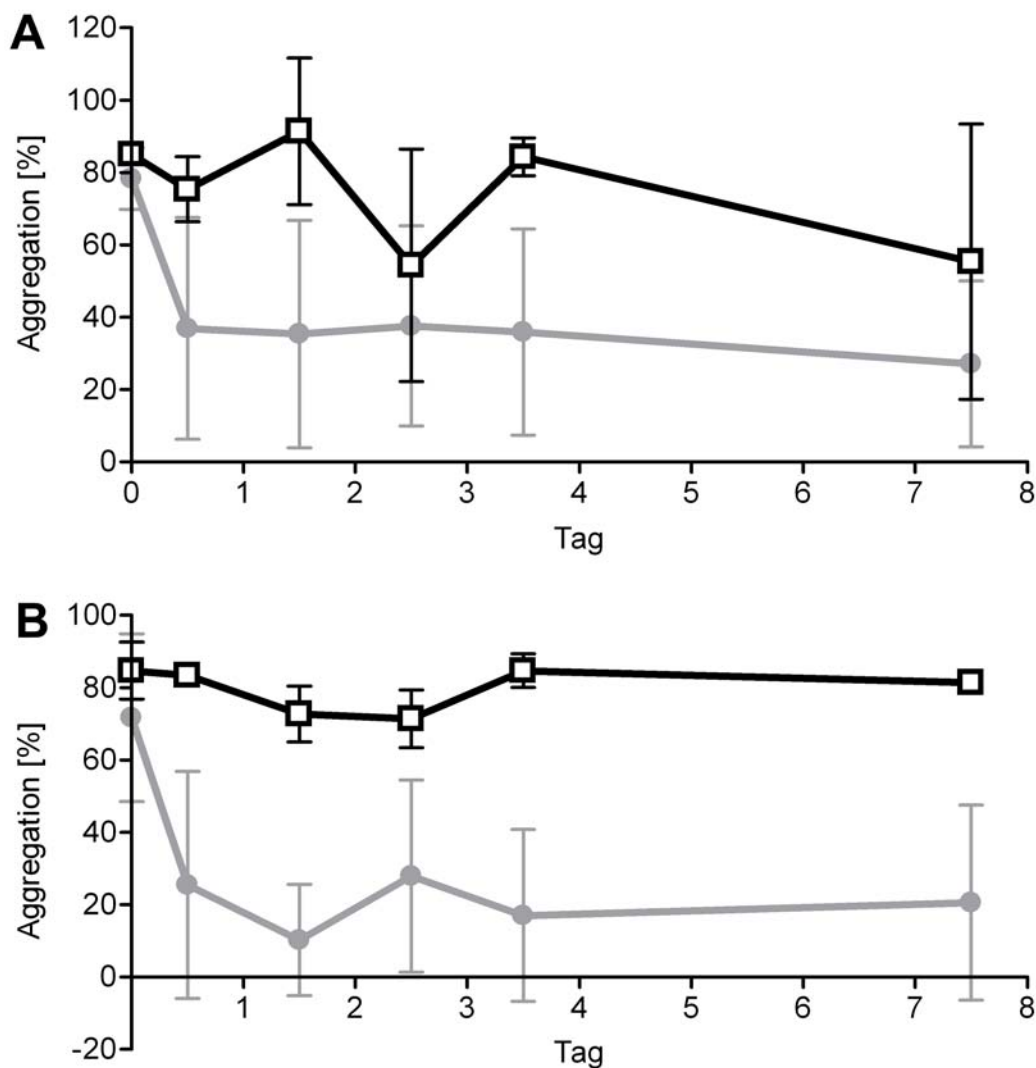


Abbildung C.7 Clopidogrel-Inhibition der Trap6- und AY-NH₂ induzierten Plättchenaggregation.

Die Plättchenaggregation wurde in der Clopidogrel- (300 mg Initialdosis und 75 mg 1 × tgl. Erhaltungsdosis, n = 9) und in der Placebo-Gruppe (n = 3) turbidimetrisch nach Stimulation mit Trap6 (A), 10 µM, und AY-NH₂ (B), 75 µM, gemessen. Clopidogrel-Gruppe ●, Placebo-Gruppe □. Mittelwert ± SD.

C.2.2 Einfluss des P2Y₁₂ auf die PAR- und TP-induzierte Serotonin-Sekretion

Die Serotonin-Sekretion nach Stimulation mit Trap6 und AY-NH₂ konnte deutlich durch Clopidogrel gehemmt werden. Gleiche Ergebnisse fanden wir nach Stimulation mit dem stabilen Thromboxan A₂ Analog U46619, das den TP-Rezeptor aktiviert (▷ **Abb. C.8**).

Nach Stimulation mit Trap6 bzw. AY-NH₂ lag die Sekretion der Clopidogrel-Gruppe

C. Resultate

ab $t = 1,5$ d bzw. $t = 2,5$ d signifikant ($p < 0,05$) unter der der Placebo-Gruppe. Die prozentuale Abnahme der Sekretion im Vergleich zum Basalwert $t = 0$ h gemessen am Mittelwert war nach AY-NH₂-Stimulation gegenüber Trap6 deutlich ausgeprägter (44% vs 23% bei $t = 7,5$ d). Die Streuung der Messergebnisse war bei Trap6 und AY-NH₂ in der Clopidogrel-Gruppe stärker als in der Placebo-Gruppe. Bei den Probanden der Placebo-Gruppe war die Sekretion im Zeitraum der Messungen unbeeinträchtigt.

Die Sekretion nach Stimulation mit U46619 war in der Clopidogrel-Gruppe bereits ab $t = 0,5$ d signifikant niedriger als in der Placebo-Gruppe.

C.3 CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

C.3.1 Phosphorylierung von CAP1 in intakten humanen Thrombozyten nach SNP Stimulation

Um neue Substrate der cGK in intakten humanen Thrombozyten zu identifizieren, wurden Plättchen mit ³²P-Orthophosphat beladen und anschließend für 15 s mit 100 μM SNP oder Puffer stimuliert. Die Proteine des resultierenden Plättchen-Lysats wurden durch 2D-Gelelektrophorese separiert. Das in diesen Experimenten gewonnene 2-dimensionale Phospho-Proteom zeigt die Phosphorylierung/Dephosphorylierung etlicher Proteine. Die Spots repräsentieren Proteine, die entweder im Rahmen der Basalaktivität von Kinasen oder durch die cGK nach Stimulation durch SNP phosphoryliert werden. Trotz der „kurzen“ Stimulationsdauer von 15 s war die Anzahl von Spots pro Gel erheblich. Durch Vergleich des Phosphoproteoms des Puffer- und SNP-stimulierten Plättchenlysats konnten Kandidaten-Spots erkannt werden (▷ **Abb. C.9**). Zur Identifizierung wurden diese Spots ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und durch *electrospray ionization mass spectrometry/mass spectrometry* (Jun. Prof. Dr. Katrin Marcus, Medizinisches Proteom Zentrum (mpc), Zentrum für klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum) identifiziert. Die Spots B1–2 wurden als VASP identifiziert¹⁷ mit multiplen Phosphoisofomen². Die Spots A1–2 wurden als das *adenylyl cyclase associated protein* (CAP1), ein neues Aktin-bindendes Protein¹⁵³, identifiziert. Spot C konnte bisher nicht identifiziert werden. Folgend sind die Ergebnisse der Peptidsequenzanalyse für Spot A1-2 aufgeführt.

C.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

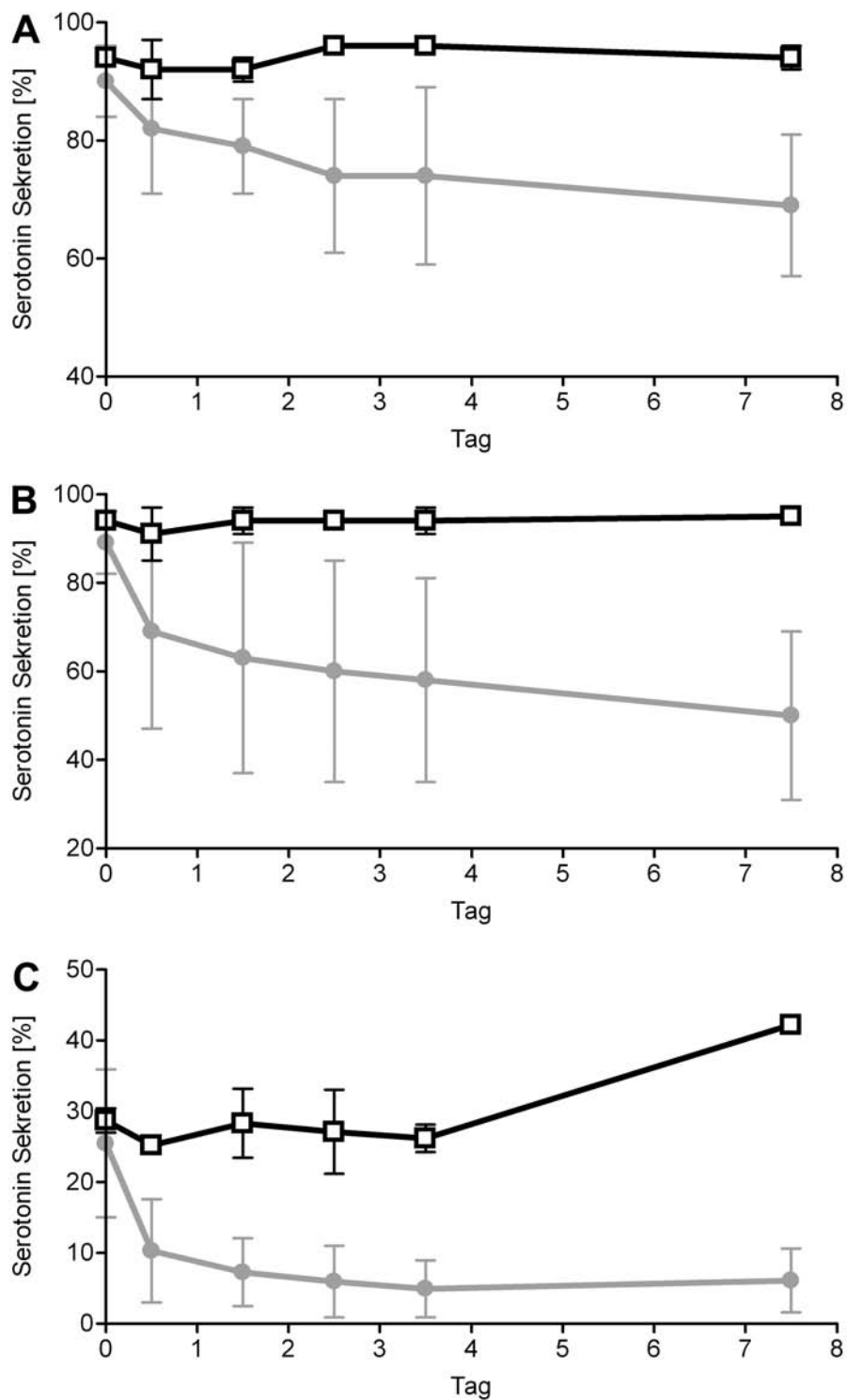


Abbildung C.8 Clopidogrel-Inhibition der Serotonin-Sekretion induziert durch Trap6, AY-NH₂, U46619. Die Serotonin-Sekretion wurde in der Clopidogrel- (300 mg Initialdosis und 75 mg 1 × tgl. Erhaltungsdosis, n = 9) und in der Placebo-Gruppe (n = 3) fluorimetrisch nach Stimulation mit Trap6 (A) (10 μM), AY-NH₂ (B) (75 μM) und U46619 (C) (2 μM) bestimmt. Der Anteil des sezernierten Serotonins am gesamten intrazellulären Serotonin ist auf der y-Achse aufgetragen. Clopidogrel-Gruppe ●, Placebo-Gruppe □. Mittelwert ± SD.

C. Resultate

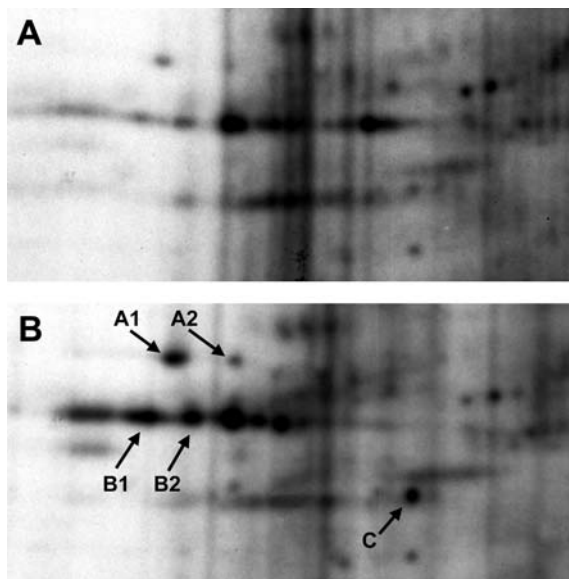


Abbildung C.9 2-dimensionales Phosphoproteom eines Plättchenlysats vor und nach Inkubation mit SNP (Ausschnitt). WP wurden zunächst mit ^{32}P -Orthophosphat beladen. Einer von zwei Ansätzen wurde mit dem NO-Donor SNP bei einer Endkonzentration von $100\ \mu\text{M}$ für 15 s stimuliert (B). Der andere Ansatz (A) wurde zum Vergleich nicht stimuliert. Die Proteine der Proben wurden mit eiskalter TCA gefällt, pelletiert und in Solubilisierungspuffer aufgenommen. Nach dem Ultraschallaufschluss wurden die Proteine über 2D-Gelelektrophorese separiert. Weitere Erläuterungen s. Text.

Spot A1

gil30585229 adenylylcyase-associated protein (26,1%)

MADMQNLVERLERAVGRLEAVSHTSDMHRGYADSPSKAGAAPYVQAFDSLLAGPVAEYLK
ISKEIGGDVQKHAEMVHTGLKLERALLVTASQCQQPAENKLSDLLAPISEQIKEVITFRE
KNRGSKLFNHLSAVSESIQALGWVAMAPKPGPYVKEMNDAAMFYTNRVLKEYKDVDKKHV
DWVKAYLSIWTELQAYIKEFHTTGLAWSKTGPVAKELSGLPSGPSAGSGPPPPPPGPPPP
PVSTSSGSDESASRSALFAQINQGESITHALKHVSDDMKTHKNPALKAQSGPVRSGPKPF
SAPKPQTSPPKRATKKEPAVLELEGGKWRVENQENVSNLVIEDTELKQVAYIYKCVNTT
LQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDDVVGIVEIINSKDVKVQVMGKVPTISINKTDGCHAYL
SKNSLDCEIVSAKSSEMNVLIPTEGGDFNEFPVPEQFKTLWNGQKLVTTVTEIAGL

Spot A2

gil30585229 adenylylcyase-associated protein (46,8%)

MADMQNLVERLERAVGRLEAVSHTSDMHRGYADSPSKAGAAPYVQAFDSLLAGPVAEYLK
ISKEIGGDVQKHAEMVHTGLKLERALLVTASQCQQPAENKLSDLLAPISEQIKEVITFRE
KNRGSKLFNHLSAVSESIQALGWVAMAPKPGPYVKEMNDAAMFYTNRVLKEYKDVDKKHV
DWVKAYLSIWTELQAYIKEFHTTGLAWSKTGPVAKELSGLPSGPSAGSGPPPPPPGPPPP
PVSTSSGSDESASRSALFAQINQGESITHALKHVSDDMKTHKNPALKAQSGPVRSGPKPF
SAPKPQTSPPKRATKKEPAVLELEGGKWRVENQENVSNLVIEDTELKQVAYIYKCVNTT
LQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDDVVGIVEIINSKDVKVQVMGKVPTISINKTDGCHAYL
SKNSLDCEIVSAKSSEMNVLIPTEGGDFNEFPVPEQFKTLWNGQKLVTTVTEIAGL

Unterstrichen sind die identifizierten Sequenzbereiche.

C.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

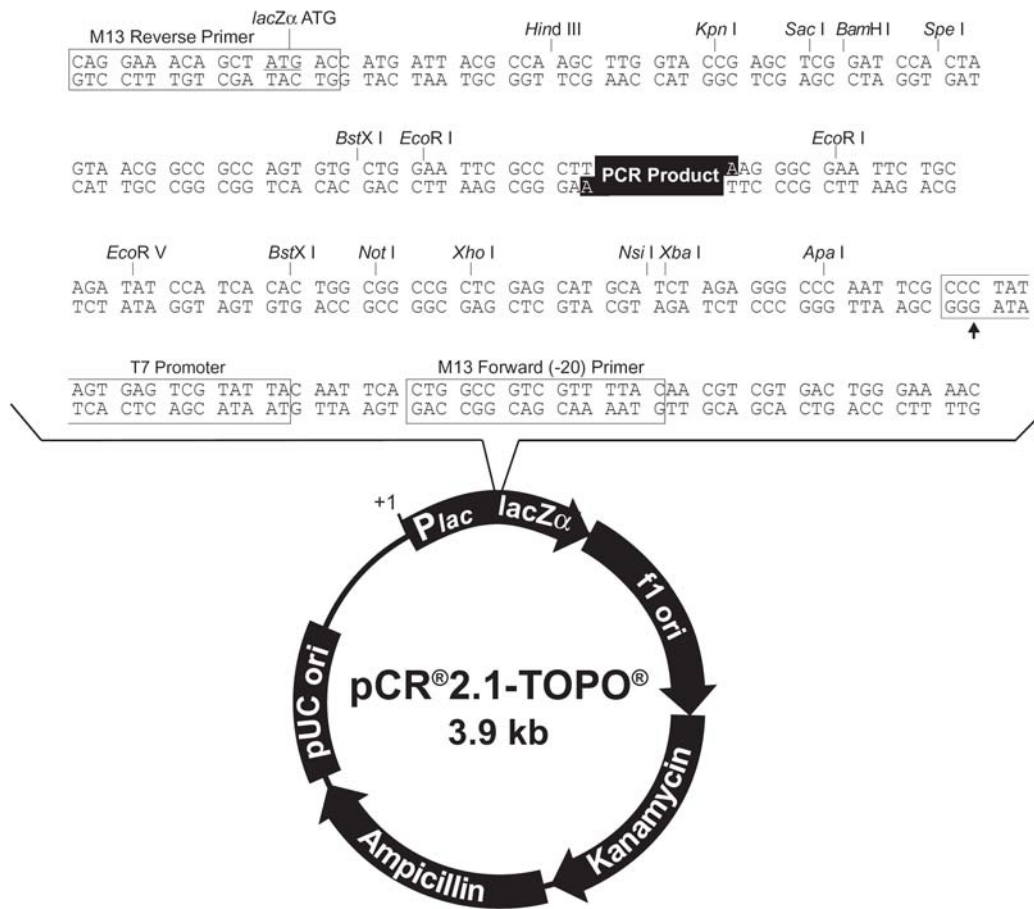


Abbildung C.10 pCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor.

C.3.2 Klonierung von CAP1 und CAP1 Mutanten

Mittels TRIzol wurde aus humanen Thrombozyten RNA isoliert. Basierend auf der publizierten humanen cDNA Sequenz (GenBank Access. No. M98474, Swissprot Access. No. Q01518) wurden genspezifische Primer zur PCR-Amplifikation entworfen (▷ **Tab. B.1, S. 19**). Die folgenden Oligonukleotide wurden verwendet: GTCGGATCCATGGCTGACAT GCAAATCTG (sense, CAP1HuBAM) und AATGCGGCCGTTATCCAGCAATTTCTGTCA CTGTG (antisense, CAP1HuNOT) mit BamHI- und NotI-Restriktionsstellen (unterstrichen). Die Primer wurden im OneStep RT-PCR Kit (Fa. Qiagen) eingesetzt und so auf Grundlage des RNA *templates* aus Thrombozyten über die cDNA die vollständige kodierende CAP1-Sequenz amplifiziert. CAP1 wurde dann in den pCR 2.1-TOPO-Vektor (Fa. Invitrogen) kloniert. Die TOPO[®] Klonierung nutzt die terminale Transferase Aktivität der im OneStep RT-PCR Kit verwendeten Taq-Polymerase, die *template*-unabhängig an die 3'-Enden des PCR-Produktes ein Deoxyadenosin (A) anhängt (▷ **Abb. C.10**).

C. Resultate

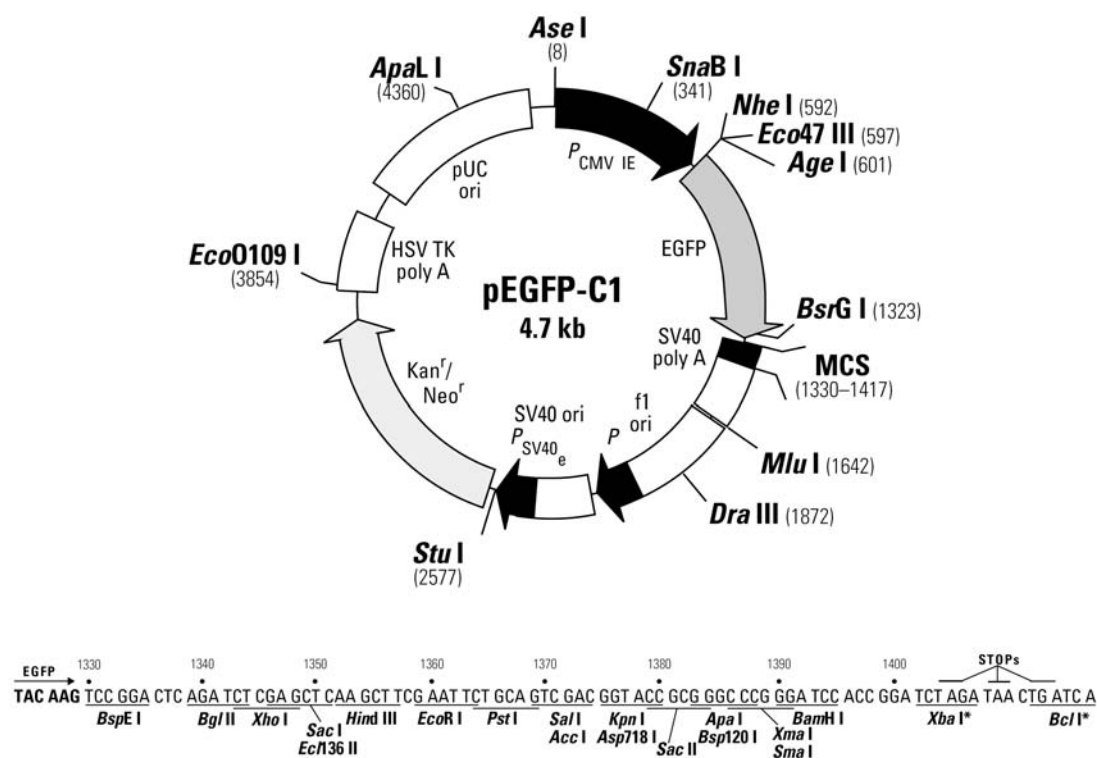


Abbildung C.11 pEGFP-C1 Expressionsvektor.

Eine theoretische Sequenzanalyse von humanem CAP1 legte zwei potentielle Phosphorylierungsstellen bei Serin-125 und Threonin-315 für die cGK nahe. Deshalb wurden zwei Einzelmutanten (S125A, T315A) durch *Splice Overlap Extension* oder mit dem *Quiksite direct Mutagenesis Kit* (Fa. Stratagene) und den entsprechenden Mutageneseprimern (▷ **Tab. B.2, S. 19**) erzeugt und Serin bzw. Threonin durch Punktmutation zu Alanin mutiert. Eine weitere Doppelmutante (S125A/T315A) wurde durch Segmentaustausch zwischen den beiden Einzelmutanten erstellt. Hierbei wurden die Restriktionsenzyme *AccI*, das CAP1 1× zwischen den Nukleotiden 539/540 schneidet, und *KpnI*, das den Vektor pCR 2.1-TOPO schneidet, verwendet.

Zur prokaryoten Expression wurde CAP1 in pQE-30 (Fa. Qiagen) umklont. Der Vektor fügt N-terminal ein 6×HIS-Tag ein, was eine Aufreinigung des Proteins bspw. über Ni-NTA Agarose (*Ni-Nitrilotriacetic acid* gebunden an Sepharose® CL-6B) ermöglicht. Für die eukaryote Expression wurde CAP1 und die CAP1-Mutanten in pEGFP-C1 (Fa. BD Biosciences) umklont. Der Vektor fügt N-terminal EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ein, was eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Expression in der lebenden Zelle und eine Immunpräzipitation mit anti-EGFP Antikörpern ermöglicht (▷ **Abb. C.11**). Zum Zeitpunkt der Doktorarbeit waren keine anti-CAP1 Antikörper

C.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

Plasmid	Vektor	CAP1-Insert	Insert-Schnittstellen ¹	N-Taq	Verwendung
CAP1 ^{WT} TOPO	pCR 2.1-TOPO	WT	BamHI		Klonierung
CAP1 ^{S125A} TOPO	pCR 2.1-TOPO	S125A	BamHI		Klonierung
CAP1 ^{T315A} TOPO	pCR 2.1-TOPO	T315A	BamHI		Klonierung
CAP1 ^{S125A/T315A} -TOPO	pCR 2.1-TOPO	S125A/T315A	BamHI		Klonierung
CAP1 ^{WT} pEGFP	pEGFP-C1	WT	BamHI	EGFP	eukaryote Expression
CAP1 ^{S125A} pEGFP	pEGFP-C1	S125A	BamHI	EGFP	eukaryote Expression
CAP1 ^{T315A} pEGFP	pEGFP-C1	T315A	BamHI	EGFP	eukaryote Expression
CAP1 ^{S125A/T315A} -pEGFP	pEGFP-C1	S125A/T315A	BamHI	EGFP	eukaryote Expression
CAP1 ^{T315A} pQE-30	pQE-30	T315A	BamHI	6×HIS	prokaryote Expression

Tabelle C.2 CAP1 Plasmidkonstrukte. ¹Ursprünglich wurden die Klonierprimer so entworfen, dass am C-Terminus der CAP1-Sequenz eine NotI-Schnittstelle eingefügt wurde. Diese ließ sich aber bei der Umklonierung durch NotI nur ineffizient schneiden. Deshalb wurde für die Umklonierung in den pEGFP-C1- bzw. pQE30-Vektor das CAP1-Insert aus dem pCR 2.1-TOPO-Vektor nur mit BamHI geschnitten. Die N-terminale BamHI-Restriktionsschnittstelle wurde ursprünglich durch entsprechendes Primer-Design eingefügt (▷ **Kap. C.3.2, S. 71**). Die C-terminale BamHI-Restriktionsschnittstelle ist Teil der *multiple cloning site* des pCR 2.1-TOPO (▷ **Abb. C.10**).

kommerziell erhältlich.

Tab. C.2 gibt eine Übersicht über die erzeugten CAP1-Konstrukte. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

C.3.3 Transiente Expression von CAP1 und CAP1 Mutanten in PtK₂-Zellen

Um CAP1 als Substrat der cGK I β und der cAK zu etablieren, wurden PtK₂-Zellen transient mit Wildtyp CAP1 oder den Einzelmutanten S125A, T315A oder der Doppelmutante S125A/T315A transfiziert. Hierzu wurde das Reagenz Metafectene verwendet. Die Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch in der lebenden Zelle und durch Western Blot

C. Resultate

Analyse überprüft (Ergebnisse nicht abgebildet).

PtK₂-Zellen exprimieren endogen cAK, aber nicht cGK I β . Daher wurden CAP1 oder seine Mutanten zusammen mit cGK I β in PtK₂-Zellen ko-transfiziert und die Expression beider Proteine wieder durch Western-Blot Analyse bestätigt (\triangleright **Abb. C.12**). Die Funktionsfähigkeit der ko-transfizierten cGK I β wurde anhand der VASP-Phosphorylierung nach 8-pCPT-cGMP Stimulation durch Verwendung des Antikörpers 16C2, der spezifisch Phospho-S239-VASP erkennt, überprüft (Daten nicht abgebildet).

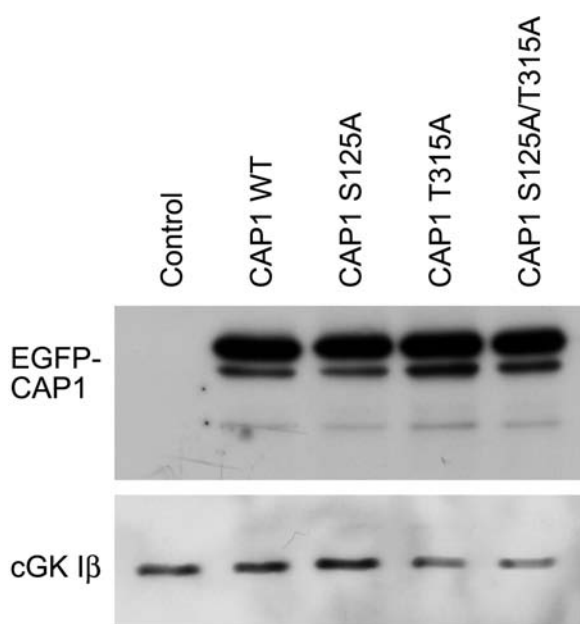


Abbildung C.12 Ko-Transfektion von EGFP-CAP1 Varianten und cGK1 β . PtK₂-Zellen wurden mit EGFP-CAP1 (WT) oder einer EGFP-CAP1-Mutante simultan mit cGK I β transfiziert. Für die Kontrolle wurde der leere pEGFP-C1 Vektor transfiziert. Im oberen Anteil der Abbildung ist der Bereich 60–100 kDa (CAP1 51,5 kDa, EGFP 29,3 kDa) gezeigt. EGFP alleine läuft bei 29,3 kDa und ist in der Kontrolle daher nicht dargestellt. Die Expression der cGK I β war schwächer als die der EGFP-CAP1 Varianten. Ihre Expressionsrate war unabhängig von der Ko-Transfektion mit EGFP-CAP1. Die Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt.

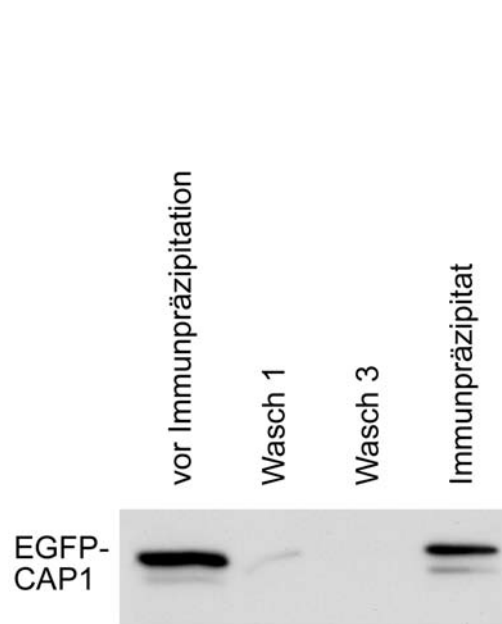


Abbildung C.13 Immunpräzipitation von EGFP-CAP1. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, 5 min auf Eis mit 300 μ l/well (6-well Platte) MIPP-Puffer inkubiert, vom Untergrund abgelöst und durch Spritzenaufschluss homogenisiert („vor Immunpräzipitation“). Zu dem Lysat eines wells wurde 1 μ l anti-GFP mAb JL-8 gegeben, jede Probe bei 4°C inkubiert und schließlich 50 μ l Sepharose A Bead Suspension zugefügt. Nach 3 \times Waschen („Wasch 1“, „Wasch 3“) wurden die Proben in SDS-Stopp aufgenommen („Immunpräzipitat“).

C.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

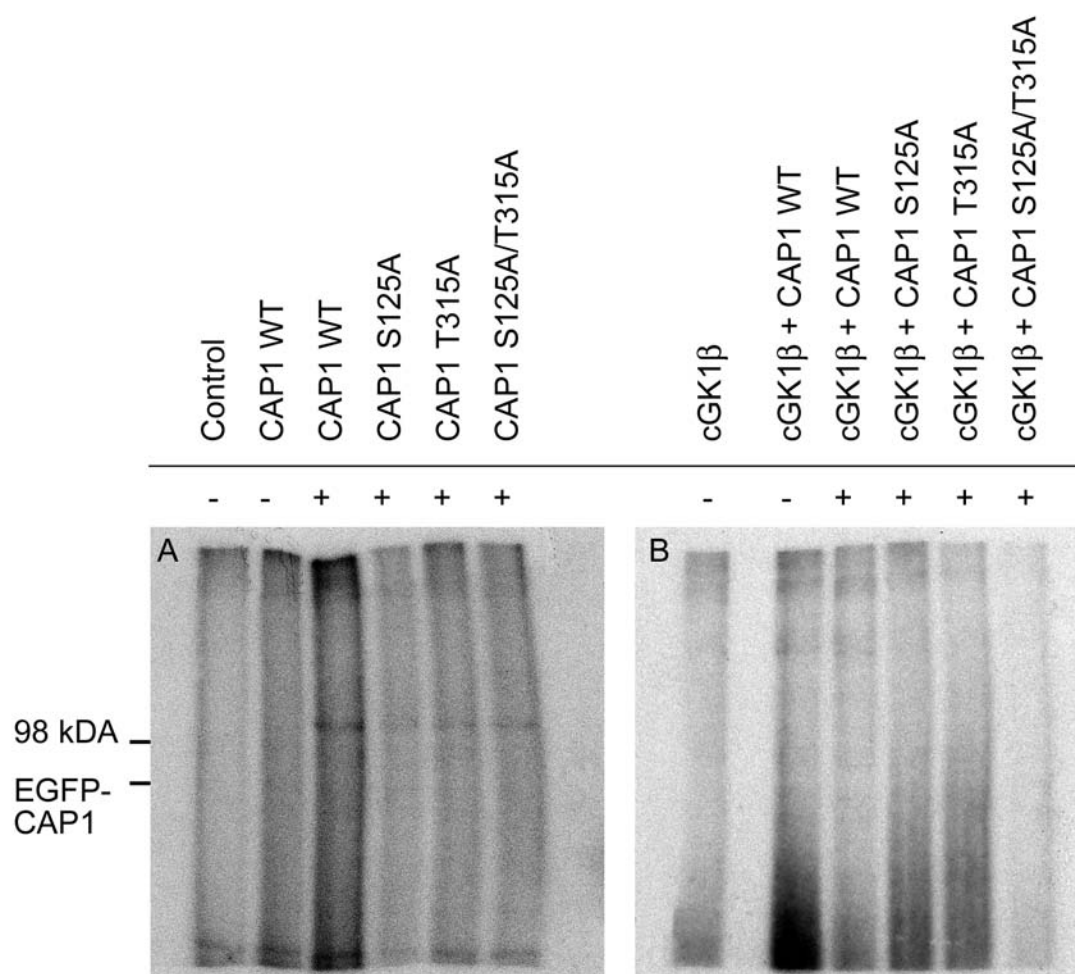


Abbildung C.14 Keine Phosphorylierung von CAP1 in PtK₂-Zellen. PtK₂-Zellen wurden mit WT CAP1 oder einer der Mutanten S125A, T315A, S125A/T315A alleine (Gel A) oder zusammen mit cGK1β (Gel B) transfiziert. Die mit (+) gekennzeichneten Proben wurden für 20 min mit 50 μM 8-pCPT-cGMP zur cGK1β- (Gel B) bzw. für 20 min mit 5 μM Forskolin zur cAK-Aktivierung (Gel A) stimuliert. Nach Immunpräzipitation von CAP1 und Auftrennung durch SDS-Page wurde ein ³²P-Orthophosphat-Einbau durch Autoradiographie visualisiert. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für 2–3 getrennte Experimente.

C.3.4 Keine Phosphorylierung von CAP1 durch cGK 1β und cAK in PtK₂-Zellen

Die Phosphorylierung von CAP1 und CAP1-Mutanten durch cAK und cGK 1β wurde analysiert durch Beladung transfizierter Zellen mit ³²P-Orthophosphat und anschließender Stimulation entweder mit Forskolin oder mit 8-pCPT-cGMP.

PtK₂ Zellen wurden entweder mit einem der CAP1-pEGFP-C1 Konstrukte zusammen mit pCMV-cGK 1β oder nur mit einem der CAP1-pEGFP-C1 Konstrukte transfiziert. Diejenigen Zellen, die mit pCMV-cGK 1β transfiziert wurden, wurden für 20 min mit 50 μM 8-pCPT-cGMP inkubiert. Die Zellen die nur eines der EGFP-CAP1 Konstrukte

C. Resultate

enthielten, wurden für 10 min mit 5 μ M Forskolin stimuliert.

Um bei der Autoradiographie den Hintergrund gering zu halten, mussten die EGFP-CAP1 Varianten, wie unter \triangleright **Kap. B.5.6 (S. 51)** beschrieben, immunpräzipitiert werden. Die Immunpräzipitation wurde im Vorfeld zunächst in nicht radioaktiven Versuchen erprobt (\triangleright **Abb. C.13**).

Das Immunpräzipitat wurde durch SDS-Page aufgetrennt und die getrockneten radioaktiven Gele mit Kodak X-OMAT AT Filmen exponiert. Überraschenderweise zeigte keine der EGFP-CAP1 Varianten eine Phosphorylierung nach Forskolin- oder 8-pCPT-cGMP-Stimulation (\triangleright **Abb. C.14**).

C.4 Charakterisierung von VASP -/- Mäusen

C.4.1 Plättchendichte und Membranprotein-Expression

Um auszuschließen, dass Unterschiede in der Aktivierbarkeit zwischen VASP -/- und WT Thrombozyten auf einer unterschiedlichen Basalexpression von Membranproteinen beruhen, wurde durchflusszytometrisch die Menge dieser Proteine auf der Oberfläche von Thrombozyten bestimmt. Die Auswahl der Proteine richtete sich nach dem anhand von Experimenten mit genetisch veränderten Mäusen gewonnenen Modell der Adhäsion, Aktivierung, Sekretion und Aggregation muriner Plättchen. Ein umfassendes Review hierzu wurde von Nieswandt et al. veröffentlicht¹⁰⁹. Eine Übersicht und Beschreibung der verwendeten Antikörper ist in \triangleright **Tab. B.6 (S. 22)** wiedergegeben. Weiterhin wurde die Plättchendichte im Blut von VASP -/- und WT Mäusen bestimmt. Sowohl die Expression der untersuchten Membranproteine als auch die Plättchendichte waren in VASP -/- Mäusen gegenüber WT-Mäusen unverändert (\triangleright **Abb. C.15**).

Im folgenden wurden nun Parameter analysiert, die Auskunft geben über die Prozesse der in-vitro Adhäsion (Flusskammer), Aggregation (GPIIb/IIIa Aktivierung) und Sekretion (p-Selektin Expression, Serotonin Sekretion).

C.4.2 GP IIb/IIIa Aktivierung (Integrin α IIb β 3)

Wenn Plättchen gegenüber Agonisten exponiert werden, wird der GPIIb/IIIa-Rezeptor aktiviert (*inside-out signaling*) und bindet Fibrinogen. Über Fibrinogen-Brücken kommt es

C.4. Charakterisierung von VASP ^{-/-} Mäusen

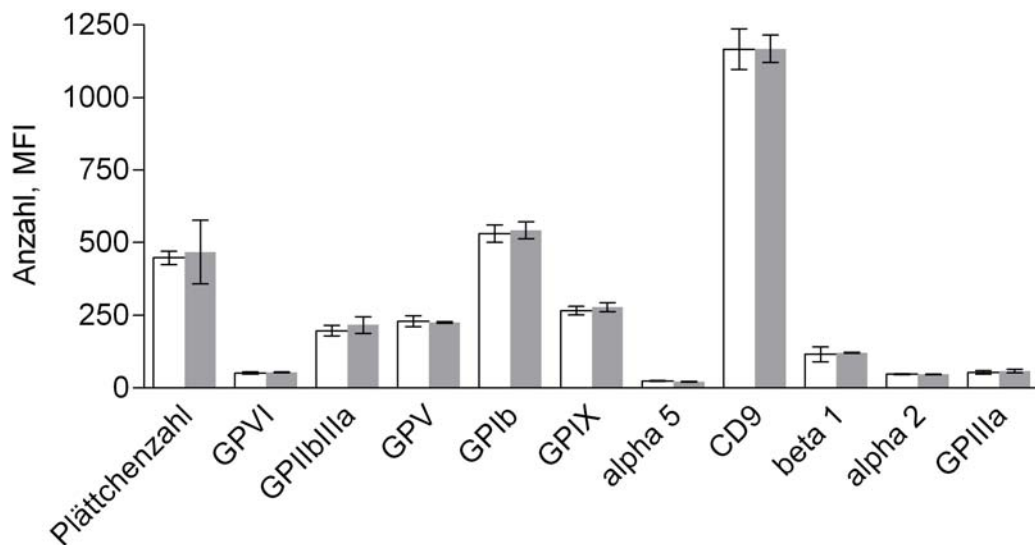


Abbildung C.15 Basalexpression thrombozytärer Membranproteinen und Plättchendichte in WT und VASP ^{-/-} Mäusen. 50 μ l gewaschenes Vollblut wurde mit dem jeweiligen mAb (JAQ1 (GPVI), JON/A (aktiviertes GPIIb/IIIa), Xia.B4 (GPIX), Tap.A12 (Integrin α 5), Nyn.H3 (CD9), Sam.G4 (Integrin β 1), Luc.A5 (GPIIIa)) für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 500 μ l PBS verdünnt. Die Fluoreszenz (MFI = *mean fluorescence intensity*) wurde auf einem Becton Dickinson FACSCalibur gemessen. WT = weiße Balken, VASP ^{-/-} = graue Balken. Mittelwert \pm SD (n = 3).

zur Quervernetzung von Thrombozyten und zur Thrombusbildung. Kürzlich ist der monoklonale Antikörper JON/A (\triangleright **Tab. B.6, S. 22**) entwickelt worden, der spezifisch nur den aktivierten murinen Fibrinogen-Rezeptor erkennt. Er wurde in dieser Arbeit erstmalig zur Bestimmung des Einflusses von VASP auf die GPIIbIIIa-Aktivierung verwendet.

Zyklische Nukleotide inhibieren alle Schritte der Plättchenaktivierungs-Kaskade. Da VASP ein Substrat der cGK und cAK ist, wurde angenommen, dass VASP für einige dieser inhibitorischen Effekte verantwortlich sein könnte. Um den Effekt von VASP auf das Ansprechverhalten von murinen Plättchen auf cGMP zu untersuchen, wurden deswegen Thrombozytensuspensionen mit 200 μ M des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP vorinkubiert und anschließend mit einem Agonisten aktiviert.

Wir konnten keinen signifikanten Unterschied der GPIIbIIIa-Aktivierung auf Thrombozyten zwischen VASP ^{-/-} und WT Mäusen feststellen. Es ergaben sich auch keine Differenzen nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP (\triangleright **Abb. C.16**).

C. Resultate

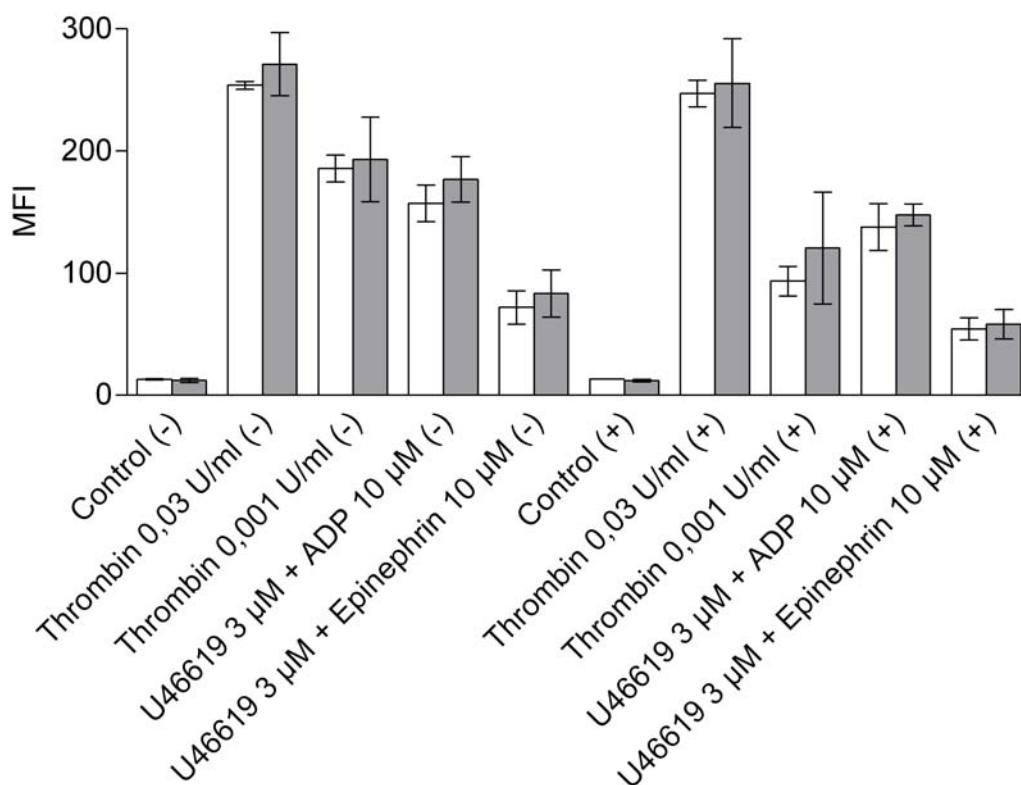


Abbildung C.16 GPIIb/IIIa-Aktivierung auf Thrombozyten bei VASP^{-/-} und WT Mäusen. 50 µl WP wurden mit dem jeweiligen Agonisten und dem mAb JON/A^{PE} für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 500 µl PBS verdünnt. Für die Experimente mit 8-pCPT-cGMP wurden die Proben 20 min mit 200 µM 8-pCPT-cGMP vorinkubiert (Proben mit (+) gekennzeichnet). Es wurden parametrische t-Tests durchgeführt und ein Effekt mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Thrombozyten von WT und VASP^{-/-} Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Die MFI (*mean fluorescence intensity*) wurde auf einem Becton Dickinson FACSCalibur gemessen. WT = weiße Balken, VASP^{-/-} = graue Balken. Mittelwert \pm SD (n = 4).

C.4.3 p-Selektin Expression und Serotonin Sekretion

Neben der Aggregation, ausgelöst durch die Aktivierung des GPIIb/IIIa, gehört die Sekretion von Thrombozyten-Granula zu den entscheidenden Ereignissen, die zur Bildung des primär hämostatischen Thrombus führen. Als Marker für die Sekretion von α -Granula bestimmten wir die p-Selektin Expression und als Marker für die Sekretion der δ -Granula (*dense granules*) die Serotonin Sekretion nach Aktivierung der Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Assay zur Messung der Freisetzung lysosomaler Glykosidasen etabliert, die in den Lysosomen (γ -Granula) gespeichert sind. Diese werden ebenfalls nach Aktivierung der Thrombozyten sezerniert. Das Verfahren beruht auf der fluoreszierenden Eigenschaft von 4-Methylumbelliferon.

C.4. Charakterisierung von VASP ^{-/-} Mäusen

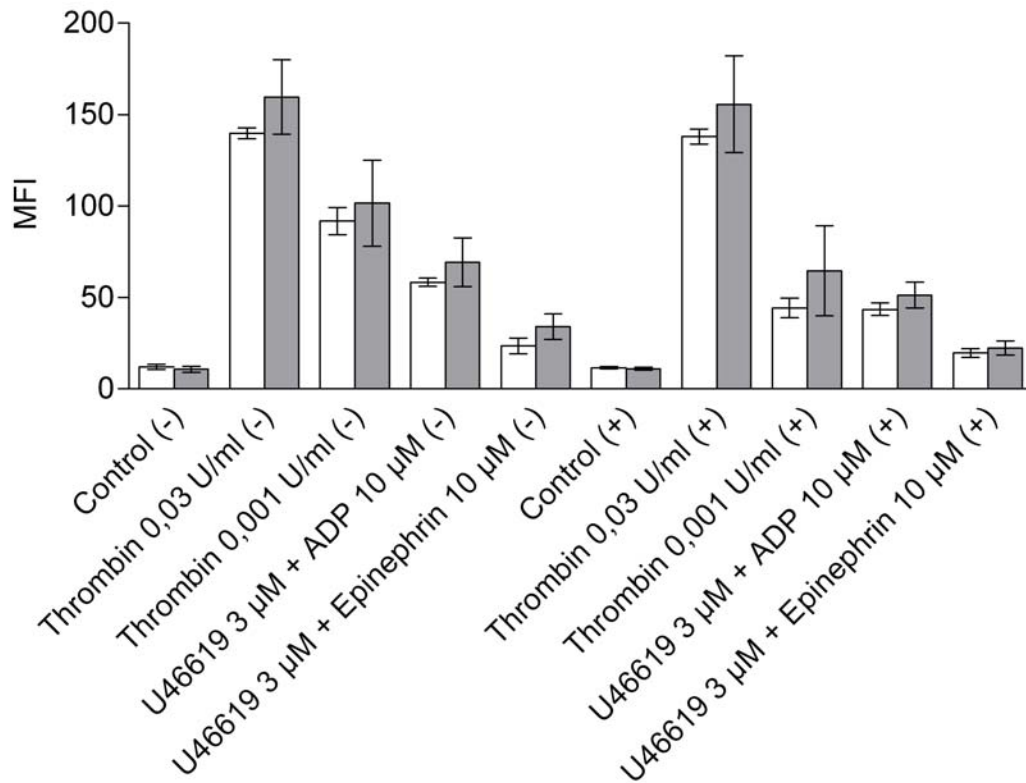


Abbildung C.17 p-Selektin Expression auf Thrombozyten von VASP ^{-/-} und WT Mäusen. 50 μl WP wurden mit dem jeweiligen Agonisten und dem mAb Wug.E6^{FITC} für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und dann mit 500 μl PBS verdünnt. Für die Experimente mit 8-pCPT-cGMP wurden die Proben 20 min mit 200 μM 8-pCPT-cGMP vorinkubiert (Proben mit (+) gekennzeichnet). Es wurden parametrische t-Tests durchgeführt und ein Effekt mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Thrombozyten von WT und VASP ^{-/-} Mäusen wurde nicht festgestellt. Die MFI (*mean fluorescence intensity*) wurde auf einem Becton Dickinson FACSCalibur gemessen. WT = weiße Balken, VASP ^{-/-} = graue Balken. Mittelwert ± SD (n = 4).

Vorversuche ergaben eine im Verhältnis zum Mittelwert größere Standardabweichung als beim p-Selektin und Serotonin Assay, so dass das Verfahren zur Untersuchung der VASP ^{-/-} nicht eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Kinetische Unterschiede der Sekretion unterschiedlicher Granula wurden nicht untersucht.

Im Falle des p-Selektin Assays wurden zusätzlich Proben mit 200 μM des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP vorinkubiert. Es wurde in Vorversuchen mit humanen Thrombozyten gezeigt, dass das Verhältnis von sezerniertem Serotonin zu gesamtem intrazellulärem Serotonin nach Aktivierung der Thrombozyten durch die Inkubation mit radioaktivem Serotonin nicht verändert wird (Daten nicht gezeigt).

Sowohl für die p-Selektin Expression (▷ **Abb. C.17**) als auch die Serotonin Sekretion

C. Resultate

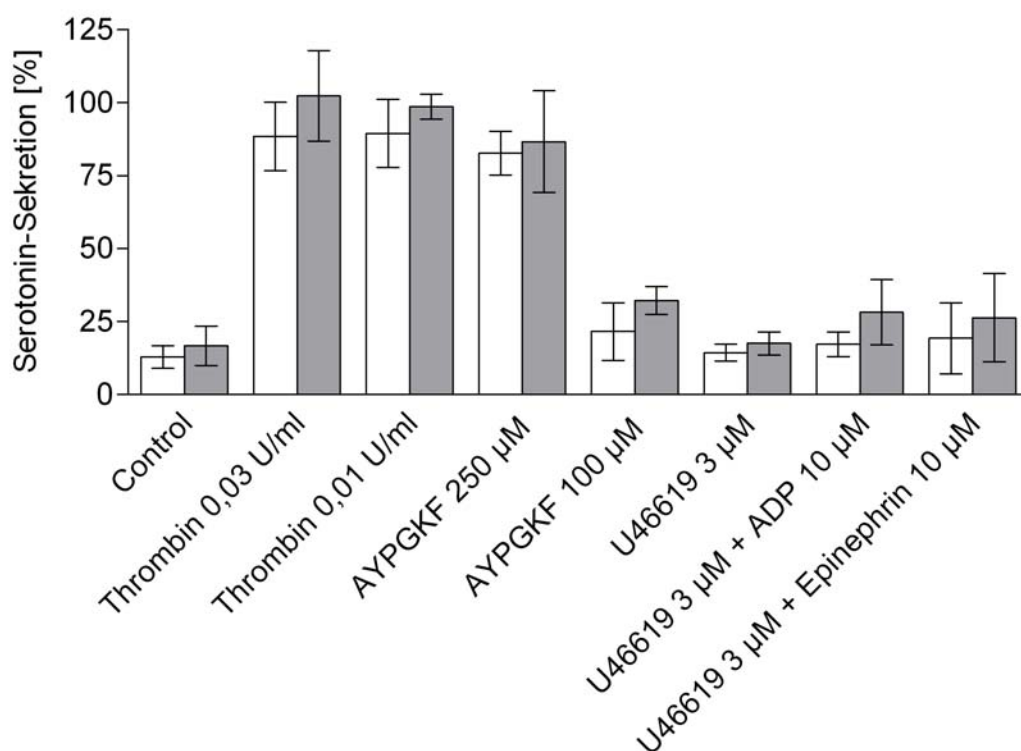


Abbildung C.18 Serotonin Sekretion bei VASP^{-/-} und WT Mäusen. WP wurden mit 4 µCi/ml ³Serotonin für 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend pelletiert und in Tyrodes Puffer resuspendiert. Vor Stimulation wurde 4 µM Fluoxetin hinzugefügt. Um den totalen intrazellulären Serotonin-Gehalt zu bestimmen wurde eine Probe mit 0,2% Triton X-100 lysiert. Alle Proben wurden nach 5 min mit eiskaltem 0,05 M EDTA enthaltendem 0,633 M Formaldehyd abgestoppt. Es wurden parametrische t-Tests durchgeführt und ein Effekt mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Thrombozyten von WT und VASP^{-/-} Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Aufgetragen ist der sezernierte Anteil des totalen intrazellulären Serotonins. WT = weiße Balken, VASP^{-/-} = graue Balken. Mittelwert±SD (n = 6).

(▷ **Abb. C.18**) konnten wir über ein breites Spektrum an Agonisten keinen signifikanten Unterschied zwischen VASP^{-/-} und WT Mäusen feststellen. Es ergaben sich im Falle der p-Selektin Expression auch keine signifikanten Ungleichheiten nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP.

C.4.4 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen

Als initialer Mechanismus der primären Hämostase wurde die Adhäsion von Thrombozyten und konsekutive Thrombusbildung untersucht. Hierzu wurde murines Vollblut über einen mit fibrillärem Kollagen beschichteten Objektträger geleitet, um in-vitro die Ver-

C.4. Charakterisierung von VASP ^{-/-} Mäusen

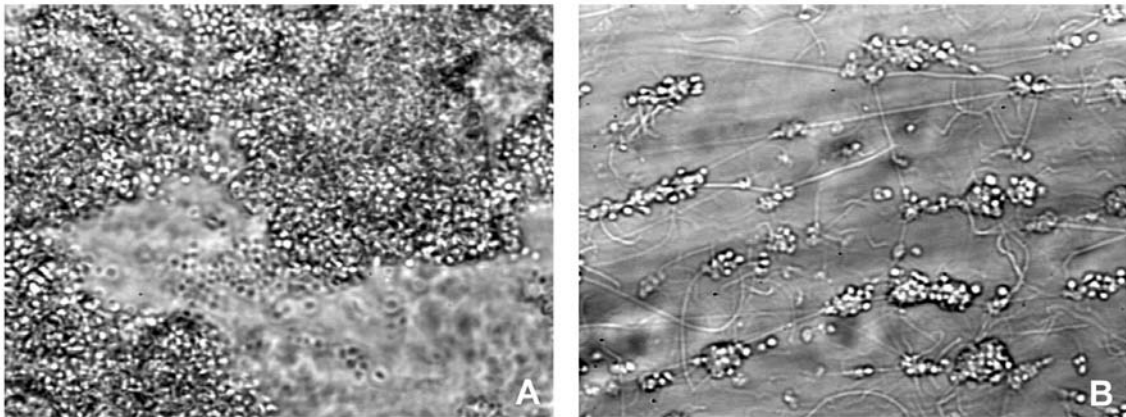


Abbildung C.19 Inhibition der Thrombusformation auf Kollagen beschichteten Objektträgern in der Flusskammer bei VASP ^{-/-} und WT Mäusen. (A) VASP ^{-/-}, (B) WT. Repräsentative Mikrophotographien der Thrombusformation von Thrombozyten aus VASP ^{-/-} und WT Mäusen. Die Inhibition der Thrombusbildung durch 100 μ M SNP ist in Thrombozyten von VASP ^{-/-} Mäusen deutlich eingeschränkt. Die Phasenkontrastbilder wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Fa. Zeiss) bei 63 \times Vergrößerung aufgenommen. Für nähere Erläuterungen siehe Bildunterschrift \triangleright **Abb. C.20**.

hältnisse eines Endotheldefektes, bei dem die subendotheliale Matrix exponiert wird, zu simulieren.

Wie in \triangleright **Abb. C.20** gezeigt, ist die Inhibition der Thrombusformation der VASP ^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen mit dem NO Donor SNP signifikant beeinträchtigt. Messungen mit dem stabilen Prostacyclin Analogon Iloprost oder mit dem anti-GPVI Antikörper JAQ1 + Thromboxan ergaben keine signifikanten Unterschiede. In \triangleright **Abb. C.19** sind repräsentative Mikrophotographien der in-vitro Thrombusformation wiedergegeben.

C. Resultate

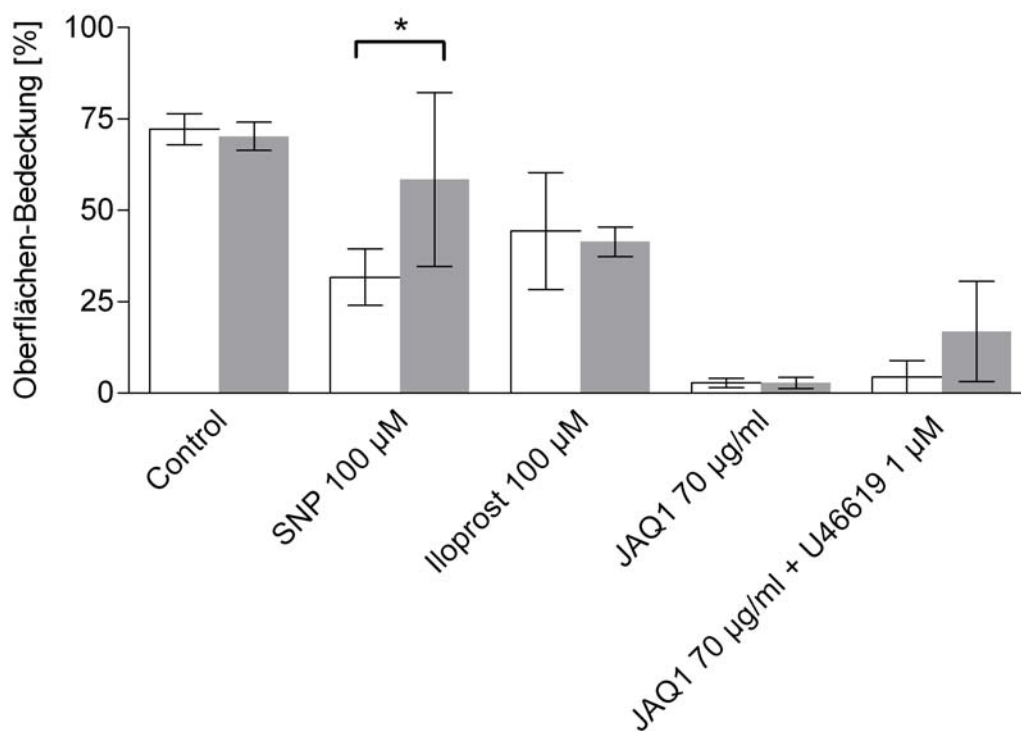


Abbildung C.20 Beeinträchtigte SNP-induzierte Inhibition der Thrombusformation bei VASP^{-/-} Mäusen in der Flusskammer. Heparinisiertes murines Vollblut (1 Vol.) wurde mit 0,5 Vol. Tyrodes Puffer verdünnt. Mit Ausnahme der Kontrolle wurden die Proben mit 100 µM SNP (1 min) oder 100 µM Iloprost (1 min) oder 70 µg/ml JAQ1 vorinkubiert. Die Flusskammer wurde für 7 min mit Blut perfundiert und anschließend gespült. Der mittlere prozentuale Anteil X_i der mit Thrombozyten bedeckten Oberfläche wurde anhand von mind. 5 unterschiedlichen mikroskopischen Aufnahmen pro Versuch i ($i = 1-n$) berechnet. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert aus allen X_i -Werten aus n Versuchen für jede Art der Stimulation (Kontrolle, SNP, Iloprost, JAQ1, JAQ1 + Thromboxan). Parametrische t-Tests wurden durchgeführt und ein Effekt mit $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. WT = weiße Balken, VASP^{-/-} = graue Balken. Mittelwert \pm SD ($n = 4-6$, für Iloprost $n = 2$).

Kapitel D

Diskussion

D.1 Monitoring von Clopidogrel – 84

- D.1.1 Messung des individuellen Ansprechens auf Clopidogrel – 84
- D.1.2 Plättchen Aggregation – 85
- D.1.3 PFA100 – 85
- D.1.4 p-Selektin-Expression – 85
- D.1.5 VASP-Phosphorylierung – 86
- D.1.6 Vorteile der pVASP-Assays – 87
- D.1.7 Limitationen der pVASP-Assays – 87

D.2 Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel – 88

- D.2.1 Einfluss des P2Y₁₂ auf die PAR-ind. Aggregation – 88
- D.2.2 Einfluss des P2Y₁₂ auf die PAR- und TP-ind. Serotonin-Sekretion – 88

D.3 CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten – 89

- D.3.1 Phosphorylierung von CAP1 in intakten humanen Thrombozyten nach SNP Stimulation – 89
- D.3.2 Einfluss von CAP auf das Aktin-Zytoskelett – 89
- D.3.3 Keine Phosphorylierung von CAP1 durch cGK 1 β und cAK in Ptk₂-Zellen – 91

D.4 Charakterisierung von VASP -/- Mäusen – 93

- D.4.1 GPIIb/IIIa Aktivierung (Integrin α IIb β 3) – 93
 - D.4.2 p-Selektin Expression und Serotonin Sekretion – 95
 - D.4.3 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen – 96
 - D.4.4 Schlussfolgerung: Einfluss von VASP auf die Thrombozytenfunktion – 97
-

D. Diskussion

D.1 Monitoring von Clopidogrel

D.1.1 Messung des individuellen Ansprechens auf Clopidogrel

Das individuell unterschiedliche Ansprechen auf Clopidogrel kann durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Diskutiert werden eine erhöhte Sensitivität ruhender Plättchen, dysfunktionaler Cytochrome P-450 Metabolismus (entweder aufgrund erblicher Defekte oder Interaktion mit anderen Medikamenten bspw. Statinen), genetischer Polymorphismus des P2Y₁₂-Rezeptors, Unterschiede bei der Resorption oder Kombinationen dieser Faktoren^{22,40,91,92}. Obwohl die Rate beobachteter Komplikationen niedriger ist als die Inzidenz der Clopidogrel-Resistenz, haben neuere Studien gezeigt, dass *non-responder* ein höheres Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes haben^{7,58,99}. Da die antithrombozytäre Behandlung wesentlich für die Verhinderung der subakuten Stent-Thrombose ist, kommt der Überwachung ihrer Wirksamkeit besonders bei Patienten nach PTCA (perkutane transluminale Angioplastie) große Bedeutung zu^{149,151}.

Die Clopidogrel-Resistenz kann anhand einer Vielzahl von Parametern, die die Plättchenaktivität widerspiegeln, ermittelt werden. Bisher ist kein allgemein akzeptiertes Standardmessverfahren erhältlich. Aus diesem Grund ist das genaue Ausmaß der Variabilität des individuellen Ansprechens auf Clopidogrel unbekannt. Das verbreitetste Verfahren ist die Plättchenaggregation. Gewöhnlich werden Patienten deren Plättchen-Aggregation um < 10% durch Clopidogrel gehemmt wird als resistent (*non-responder*) und Patienten mit < 30% Hemmung als *weak-responder* angesehen^{57,107}. Bei den pVASP-Assays nähert sich der PRI dem Wert 1 bei völligem Fehlen eines Clopidogrel-Effektes. Ein PRI-Wert zwischen 0,5 und 1 würde einem *weak-responder* entsprechen^{7,56}. Eine Übersicht über neuere Methoden zur Ermittlung der Plättchenfunktion wurde von Michelson et al. veröffentlicht¹⁰².

Die einheitliche Etablierung von Messverfahren zur Bestimmung der Plättchenhemmung würde die Möglichkeit eröffnen klinische Studien durchzuführen, um auch für *weak-* bzw. *non-responder* Behandlungsempfehlungen zu entwickeln. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass eine höhere Clopidogreldosis ein unzureichendes Ansprechen überwinden könnte⁵⁸. Bezüglich des *Monitoring* der Therapie mit Acetylsalicylsäure gilt eine analoge Problematik wie bei Clopidogrel.

D.1.2 Plättchen Aggregation

Die Plättchen-Aggregation ist die bisher am weitesten verbreitete Methode zur Messung der Reaktivität gegenüber ADP-Rezeptor-Antagonisten. In gesunden Probanden und in Patienten mit stabilem Koronarsyndrom führt die Clopidogrel-Einnahme zu einer Reduktion der ADP-induzierten Aggregation um 35–60%^{20,57,84,99,107}. Ähnliche Werte erhielten wir in unserer Probandenstudie.

Bei der Messung der Plättchen-Aggregation bestehen eine Reihe technischer Schwierigkeiten. Insbesondere kann die Proben-Prozessierung zu einer Präaktivierung und/oder Desensitivierung der Thrombozyten führen²². Dies kann die Plättchen-Aggregation in einer unvorhersehbaren Art und Weise beeinflussen. Weiterhin bestehen keine einheitlichen Standards. In einem klinischen Umfeld ist ebenso die Beeinflussbarkeit der Aggregation durch andere Medikamente als ADP-Rezeptor-Antagonisten von besonderer Relevanz. In den bisher publizierten Studien zur Clopidogrel-Resistenz erhielten alle Patienten neben Clopidogrel zusätzlich Acetylsalicylsäure, die sowohl die ADP- als auch die Kollagen-induzierte Aggregation hemmt. Bei einer Ko-Medikation mit weiteren antithrombozytären Wirkstoffen muss die Aggregation vor und nach der ersten Einnahme von Clopidogrel durchgeführt werden, um den Clopidogrel-Effekt zu isolieren. Dies macht aber eine im hohen Maße reproduzierbare Aggregationsmessung erforderlich.

D.1.3 PFA100

In dieser Studie konnten wir keinen signifikanten Effekt auf die Okklusionszeit, gemessen sowohl mit Kollagen/ADP- als auch Kollagen/Epinephrin-Einmalpatronen des PFA100, feststellen. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit anderen Studien, die den Nutzen des PFA100 zur Messung der Wirksamkeit von Clopidogrel evaluiert haben^{54,70}. Allerdings konnte kürzlich ein Langzeiteffekt von Clopidogrel auf die mit dem PFA100 gemessene Okklusionszeit belegt werden, der 5 Tage nach Behandlungsbeginn evident wurde¹¹⁹. Dieser Effekt zeigte allerdings eine bemerkenswerte Variabilität.

D.1.4 p-Selektin-Expression

Neben der Aggregation wird die durchflusszytometrische Bestimmung der ADP-induzierten p-Selektin Oberflächenexpression häufig zur Bestimmung der Clopidogrel-Wirksamkeit benutzt. Die in diesen Experimenten verwendete ADP-Konzentration ist allerdings we-

D. Diskussion

sentlich höher als die zur Stimulation einer Aggregation erforderliche Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$ gegenüber 5 $\mu\text{mol/l}$)^{20,57}. Die p-Selektin Oberflächenexpression bei Verwendung derart hoher ADP-Konzentrationen muss aber teilweise als unspezifisch betrachtet werden. In der vorliegenden Studie stimulierten wir Plättchen mit moderaten ADP-Konzentrationen (5 $\mu\text{mol/l}$) um Sekundäreffekte, die nicht direkt mit einer purinergen Stimulation assoziiert sind, auszuschließen. In diesen Experimenten konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der Clopidogrel- und der Placebo-Gruppe ermitteln. Daher erscheint die p-Selektin-Messung eher ungeeignet zur Bestimmung der Clopidogrel-Resistenz.

D.1.5 VASP-Phosphorylierung

cGMP- und cAMP-abhängige Signalwege sind die bedeutendsten Inhibitoren der Plättchen-Aktivierung in-vivo. Ihre Stimulation führt zur Phosphorylierung zahlreicher Substrate der cGK und cAK. Das Protein VASP ist ein umfangreich charakterisiertes cGK- und cAK-Substrat und ist als Parameter der Plättchenaktivierung gut etabliert^{3,7,56,113}. In den meisten Studien erfolgt die Bestimmung der VASP-Phosphorylierung mittels Western blot. Diese ist aber weder quantitativ noch kann sie in Vollblut durchgeführt werden. Der VASP-FACS Assay erlaubt demgegenüber eine einfache und präzise Messung der VASP-Phosphorylierung im Vollblut¹²⁸.

In dieser Studie verwendeten wir erstmals einen neu etablierten chromogenen EIA zur Messung der VASP-Phosphorylierung. Dieser Assay bestimmt gleichzeitig phosphoryliertes VASP und Gesamt-VASP. Dies erlaubt eine einfache Daten-Normalisierung durch Korrektur der Variabilität in Zellzahl und Proteingehalt der Proben. Unsere Daten zeigen, dass pVASP-Werte gemessen durch FACS und EIA miteinander korrelieren ($r^2 = 0,750$, $r = 0,866$).

In unserer Studie führte die Clopidogrel-Einnahme zu einer Reduktion der ADP-induzierten Inhibition der Adenylatzyklase in Plättchen um 52%, gemessen anhand der Abnahme der VASP-Phosphorylierung. Die Clopidogrel- und Placebogruppe konnten klar voneinander unterschieden werden. Die PRI_{EIA} -Werte korrelierten mit der ADP-induzierten Aggregation ($r^2 = 0,67$, $r = 0,81$). Weil wir zwei völlig unterschiedliche Tests einsetzten, erscheint die Korrelation zufriedenstellend. Aspirin interferierte nicht mit der VASP-Phosphorylierung, wohingegen die ADP-induzierte Aggregation erheblich gehemmt war.

D.1.6 Vorteile der pVASP-Assays

Die pVASP-Assays werden im Gegensatz zur Aggregation nicht durch Acetylsalicylsäure beeinflusst. Ein einziger FACS- oder EIA-Test ist zur Quantifizierung der Plättchen-Inhibition ausreichend. Die Notwendigkeit einer zusätzlichen Messung vor Behandlungsbeginn entfällt. Die Proben-Prozessierung ist deutlich vereinfacht, weil beide pVASP-Tests mit Vollblut durchgeführt werden. Frische Blutproben können auch noch Stunden nach Blutentnahme vermessen werden, ohne dass das Resultat der Analyse beeinflusst wird, und lysierte Proben können bei -21°C für Monate aufgehoben werden. Der pVASP-FACS Assay wurde bereits zur Messung des individuellen Ansprechens auf Clopidogrel in explorativen Studien mit Patienten nach PTCA eingesetzt^{3,7,56}. Kürzlich wurde er auch erfolgreich in der ALBION-Studie¹⁰⁵ zur Bestimmung der besten Höhe der *loading-dose* für Clopidogrel eingesetzt. Der pVASP-EIA ist bereits für experimentelle Zwecke verbreitet¹⁴⁷.

D.1.7 Limitationen der pVASP-Assays

In der vorliegenden Studie haben wir die Effekte einer Ko-Medikation mit anderen Wirkstoffen, wie sie im klinischen Umfeld zu erwarten wäre, nicht untersucht. Die Einsetzbarkeit der pVASP-Assays in der klinischen Routinediagnostik wird derzeit erforscht. Insbesondere Medikamente, die den NO/cGMP- (NO-Donoren) oder den cAMP-Signalweg beeinflussen, könnten die pVASP-Analyse der Wirksamkeit von Thienopyridinen komplizieren. Dennoch scheinen die pVASP-Assays in Spezifität, Quantifizierbarkeit und Reliabilität früheren Assays (z.B. Aggregation und p-Selektin-Expression) zur Messung des Ansprechverhaltens auf Thienopyridine überlegen. Im Vergleich zu neueren Verfahren zur Bestimmung des Clopidogrel-Effektes (z.B. VerifyNow, Plateletworks, Thrombelastograph Platelet Mapping System, Impact cone etc.) besteht bei den pVASP-Assays eine engere Abhängigkeit von der Zielstruktur des Clopidorels, dem P2Y₁₂-Rezeptor¹⁰².

D.2 **Neue Aspekte der Wirkungsweise von Clopidogrel**

D.2.1 **Einfluss des P2Y12 auf die PAR-induzierte Aggregation**

Thrombin vermittelt seine Effekte in Thrombozyten hauptsächlich über G-Protein gekoppelte Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs). Es konnte nachgewiesen werden, dass PARs sowohl an $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{12/13}$ koppeln¹¹⁵ (▷ **Kap. A.2.1, S. 6**). Thrombin bewirkt via $G\alpha_q$ eine Reihe verschiedener Thrombozyten-Antworten, u.a. die Sekretion von ADP aus δ -Granula. Über die Stimulation des P2Y12-Rezeptors durch ADP bedingen Thrombin und Thrombin-Rezeptor-aktivierende Peptide eine $G\alpha_i$ -Aktivierung, die die Thrombozyten-Aktivierung verstärkt⁸⁶. In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass wichtige Parameter der Plättchen-Aktivierung nach Stimulation mit Thrombin abhängig vom P2Y12-Rezeptor sind. So zeigte sich, dass die Phosphorylierung von ERK2³⁶ und der PKB⁸⁷ (=Akt) $G\alpha_i$ -vermittelt ist.

Unklar war, ob Clopidogrel ex-vivo deswegen durch Hemmung des P2Y12 zur Schwächung einer Thrombin-induzierten Plättchen-Aktivierung führt. Unsere Messungen zeigen klar, dass sowohl nach Stimulation des PAR1 über Trap6 als auch des PAR4 über AY-NH₂ die Aggregation in der Clopidogrel-Gruppe deutlich reduziert war. Es ist naheliegend, dass die durch ex-vivo Versuche erhaltenen Ergebnisse die in-vivo Verhältnisse widerspiegeln.

D.2.2 **Einfluss des P2Y12 auf die PAR- und TP-induzierte Serotonin-Sekretion**

Zur Bestätigung der Aggregations-Ergebnisse bestimmten wir als weiteren Parameter die Serotonin-Sekretion aus δ -Granula. Analog zur Aggregation wurde auch die Trap6- bzw. AY-NH₂-induzierte Serotonin-Sekretion durch Clopidogrel teilweise gehemmt.

Der durch Thromboxan A2 aktivierte TP-Rezeptor koppelt an $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ (▷ **Tab. A.1, S. 3**). Da seine Stimulation also zu einer Aktivierung gleichartiger $G\alpha$ -Untereinheiten führt wie bei PAR1 und PAR4, sollte eine Hemmung des P2Y12 zu einer Abnahme der Serotonin-Sekretion nach Stimulation der Plättchen mit TxA2 führen. Die Resultate unserer Messungen konnten genau das belegen und unterstreichen somit die zentrale Bedeutung $G\alpha_i$ -vermittelter Signalwege in Thrombozyten.

D.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

Unsere Versuche geben folglich neue Einblicke in die Mechanismen, die zu einer Reduktion des Thrombose-Risikos von Patienten mit STEMI/non-STE-ACS und nach PCI durch Clopidogrel führen. Unterstützende Ergebnisse wurden kurz nach Abschluss der Experimente von Behan et al.⁹ veröffentlicht.

D.3 CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

D.3.1 Phosphorylierung von CAP1 in intakten humanen Thrombozyten nach SNP Stimulation

Die Stimulation von Thrombozyten mit dem NO-Donor SNP führt innerhalb von Millisekunden zu ihrer Inhibition. In bisherigen Ansätze zur Identifikation von cGK-Substraten in Thrombozyten wurden Plättchen mehrere Minuten mit NO-Donoren oder cGMP-Analoga inkubiert und anschließend das Phosphoproteom analysiert^{18,19}. In Anbetracht der Kinetik der Thrombozyten-Hemmung durch SNP analysierten wir hier erstmals die cGK-vermittelte Proteinphosphorylierung in intakten humanen Plättchen nach einer Inkubationsdauer von nur 15 s mit 100 μ M SNP. Dieses Vorgehen gewährleistet eine Erfassung der für den Prozess der Inhibition physiologisch möglichst relevanten cGK-Substrate. Das Phosphoproteom wurde durch 2-dimensionale Gelelektrophorese separiert. Hierbei wurde zunächst das *adenylyl cyclase associated protein* (CAP1) als neues Substrat in humanen Thrombozyten identifiziert.

D.3.2 Einfluss von CAP auf das Aktin-Zytoskelett¹

CAP wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae*^{37,39} (dort auch Srv2 genannt) und anschließend in einem breiten Spektrum von Organismen inkl. Pflanzen und Säugetiere entdeckt (\triangleright **Tab. D.1**). Es besteht aus drei Domänen:

Die N-terminale Domäne bindet in Hefen (*S. cerevisiae* und *S. pombe*) Adenylatzyklase (Cyr1), die durch die kleinen G-Proteine Ras1/2p aktiviert wird^{49,103,112}. Perturbationen der RAS Funktionen führen zu einer Störung des Zellwachstums. Für die In-

¹Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über die publizierten CAP Daten. Da CAP1 erst im Verlauf der Dissertation identifiziert wurde, ist der Text dieses Kapitels nicht in der „Einleitung“ der Doktorarbeit, sondern in der „Diskussion“ untergebracht, um die Chronologie der Ergebnisse besser wiederzugeben.

D. Diskussion

Organismus	CAP Größe, AS	Akzessions Nummer
Säugetiere		
Homo sapiens (CAP1)	475	Q01518
Homo sapiens (CAP2)	476	P40123
Rattus norvegicus (CAP1)	474	A46584
Rattus norvegicus (CAP2)	476	JC4386
Mus musculus (CAP1)	474	I49572
Mus musculus (CAP2)	476	BAB26786
Hefen		
Saccharomyces cerevisiae	526	CAA86887
Schizosaccharomyces pombe	551	CAB41657
Candida albicans	545	AAD42978
Pilze		
Lentinula edodes	518	BAA26003
Dictyostelium discoideum	464	AAB09713
Pflanzen		
Arabidopsis thaliana	476	CAB80166
Gossypium hirsutum	471	BAA36585
Andere		
Chlorohydra viridissima	481	S47091
Xenopus laevis	475	AAL36889
Drosophila melanogaster	424	AAD27865
	521	AAF51408
Caenorhabditis elegans	457	AAK68198

Tabelle D.1 CAP Homologe (angelehnt an Hubberstey et al., FASEB Journal, 2002)

teraktion und Aktivierung von Cyr1 werden in-vivo nur die 36 amino-terminalen AS der Hefe-CAPs benötigt¹³⁵. Eine Clustal-W Analyse aller bekannten 14 CAP Gene zeigt eine extensive Homologie in diesem Abschnitt und beinhaltet insbesondere ein 10 AS langes RLE-Motiv⁸⁰. Trotzdem ist die Adenylatzyklase-Bindungsfunktion in höheren Eukaryoten nicht konserviert.

S. cerevisiae-CAP bindet in-vitro G-Aktin mit einer $K_d = 0,4 \mu\text{M}$, äquivalent zu dem Bindungskoeffizienten des Aktin-sequestrierenden Proteins Thymosin β -4 mit Thrombozyten-Aktin^{43,148}. Immunpräzipitate von Hefe- und Säugetier-CAPs enthalten Aktin, was eine Bindung von CAP an Aktin in-vivo nahelegt^{4,141}. Die Aktin-bindende Funktion von CAP liegt im C-Terminus des Proteins⁵⁵. Das Säugetierhomolog konnte sogar die Funktion des C-Terminus des Hefeproteins ersetzen, was eine funktionelle Konservierung nahe legt. Die an der Aktin-Bindung beteiligten Aminosäurereste konnten bisher allerdings

D.3. CAP1 als mögliches neues cGK-Substrat in Thrombozyten

noch nicht genau charakterisiert werden.

Eine dritte Domäne, die alle CAPs aufweisen, ist ein zentral lokalisierter prolinreicher Abschnitt, der eine Konsensus-Erkennungssequenz für SH3-Domänen-enthaltende Proteine beinhaltet (PXXPPPXP). Die genaue Funktion ist bisher ungeklärt.

Eine Reihe von Veröffentlichungen zeigen, dass CAPs multimere Komplexe mit sich selbst bilden können^{79, 152, 153}. *Two hybrid screens* weisen darauf hin, dass der N-Terminus sowohl mit sich selbst als auch mit dem C-Terminus interagiert. Entsprechend reagiert auch der Carboxy-Terminus sowohl mit sich selbst als auch mit dem NH₂-Terminus⁷⁹.

Säugetiere haben mindestens zwei CAP Homologe, CAP1 und CAP2. In Säugetierzellen ist CAP diffus im Zytoplasma verteilt und kann sich an der Zellmembran und den Lamellipodien migrierender Fibroblasten konzentrieren^{44, 142, 153}. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass humanes CAP1 in Swiss 3T3-Zellen mit Stressfasern ko-lokalisiert⁴⁴ ist. Arbeiten an HEK293-Zellen zeigen, dass humanes CAP1 Teil des Aktin-Cofilin-Komplexes ist, wobei der N-Terminus mit dem Aktin-Cofilin-Komplex interagiert und die Depolymerisation des F-Aktins beschleunigt. Der C-Terminus stimuliert den ADP/ATP Austausch von G-Aktin und erleichtert die Verlängerung der Aktin-Filamente¹⁰⁶. Die Analyse von murinen CAP1 *knock-down* Zellen (NIH3T3, B16F1, Neuro2A) bestätigte, dass das Protein in-vivo die Aktin-Depolymerisation fördert und wichtig für Zellmorphologie, Migration und Endozytose ist. Es ist insbesondere auch notwendig für die korrekte subzelluläre Lokalisierung und Funktion von ADP/Cofilin¹². CAP1 in Verbindung mit ADP/Cofilin ist somit wesentlich für die Aktin-Dynamik der Zelle.

D.3.3 Keine Phosphorylierung von CAP1 durch cGK 1 β und cAK in PtK₂-Zellen

Im Hinblick auf die Daten könnte CAP1 ein negativer Regulator der Aktinpolymerisation in humanen Thrombozyten sein. Bisher gibt es keine Informationen darüber, wie die Interaktion von CAP und Aktin während der Aktivierung von Signalkaskaden reguliert wird⁸⁰. Die Ergebnisse der Untersuchung des Plättchen-Phosphoproteoms geben erste Hinweise darauf, dass CAP1 durch cGK (und/oder cAK s.u.) reguliert werden könnte. Eine theoretische Sequenzanalyse von humanem CAP1 ergab zwei potentielle Phosphorylierungsstellen bei Ser-125 (NRGSK) und Thr-315 (KRATK). Diese Sequenzabschnitte stimmen nur zum Teil mit dem minimalen Motiv für eine effiziente cGK Phosphorylierung (RKXS/T) überein¹³⁷.

D. Diskussion

Um CAP1 als cGK-Substrat zu bestätigen, exprimierten wir den EGFP markierten CAP1 Wildtyp zusammen mit der in Thrombozyten vorliegenden cGK-Isoform cGK 1 β in PtK₂-Zellen. Eine Ko-Expression war notwendig, da PtK₂-Zellen selbst keine cGK exprimieren. Zur anschließenden Identifikation der Phosphorylierungsstellen transfizierten wir die CAP1-Mutanten S125A, T315A oder S125A/T315A, bei denen Serin bzw. Threonin durch Alanin ersetzt wurde. Für die Phosphorylierungsversuche wurden PtK₂-Zellen gewählt, weil deren Einsatz sich hausintern bereits bei der Identifikation von LASP als cGK-Substrat bewährt hatte¹⁸. Da viele der bisher bekannten cGK-Substrate auch durch cAK phosphoryliert werden, stimulierten wir die transfizierten Zellen alternativ zu 8-pCPT-cGMP auch mit Forskolin, einem cAK-Aktivator. In keinem der Experimente konnte eine Phosphorylierung von CAP1 und seinen Varianten nach Forskolin- oder 8-pCPTcGMP-Stimulation in intakten PtK₂-Zellen nachgewiesen werden.

Ursachen auf unterschiedlichen Ebenen könnten hierfür verantwortlich sein:

(1) **Identifikation.** Bei der Separierung über 2-dimensionale Gelelektrophorese können die Spots verschiedener Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt übereinander zu liegen kommen. Bei der massenspektrometrischen Analyse können dann überwiegend Peptide des Proteins identifiziert werden, das nicht für den ³²P-Orthophosphat-Einbau verantwortlich ist, aber in größerer Menge vorliegt. CAP1 wurde in zwei unmittelbar benachbarten Spots identifiziert, die als unterschiedliche Phosphoisoformen interpretiert wurden (\triangleright **Abb. C.9, S. 70**). In diesem Fall hätte CAP1 bei beiden Spots hinterlagert sein müssen.

(2) **cGMP-unabhängige Mechanismen von NO-Donoren.** Eine zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass NO-Donoren neben dem cGMP-Signalweg zusätzliche Signalkaskaden aktivieren¹⁴⁵. Als Schlüsselkriterium für eine sogenannte cGMP-unabhängige Antwort auf NO-Donoren gilt die unvollständige Hemmung durch den selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one). cGMP-unabhängige Signalwege werden häufig, wenn auch nicht exklusiv, bei Verwendung hoher NO-Donor-Konzentrationen beobachtet (μ M–mM). Entsprechend könnte bei Stimulation von Thrombozyten mit 100 μ M SNP CAP1 durch eine Kinase phosphoryliert worden sein, die cGMP-unabhängig aktiviert wurde. Bei Verwendung von 8-pCPT-cGMP im Phosphorylierungsversuch in PtK₂-Zellen würde demzufolge dann die cGK Aktivierung zu keiner Phosphorylierung von CAP1 führen.

(3) **Experimentelle Bedingungen der Phosphorylierung in PtK₂-Zellen.** Eine bis-

D.4. Charakterisierung von VASP -/- Mäusen

her unzureichende experimentelle Optimierung bezüglich der Wahl der verwendeten Zellen, CAP1-Plasmidkonstrukte etc. kann ursächlich für die mangelnde Phosphorylierung von CAP1 sein.

Zukünftige Experimente werden zeigen müssen, ob CAP1 ein Substrat der cGK in Plättchen ist. Als nächster Schritt zur Lösung dieser Frage wäre eine in-vitro Phosphorylierung von rekombinantem CAP1 und massenspektrometrische Bestimmung seiner Phosphorylierungsstellen aufschlussreich.

D.4 Charakterisierung von VASP -/- Mäusen

D.4.1 GPIIbIIIa Aktivierung (Integrin α IIb β 3)

Auf humanen Plättchen kann die aktivierte Form des GPIIbIIIa-Rezeptors spezifisch mit dem monoklonalen Antikörper PAC-1, der mit Fibrinogen um die Bindungsstelle konkurriert, detektiert werden. Bis vor kurzem gab es allerdings keine direkte Möglichkeit den aktivierten GPIIbIIIa-Rezeptor auf murinen Thrombozyten zu beurteilen. Bisher wurde deswegen meistens die Menge an Oberflächen-gebundenem Fibrinogen, das an ein Fluorophor gekoppelt wurde, als indirekter Marker der GPIIbIIIa-Aktivierung verwendet. 2002 beschrieb Nieswandt et al. erstmals den monoklonalen Antikörper JON/A der spezifisch die hoch affine Form des murinen GPIIbIIIa bindet und eine direkte Beurteilung ermöglicht¹¹¹. Diesen Antikörper verwendeten wir für unsere Experimente. Hierbei konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Plättchen von VASP -/- und WT Mäusen nach Stimulation mit einem breiten Spektrum an Agonisten feststellen (▷ **Abb. C.16, S.78**). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Hauser et al.⁶³ und Aszodi et al.⁶ publizierten Daten, wobei anzumerken ist, dass auch in unseren Versuchen die GPIIbIIIa-Aktivierung auf der Oberfläche von Plättchen von VASP -/- Mäusen minimal stärker zu sein schien, der Unterschied zum Wildtyp aber nicht statistisch signifikant war.

Ein Verständnis der unterschiedlichen Ergebnisse kann nur unter Berücksichtigung der verwendeten experimentellen Werkzeuge erreicht werden. Deswegen sollen hier einige Einflussfaktoren näher erläutert werden:

D. Diskussion

(1) Sowohl Aszodi et al. als auch Hauser et al. verwendeten Fibrinogen-Bindungs Assays zur Evaluation der Fibrinogen-Rezeptor Aktivierung. Diese Technik hat einige Limitationen: (a) Das gelabelte Fibrinogen konkurriert mit dem im Plasma vorkommenden (bei Verwendung von PRP oder Vollblut) und dem von Thrombozyten freigesetzten Fibrinogen. (b) Die Aktivierung des $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ist teilweise ein reversibler Prozess (z.B. nach Stimulation von Plättchen mit ADP), was zu einem Verlust der Fibrinogen-Bindung vor der Messung führen kann. (c) Fibrinogen polymerisiert eventuell auf der Oberfläche aktivierter Plättchen, was zu einer undefinierten $\frac{\alpha\text{IIb}\beta\text{3}}{\text{Fibrinogen}}$ Stöchiometrie führen kann. (d) Mögliche Subpopulationen von Thrombozyten, sogenannte *COAT-platelets*, retinieren auf ihrer Oberfläche prokoagulatorische Proteine – u.a. Fibrinogen, Fibronectin, VWF, Faktor V und Thrombospondin –, die durch Serotonin derivatisiert sind³⁰. Diese Nachteile können durch einen direkten Nachweis des aktivierten $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ überwunden werden, z.B. unter Nutzung des mAb JON/A, dessen Verwendung prinzipiell zu genaueren Ergebnissen führen sollte.

(2) Aszodi et al. verwendeten für ihre Experimente bovines Kollagen zur Stimulation des PRP. Im menschlichen Genom existieren über 20 Gene für verschiedene Kollagen-Formen. Typ I und III bilden einen großen Teil der Extrazellulärmatrix von Gefäßen, und Typ IV ist die häufigste Form in den Basallaminae der Gefäße. Fibrilläres Kollagen entsteht aus Parallelaggregation und kovalenter Vernetzung von Tropokollagen-Molekülen. Tropokollagen wiederum ist ein Tripelhelix aus 2 gleichartigen (α_1) und einer dritten anderen Peptidkette (α_2). Fibrilläres Kollagen besteht aus mehr als einer Kollagen-Form und enthält andere Matrix-Komponenten. Wegen der ungenauen molekularen Zusammensetzung von fibrillärem Kollagen ist seine experimentelle Verwendung teilweise eingeschränkt, denn unterschiedliche Präparationen führen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Des Weiteren hängt die biologische Aktivität wesentlich vom Modus der Verwendung ab. In eigenen Experimenten konnten wir zeigen, dass lediglich ca. 10% aller Thrombozyten in WP durch Stimulation mit einer Suspension „Horn“ Kollagen (fibrilläres, equines Kollagen Typ I und III) aktiviert werden können (Daten nicht abgebildet). Bei schlechter Durchmischung des Kollagens sank dieser Anteil noch. Dies deutet darauf hin, dass wahrscheinlich nur ein relativ geringer Anteil der Thrombozyten mit den Kollagenfibrillen einen für eine Aktivierung ausreichenden Kontakt hatte. Experimentell wird hierdurch die Reproduzierbarkeit von Experimenten deutlich erschwert. Wenn Kollagen hingegen als Monolayer verwendet wird, können Plättchen vermutlich an mehr GPO-Motive

D.4. Charakterisierung von VASP -/- Mäusen

(Glycin-Prolin-Hydroxyprolin) des Kollagen gleichzeitig binden, was zu einer weitaus vollständigeren Aktivierung führt.

Zum einen ist die Verwendung von Kollagen also aufgrund zahlreicher Präparationen schlecht standardisiert, weswegen definierteren Kollagen-Rezeptor Agonisten, wie dem CRP (*collagen related peptide*, ein GPO beinhaltendes Peptid) oder anderen Agonisten, der Vorzug zu geben ist. Zum anderen gestaltet sich die Verwendung von Kollagen als Suspension experimentell schwierig und erscheint insgesamt auch unphysiologisch. In eigenen Versuchen haben wir deswegen von einer Verwendung von Kollagen abgesehen.

(3) Fibrinogen-Bindungs-Assays werden meistens als FACS-Analyse, eine Methode zur Untersuchung einzelner Zellen, durchgeführt. Bei Stimulation von PRP, wie bei Aszodi et al. und Hauser et al., kommt es zu Plättchen-Aggregation. Die Aggregate werden folgend durch die FACS-Software aufgrund ihrer Größe herausgefiltert und ein Teil der aktivierten Thrombozyten nicht mehr erfasst. Dies kann zu einem systematischen Fehler führen, der durch die Verwendung von WP anstatt von PRP verhindert werden kann. Allerdings verlangt die Präparation von WPs, wie in unseren Experimenten, häufigeres Zentrifugieren, was die Gefahr einer Präaktivierung und eingeschränkten Thrombozytenantwort nach Stimulation mit sich bringt. Eine Übersicht über die Schwierigkeiten der Plättchenpräparation soll hier nicht gegeben werden, es liegt aber auf der Hand, dass die präanalytische Phase einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

D.4.2 p-Selektin Expression und Serotonin Sekretion

Als Marker für die Sekretion von α -Granula bestimmten wir die p-Selektin Expression und für die Sekretion der δ -Granula (dense granules) die Serotonin Sekretion nach Aktivierung der Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

Hierbei zeigte sich, dass in unseren Experimenten VASP weder einen signifikanten Einfluss auf die Sekretion der α -Granula noch der δ -Granula hatte, auch nicht nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP. Ähnlich wie bei der GPIIbIIIa-Aktivierung, erschien die p-Selektin-Expression und die Serotonin-Sekretion bei Thrombozyten von VASP -/- Mäusen zunächst minimal stärker. Der Unterschied zum Wildtyp war aber nicht signifikant. Die Ergebnisse der Serotonin-Sekretion sind konsistent mit den Befunden von Aszodi et al.⁶, der zusätzlich auch nach Verwendung von Sp-5,6-DCL-cBIMPS keine Ungleichheiten feststellen konnte.

D. Diskussion

Die Resultate der p-Selektin Expression weichen allerdings von den Befunden von Hauser et al.⁶³ ab, die eine deutliche Hemmung der p-Selektin Oberflächenexpression nach Thrombin-Stimulation beobachtete. Die verwendete Thrombin-Konzentration betrug hierbei 0,5 U/ml (vgl. 0,003 und 0,01 U/ml in den eigenen Experimenten) und erscheint unphysiologisch hoch. Das Problem der Verwendung von PRP für die FACS-Analyse findet hier genauso Anwendung, wie bei der Messung der Fibrinogen-Bindung. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Verwendung von PFA (Paraformaldehyd) zur Fixation von Plättchen, wie sie weit verbreitet ist und auch von Hauser et al. verwendet wurde. Generell kann PFA zur Alterationen der Plättchenaktivierung führen und das Ergebnis beeinflussen. Es sei allerdings angemerkt, dass gezeigt wurde, dass der Einfluss von PFA auf die p-Selektin Expression bei Fixierung der Thrombozyten nach Inkubation mit dem Antikörper bei humanen Thrombozyten gering ist¹²⁷. Wir verwendeten für unsere Experimente einen weiterentwickelten p-Selektin Assay unter Verwendung von WP und verzichteten auf PFA. Die vorliegenden Experimente unterscheiden sich weiterhin von den durch Hauser et al. beschriebenen Versuchen durch eine unterschiedliche Inkubationszeit mit dem jeweiligen Agonisten. Sie war bei den eigenen Versuchen mit 10 min gegenüber 1 min deutlich länger als bei Hauser et al., so dass unterschiedliche Ergebnisse eventuell auf einer unterschiedlichen Freisetzungskinetik zwischen VASP -/- und WT-Mäusen beruhen könnten. Hierzu liegen bisher allerdings keine Daten vor.

D.4.3 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen

Die Flusskammer simuliert in-vitro die Bedingungen eines Endotheldefektes bei dem die subendotheliale Matrix exponiert wird. Hierbei wird Vollblut über einen mit fibrillärem Kollagen beschichteten Objektträger geleitet und es kommt unter Flussbedingungen zur Thrombusbildung. Im Gegensatz zu anderen in-vitro Assays wird hier ein weit komplexerer Vorgang analysiert und Störungen der Adhäsion, Aktivierung, Aggregation, Sekretion und prokoagulatorischen Aktivität haben Einfluss auf das Ergebnis. Subtile Defekte der Thrombozytenfunktion sollten hier deutlicher zu Tage treten, falls sich ihre Effekte additiv verhalten.

Wir konnten zeigen, dass die Inhibition der Thrombusformation durch SNP bei VASP -/- Mäusen signifikant beeinträchtigt ist und dass Versuche mit Iloprost oder mit JAQ1 + Thromboxan keine signifikanten Unterschiede ergaben (▷ **Abb. C.20, S. 82**). Diese

D.4. Charakterisierung von VASP -/- Mäusen

Ergebnisse korrelieren mit den Befunden von Massberg et al.⁹⁸, der durch Intravital-Mikroskopie darlegen konnte, dass in-vivo sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen (Ischämie/Reperfusion, atherosklerotisch verändertes Endothel, endotheliale Denudation) die Adhäsion der Thrombozyten von VASP -/- Mäusen deutlich gesteigert ist und dass insbesondere die Plättchenadhäsion in VASP -/- Mutanten nicht responsiv auf NO ist. Wir bestätigten, dass VASP wesentlich für die NO-abhängige Inhibition der Adhäsion und Thrombusformation ist.

Flusskammer-Messungen erscheinen in Anbetracht dieser Ergebnisse gut geeignet als Screening-Test auf Störungen der Thrombozytenfunktion. Zwar geben in-vivo Versuche noch bessere Einsicht in die Relevanz eines Defektes, die Flusskammer ist aber weitaus einfacher in der Anwendung als die Intravital-Mikroskopie und enthält weniger unbekannte Einflussgrößen.

D.4.4 **Schlussfolgerung: Einfluss von VASP auf die Thrombozytenfunktion**

Wir konnten darlegen, dass NO die Thrombusbildung muriner WT Plättchen in Flusskammerversuchen drastisch hemmt. Im Kontrast dazu war NO in VASP defizienten Plättchen ineffektiv. Korrelierende Ergebnisse konnten von Massberg et al. in in-vivo Versuchen durch intravital-Mikroskopie gewonnen werden⁹⁸. Beide Experimente belegen, dass die Inhibition der Agonisten-induzierten Plättchenadhäsion und konsekutive Thrombusformation durch den NO/cGMP-Signalweg in VASP-defizienten Plättchen gestört ist.

Insgesamt hatte VASP in unseren Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die GPIIbIIIa-Aktivierung und die α - und δ -Granula Sekretion. Diese Ergebnisse sind bezüglich GPIIbIIIa-Aktivierung und α -Granula Sekretion widersprüchlich zu bisherigen Annahmen, unterstützen aber bisherige Befunde zur δ -Granula Sekretion^{6,63}. Zusammengefasst kann vermutet werden, dass das Ausmaß des Effektes der VASP-Deletion auf die Integrin-Aktivierung und die Sekretion bislang überschätzt wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie, dass die VASP-Deletion zu subtilen Störungen der Thrombozytenfunktion führt, die erst in komplexeren Assays sichtbar werden, die das Zusammenwirken einzelner Elemente der Thrombozytenfunktion und der Thrombozyten/Gefäßwand-Interaktion abbilden. Beispiele für solche Assays sind die Flusskammer und die Intravital-Mikroskopie.

Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse, dass VASP der kritische Effektor der Protein

D. Diskussion

Kinase $C\delta$ ist, die die Plättchenaggregation negativ reguliert, unterstreichen die Rolle von VASP in der Plättchenhemmung¹¹⁶.

Kapitel E

Zusammenfassung

Clopidogrel hat sich als potentes Medikament zur Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse sowohl bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (non-STE-ACS) als auch bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit ST-Hebung (STEMI) erwiesen (CURE- und COMMIT-Studie). Insbesondere der Nutzen einer Vorbehandlung mit Clopidogrel bei perkutaner Koronarintervention ist bei Patienten mit non-STE-ACS und STEMI gut belegt (PCI-CURE- und PCI-CLARITY-Studie).

Ein beträchtlicher Anteil der Patienten zeigt allerdings kein adäquates Ansprechverhalten auf Clopidogrel. Wir etablierten deswegen zusätzlich zu einem bereits bestehenden FACS-Assay, der den Effekt von Clopidogrel anhand der Phosphorylierung des Proteins VASP quantitativ bestimmt, einen neuartigen auf dem gleichen Prinzip beruhenden *enzyme-immuno assay* (EIA). In einer Doppelblindstudie mit gesunden Probanden spiegeln im systematischen Vergleich von VASP-EIA, VASP-FACS und anderer verbreiteter Verfahren (Aggregation, p-Selektin Expression, PFA100) sowohl die VASP-Assays als auch die Aggregation die Plättchen-Inhibition deutlich wider. Demgegenüber waren weder die p-Selektin Expression noch der PFA100 ein Indikator für den Clopidogrel-Effekt. Die VASP-Assays zeichneten sich im Vergleich zur Aggregation durch bessere Quantifizierbarkeit und eine enge Abhängigkeit von der Zielstruktur des Clopidogrels, dem P2Y12-Rezeptor, aus. So hatte eine Medikation mit Acetylsalicylsäure keinen Einfluss auf die VASP-Assays, verminderte allerdings die Aggregation.

Weiterhin konnten wir im Rahmen der Probandenstudie durch Verwendung PAR- (*protease-activated receptor*) spezifischer Peptide (SFFLRN, AYPGKF) und dem stabilen Throm-

E. Zusammenfassung

boxan A2 Analog U46619 in ex-vivo Versuchen nachweisen, dass die antithrombozytären Eigenschaften des Clopidogrels zum Teil auf der indirekten Hemmung der Thrombin- und Thromboxan-induzierten Plättchenaktivierung beruhen. Diese Ergebnisse betonen die zentrale Bedeutung $G\alpha_i$ -vermittelter Signalwege in Thrombozyten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit strebten wir an, neue Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu identifizieren und das bekannte Substrat VASP weiter zu charakterisieren. Die Plättchenadhäsion und -aktivierung an der Zellwand sind initiale Ereignisse der arteriellen Thrombose. Prostacyclin und NO erhöhen die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP). Dies führt zu einer umfassenden Inhibition der Thrombozyten, hauptsächlich durch Aktivierung der cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinase (cAK, cGK). Es liegt bisher kein schlüssiges Bild davon vor, wie die Substrate der cAK und cGK die Plättcheninhibition regulieren.

Wir identifizierten zunächst das *adenylylcyclase-associated protein* (CAP1) anhand der Analyse des humanen Plättchen-Phosphoproteoms als neues Substrat der cGK, das innerhalb von Sekunden nach SNP-Stimulation phosphoryliert wird. Die Separation des Phosphoproteoms erfolgte durch 2D-Gelelektrophorese. Wildtyp-CAP1 und Mutanten, bei denen an putativen Phosphorylierungsstellen Serin bzw. Threonin durch Alanin ausgetauscht wurde, wurden anschließend in PtK₂-Zellen exprimiert. Bisher konnte die Ko-Transfektion von PtK₂-Zellen mit CAP1 und cGK eine Phosphorylierung von CAP1 durch die cGK nicht bestätigen. Weitere Anstrengungen werden nötig sein, CAP1 als cGK-Substrat zu etablieren.

Flusskammerversuche zeigten, dass die Hemmung der Thrombusformation durch SNP bei VASP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) ineffektiv ist und belegen, dass die Inhibition der Agonisten-induzierten Thrombusformation durch den NO/cGMP-Signalweg in VASP-defizienten Plättchen gestört ist. VASP hatte in unseren Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die GPIIb/IIIa-Aktivierung (gemessen mit dem monoklonalen Antikörper JON/A), die Serotonin-Sekretion (δ -Granula) und die p-Selektin-Expression (α -Granula). Die Ergebnisse legen nahe, dass die VASP-Deletion zu subtilen Störungen von Thrombozytenfunktionen führt, die erst in Experimenten deutlich zu Tage treten, die ihr Zusammenspiel abbilden.

Literaturverzeichnis

1. Abel, K., A. Lingnau, K. Niebuhr, J. Wehland und U. Walter: *Monoclonal antibodies against the focal adhesion protein VASP revealing epitopes involved in the interaction with two VASP binding proteins and VASP phosphorylation*. Eur. J. Cell Biol., **69**(Suppl. 42), 39, 1996.
2. Abel, K., G. Mieskes und U. Walter: *Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets*. FEBS Lett, **370**(3), 184–8, 1995.
3. Aleil, B., C. Ravanat, J. P. Cazenave, G. Rochoux, A. Heitz und C. Gachet: *Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases*. J Thromb Haemost, **3**(1), 85–92, 2005.
4. Amberg, D. C., E. Basart und D. Botstein: *Defining protein interactions with yeast actin in vivo*. Nat Struct Biol, **2**(1), 28–35, 1995.
5. Antl, M., M. L. von Bruhl, C. Eiglsperger, M. Werner, I. Konrad, T. Kocher, M. Wilm, F. Hofmann, S. Massberg und J. Schlossmann: *IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation*. Blood, **109**(2), 552–9, 2007.
6. Aszodi, A., A. Pfeifer, M. Ahmad, M. Glanzer, X. H. Zhou, L. Ny, K. E. Andersson, B. Kehrel, S. Offermanns und R. Fassler: *The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function*. Embo J, **18**(1), 37–48, 1999.
7. Barragan, P., J. L. Bouvier, P. O. Roquebert, G. Macaluso, P. Commeau, B. Comet, A. Lafont, L. Camoin, U. Walter und M. Eigenthaler: *Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation*. Catheter Cardiovasc Interv, **59**(3), 295–302, 2003.
8. Bearer, E. L., J. M. Prakash, R. D. Manchester und P. G. Allen: *VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations*. Cell Motil Cytoskeleton, **47**(4), 351–64, 2000.
9. Behan, M. W., S. C. Fox, S. Heptinstall und R. F. Storey: *Inhibitory effects of P2Y12 receptor antagonists on TRAP-induced platelet aggregation, procoagulant activity, microparticle formation and intracellular calcium responses in patients with acute coronary syndromes*. Platelets, **16**(2), 73–80, 2005.
10. Benka, M. L., M. Lee, G. R. Wang, S. Buckman, A. Burlacu, L. Cole, A. DePina, P. Dias, A. Granger, B. Grant und et al.: *The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha q family*. FEBS Lett, **363**(1-2), 49–52, 1995.
11. Bergmeier, W., V. Schulte, G. Brockhoff, U. Bier, H. Zirngibl und B. Nieswandt: *Flow cytometric detection of activated mouse integrin alphaIIb beta3 with a novel monoclonal antibody*. Cytometry, **48**(2), 80–6, 2002.
12. Bertling, E., P. Hotulainen, P. K. Mattila, T. Matilainen, M. Salminen und P. Lappalainen: *Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells*. Mol Biol Cell, **15**(5), 2324–34, 2004.

LITERATURVERZEICHNIS

13. Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier und W. Postel: *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, **6**(4), 317–39, 1982.
14. Born, G. V.: *Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets*. J Physiol, **16**, 67–68, 1962.
15. Briede, J. J., J. W. Heemskerk, C. van't Veer, H. C. Hemker und T. Lindhout: *Contribution of platelet-derived factor Va to thrombin generation on immobilized collagen- and fibrinogen-adherent platelets*. Thromb Haemost, **85**(3), 509–13, 2001.
16. Bullock, W.O., Fernandez, F.M. und J.M. Short: *A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection*. Biotechniques, **5**, 376–379, 1987.
17. Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe und U. Walter: *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, 1994.
18. Butt, E., S. Gambaryan, N. Gottfert, A. Galler, K. Marcus und H. E. Meyer: *Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146*. J Biol Chem, **278**(18), 15601–7, 2003.
19. Butt, E., D. Immler, H. E. Meyer, A. Kotlyarov, K. Laass und M. Gaestel: *Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants*. J Biol Chem, **276**(10), 7108–13, 2001.
20. Cadroy, Y., J. P. Bossavy, C. Thalamas, L. Sagnard, K. Sakariassen und B. Boneu: *Early potent antithrombotic effect with combined aspirin and a loading dose of clopidogrel on experimental arterial thrombogenesis in humans*. Circulation, **101**(24), 2823–8, 2000.
21. CAPRIE Steering Committee: *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)*. Lancet, **348**(9038), 1329–39, 1996.
22. Cattaneo, M.: *Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **24**(11), 1980–7, 2004.
23. Cavallini, L., M. Coassin, A. Borean und A. Alexandre: *Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation*. J Biol Chem, **271**(10), 5545–51, 1996.
24. Chen, J., M. Ishii, L. Wang, K. Ishii und S. R. Coughlin: *Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered ligand hypothesis and discovery of an alternative intermolecular ligand mode*. J Biol Chem, **269**(23), 16041–5, 1994.
25. Chen, M. und A. Stracher: *In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain*. J Biol Chem, **264**(24), 14282–9, 1989.
26. COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group: *Addition of clopidogrel to aspirin in 45852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial*. Lancet, **366**, 1607–21, 2005.
27. Coughlin, S. R.: *Sol Sherry lecture in thrombosis: how thrombin 'talks' to cells: molecular mechanisms and roles in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **18**(4), 514–8, 1998.
28. Coukell, A. J. und A. Markham: *Clopidogrel*. Drugs, **54**(5), 745–50; discussion 751, 1997.
29. Dagert, M. und S. D. Ehrlich: *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells*. Gene, **6**(1), 23–8, 1979.
30. Dale, G. L.: *Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response*. J Thromb Haemost, **3**(10), 2185–92, 2005.
31. Dangelmaier, C., J. Jin, J. B. Smith und S. P. Kunapuli: *Potential of thromboxane A₂-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway*. Thromb Haemost, **85**(2), 341–8, 2001.

32. De Candia, E., S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews und R. De Cristofaro: *Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets.* J Biol Chem, **276**(7), 4692–8, 2001.
33. Dorsam, R. T., M. Tuluc und S. P. Kunapuli: *Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets.* J Thromb Haemost, **2**(5), 804–12, 2004.
34. Drummond, A. H. und J. L. Gordon: *Letter: Rapid, sensitive microassay for platelet 5HT.* Thromb Diath Haemorrh, **31**(2), 366–7, 1974.
35. El-Daher, S. S., Y. Patel, A. Siddiqua, S. Hassock, S. Edmunds, B. Maddison, G. Patel, D. Goulding, F. Lupu, R. J. Wojcikiewicz und K. S. Authi: *Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes.* Blood, **95**(11), 3412–22, 2000.
36. Falker, K., D. Lange und P. Presek: *ADP secretion and subsequent P2Y12 receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets.* Thromb Haemost, **92**(1), 114–23, 2004.
37. Fedor-Chaiken, M., R. J. Deschenes und J. R. Broach: *SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast.* Cell, **61**(2), 329–40, 1990.
38. Feinman, R. D., J. Lubowsky, I. Charo und M. P. Zabinski: *The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets.* J Lab Clin Med, **90**(1), 125–9, 1977.
39. Field, J., A. Vojtek, R. Ballester, G. Bolger, J. Colicelli, K. Ferguson, J. Gerst, T. Kataoka, T. Michaeli, S. Powers und et al.: *Cloning and characterization of CAP, the S. cerevisiae gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein.* Cell, **61**(2), 319–27, 1990.
40. Fontana, P., A. Dupont, S. Gandrille, C. Bachelot-Loza, J. L. Reny, M. Aiach und P. Gaussem: *Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects.* Circulation, **108**(8), 989–95, 2003.
41. Fox, J. E. und M. C. Berndt: *Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelets.* J Biol Chem, **264**(16), 9520–6, 1989.
42. Franke, B., J. W. Akkerman und J. L. Bos: *Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets.* Embo J, **16**(2), 252–9, 1997.
43. Freeman, N. L., Z. Chen, J. Horenstein, A. Weber und J. Field: *An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the Saccharomyces cerevisiae cyclase-associated protein.* J Biol Chem, **270**(10), 5680–5, 1995.
44. Freeman, N. L. und J. Field: *Mammalian homolog of the yeast cyclase associated protein, CAP/Srv2p, regulates actin filament assembly.* Cell Motil Cytoskeleton, **45**(2), 106–20, 2000.
45. Gachet, C.: *ADP receptors of platelets and their inhibition.* Thromb Haemost, **86**(1), 222–32, 2001.
46. Geiger, J., J. Brich, P. Honig-Liedl, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, J. M. Herbert und U. Walter: *Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, **19**(8), 2007–11, 1999.
47. Geiger, J., C. Nolte, E. Butt, S. O. Sage und U. Walter: *Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A, **89**(3), 1031–5, 1992.
48. Gerrard, J. M., L. L. Beattie, J. Park, S. J. Israels, A. McNicol, D. Lint und Jr. Cragoe, E. J.: *A role for protein kinase C in the membrane fusion necessary for platelet granule secretion.* Blood, **74**(7), 2405–13, 1989.
49. Gerst, J. E., K. Ferguson, A. Vojtek, M. Wigler und J. Field: *CAP is a bifunctional component of the Saccharomyces cerevisiae adenylyl cyclase complex.* Mol Cell Biol, **11**(3), 1248–57, 1991.
50. Gertler, F. B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland und P. Soriano: *Mena, a relative*

LITERATURVERZEICHNIS

- of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**(2), 227–39, 1996.
51. Gianazza, E., T. Rabilloud, L. Quaglia, P. Caccia, S. Astrua-Testori, L. Osio, G. Grazioli und P. G. Righetti: *Additives for immobilized pH gradient two-dimensional separation of particulate material: comparison between commercial and new synthetic detergents*. *Anal Biochem*, **165**(2), 247–57, 1987.
52. Giesberts, A. N., G. van Willigen, E. G. Lapetina und J. W. Akkerman: *Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIB beta 3) function via the thrombin receptor*. *Biochem J*, **309** (Pt 2), 613–20, 1995.
53. Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie und G. Schultz: *Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation*. *J Biol Chem*, **274**(25), 17901–7, 1999.
54. Golanski, J., J. Pluta, J. Baraniak und C. Watala: *Limited usefulness of the PFA-100 for the monitoring of ADP receptor antagonists—in vitro experience*. *Clin Chem Lab Med*, **42**(1), 25–9, 2004.
55. Gottwald, U., R. Brokamp, I. Karakesisoglou, M. Schleicher und A. A. Noegel: *Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in Dictyostelium discoideum and characterization of its interaction with actin*. *Mol Biol Cell*, **7**(2), 261–72, 1996.
56. Grossmann, R., O. Sokolova, A. Schnurr, A. Bonz, C. Porsche, A. Oberfell, B. Lengenfelder, U. Walter und M. Eigenthaler: *Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting*. *Thromb Haemost*, **92**(6), 1201–6, 2004.
57. Gurbel, P. A., K. P. Bliden, B. L. Hiatt und C. M. O'Connor: *Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity*. *Circulation*, **107**(23), 2908–13, 2003.
58. Gurbel, P. A. und U. S. Tantry: *Aspirin and clopidogrel resistance: Consideration and management*. *J Interv Cardiol*, **19**(5), 439–48, 2006.
59. Haffner, C., T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S. M. Lohmann und U. Walter: *Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP*. *Embo J*, **14**(1), 19–27, 1995.
60. Halbrugge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher und U. Walter: *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, 1990.
61. Halbrugge, M. und U. Walter: *Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets*. *Eur J Biochem*, **185**(1), 41–50, 1989.
62. Han, J., C. Clark, G. Han, T. C. Chu und P. Han: *Preparation of 2-nitro-5-thiobenzoic acid using immobilized Tris(2-carboxyethyl)phosphine*. *Anal Biochem*, **268**(2), 404–7, 1999.
63. Hauser, W., K. P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter und M. Zimmer: *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, 1999.
64. Hecker, M., M. Haurand, V. Ullrich und S. Terao: *Spectral studies on structure-activity relationships of thromboxane synthase inhibitors*. *Eur J Biochem*, **157**(1), 217–23, 1986.
65. Heemskerk, J. W., W. M. Vuist, M. A. Feijge, C. P. Reutelingsperger und T. Lindhout: *Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses*. *Blood*, **90**(7), 2615–25, 1997.
66. Hein, L., K. Ishii, S. R. Coughlin und B. K. Kobilka: *Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem*, **269**(44), 27719–26, 1994.
67. Hepler, J. R. und A. G. Gilman: *G proteins*. *Trends Biochem Sci*, **17**(10), 383–7, 1992.
68. Hettasch, J. M. und J. R. Sellers: *Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by*

- cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C.* J Biol Chem, **266**(18), 11876–81, 1991.
69. Heukeshoven, J. und R. Dernick: *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.* Electrophoresis, **9**(1), 28–32, 1988.
70. Hezard, N., D. Metz, P. Nazeyrollas, C. Droulle, G. Potron und P. Nguyen: *PFA-100 and flow cytometry: can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty?* Thromb Res, **108**(1), 43–7, 2002.
71. Holloper, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius und P. B. Conley: *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs.* Nature, **409**(6817), 202–7, 2001.
72. Holmsen, H. In: Mielke, H und R Rodviken (Herausgeber): *Mechanisms of Hemostasis and Thrombosis*, Seite 73. Symposia Specialists, Miami, Florida, 1978.
73. Holmsen, H und CA Dangelmaier: *Measurement of Secretion of Lysosomal Acid Glycosidases.* In: Hawiger, J (Herausgeber): *Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion*, Band 169 der Reihe *Methods in Enzymology*, Seiten 336–342. Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
74. Holmsen, H und CA Dangelmaier: *Measurement of Secretion of Serotonin.* In: Hawiger, J (Herausgeber): *Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion*, Band 169 der Reihe *Methods in Enzymology*, Seiten 205–210. Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
75. Holmsen, H., A. C. Ostvold und H. J. Day: *Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction.* Biochem Pharmacol, **22**(20), 2599–608, 1973.
76. Horstrup, K., B. Jablonka, P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek und U. Walter: *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, 1994.
77. Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen und L. R. Pease: *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension.* Gene, **77**(1), 61–8, 1989.
78. Hoxie, J. A., M. Ahuja, E. Belmonte, S. Pizarro, R. Parton und L. F. Brass: *Internalization and recycling of activated thrombin receptors.* J Biol Chem, **268**(18), 13756–63, 1993.
79. Hubberstey, A., G. Yu, R. Loewith, C. Lakusta und D. Young: *Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin.* J Cell Biochem, **61**(3), 459–66, 1996.
80. Hubberstey, A. V. und E. P. Mottillo: *Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization.* Faseb J, **16**(6), 487–99, 2002.
81. Hung, D. T., Y. H. Wong, T. K. Vu und S. R. Coughlin: *The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase.* J Biol Chem, **267**(29), 20831–4, 1992.
82. Ingerman-Wojenski, C., J. B. Smith und M. J. Silver: *Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets.* J Lab Clin Med, **101**(1), 44–52, 1983.
83. Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Kahn, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram und S. R. Coughlin: *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans.* Nature, **386**(6624), 502–6, 1997.
84. Jaremo, P., T. L. Lindahl, S. G. Fransson und A. Richter: *Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel.* J Intern Med, **252**(3), 233–8, 2002.
85. Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara und S. R. Coughlin: *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin.* J Clin Invest, **103**(6), 879–87, 1999.
86. Kim, S., C. Foster, A. Lecchi, T. M. Quinton, D. M. Prosser, J. Jin, M. Cattaneo und S. P. Kunapuli: *Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human*

LITERATURVERZEICHNIS

- platelet aggregation independently of *G(i)* signaling. *Blood*, **99**(10), 3629–36, 2002.
87. Kim, S., J. Jin und S. P. Kunapuli: *Relative contribution of G-protein-coupled pathways to protease-activated receptor-mediated Akt phosphorylation in platelets*. *Blood*, **107**(3), 947–54, 2006.
88. Klages, B., U. Brandt, M. I. Simon, G. Schultz und S. Offermanns: *Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets*. *J Cell Biol*, **144**(4), 745–54, 1999.
89. Kratzer, M. A. und G. V. Born: *Simulation of primary haemostasis in vitro*. *Haemostasis*, **15**(6), 357–62, 1985.
90. Lapetina, E. G., J. C. Lacal, B. R. Reep und L. Molina y Vedia: *A ras-related protein is phosphorylated and translocated by agonists that increase cAMP levels in human platelets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(9), 3131–4, 1989.
91. Lau, W. C., P. A. Gurbel, P. B. Watkins, C. J. Neer, A. S. Hopp, D. G. Carville, K. E. Guyer, A. R. Tait und E. R. Bates: *Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance*. *Circulation*, **109**(2), 166–71, 2004.
92. Lau, W. C., L. A. Waskell, P. B. Watkins, C. J. Neer, K. Horowitz, A. S. Hopp, A. R. Tait, D. G. Carville, K. E. Guyer und E. R. Bates: *Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction*. *Circulation*, **107**(1), 32–7, 2003.
93. Ledergerber, D. und R. W. Hartmann: *Development of a screening assay for the in vitro evaluation of thromboxane A2 synthase inhibitors*. *J Enzyme Inhib*, **9**(4), 253–61, 1995.
94. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, **193**(1), 265–75, 1951.
95. Macphee, C. H., D. H. Reifsnnyder, T. A. Moore, K. M. Lerea und J. A. Beavo: *Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets*. *J Biol Chem*, **263**(21), 10353–8, 1988.
96. Manganello, J. M., Y. Djellas, C. Borg, K. Antonakis und G. C. Le Breton: *Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A(2) receptor-associated Galpha(13)*. *J Biol Chem*, **274**(39), 28003–10, 1999.
97. Marshall, P. W., A. J. Williams, R. M. Dixon, J. W. Growcott, S. Warburton, J. Armstrong und J. Moores: *A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers*. *Br J Clin Pharmacol*, **44**(2), 151–5, 1997.
98. Massberg, S., S. Gruner, I. Konrad, M. I. Garcia Arguinzonis, M. Eigenthaler, K. Hemler, J. Kersting, C. Schulz, I. Muller, F. Besta, B. Nieswandt, U. Heinzmann, U. Walter und M. Gawaz: *Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice*. *Blood*, **103**(1), 136–42, 2004.
99. Matetzky, S., B. Shenkman, V. Guetta, M. Shechter, R. Bienart, I. Goldenberg, I. Novikov, H. Pres, N. Savion, D. Varon und H. Hod: *Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, **109**(25), 3171–5, 2004.
100. Mehta, S. R., S. Yusuf, R. J. Peters, M. E. Bertrand, B. S. Lewis, M. K. Natarajan, K. Malmberg, H. Rupprecht, F. Zhao, S. Chrolavicius, I. Copland und K. A. Fox: *Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study*. *Lancet*, **358**(9281), 527–33, 2001.
101. Meinecke, M., J. Geiger, E. Butt, M. Sandberg, T. Jahnsen, T. Chakraborty, U. Walter, T. Jarchau und S. M. Lohmann: *Human cyclic GMP-dependent protein kinase I beta overexpression increases phosphorylation of an endogenous focal contact-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein without altering the thrombin-evoked calcium response*. *Mol Pharmacol*, **46**(2), 283–90, 1994.
102. Michelson, A. D., 3rd Frelinger, A. L. und M. I. Furman: *Current options in platelet function testing*. *Am J Cardiol*, **98**(10 Suppl 1), S4–S10, 2006.

103. Minato, T., J. Wang, K. Akasaka, T. Okada, N. Suzuki und T. Kataoka: *Quantitative analysis of mutually competitive binding of human Raf-1 and yeast adenylyl cyclase to Ras proteins*. J Biol Chem, **269**(33), 20845–51, 1994.
104. Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traini, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams und A. A. Goolley: *Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis, **19**(5), 837–44, 1998.
105. Montalescot, G., G. Sideris, C. Meuleman, C. Bal-dit Sollier, N. Lellouche, P. G. Steg, M. Slama, O. Milleron, J. P. Collet, P. Henry, F. Beygui und L. Drouet: *A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial*. J Am Coll Cardiol, **48**(5), 931–8, 2006.
106. Moriyama, K. und I. Yahara: *Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover*. J Cell Sci, **115**(Pt 8), 1591–601, 2002.
107. Muller, I., F. Besta, C. Schulz, S. Massberg, A. Schonig und M. Gawaz: *Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement*. Thromb Haemost, **89**(5), 783–7, 2003.
108. Neer, E. J.: *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. Cell, **80**(2), 249–57, 1995.
109. Nieswandt, B., B. Aktas, A. Moers und U. J. Sachs: *Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models*. J Thromb Haemost, **3**(8), 1725–36, 2005.
110. Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J. W. Heemskerk, H. Zirngibl und R. Fassler: *Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen*. Embo J, **20**(9), 2120–30, 2001.
111. Nieswandt, B., V. Schulte, A. Zywietz, M. P. Gratacap und S. Offermanns: *Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets*. J Biol Chem, **277**(42), 39493–8, 2002.
112. Nishida, Y., F. Shima, H. Sen, Y. Tanaka, C. Yanagihara, Y. Yamawaki-Kataoka, K. Kariya und T. Kataoka: *Coiled-coil interaction of N-terminal 36 residues of cyclase-associated protein with adenylyl cyclase is sufficient for its function in Saccharomyces cerevisiae ras pathway*. J Biol Chem, **273**(43), 28019–24, 1998.
113. Obergfell, A., J. Strotmann, A. Bonz, J. Bauersachs, G. Ertl, U. Walter und R. Grossmann: *Impaired platelet responses to clopidogrel and ticlopidine in a patient with recurrent coronary stent stenosis*. Thromb Haemost, **92**(6), 1446–7, 2004.
114. Offermanns, S.: *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, **99**(12), 1293–304, 2006.
115. Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher und G. Schultz: *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, **91**(2), 504–8, 1994.
116. Pula, G., K. Schuh, K. Nakayama, K. I. Nakayama, U. Walter und A. W. Poole: *PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation*. Blood, **108**(13), 4035–44, 2006.
117. Rabilloud, T.: *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses*. Electrophoresis, **17**(5), 813–29, 1996.
118. Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel und J. Lunardi: *Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, **18**(3-4), 307–16, 1997.
119. Raman, S. und B. Jilma: *Time lag in platelet function inhibition by clopidogrel in stroke patients as measured by PFA-100*. J Thromb Haemost, **2**(12), 2278–9, 2004.
120. Reep, B. R. und E. G. Lapetina: *Nitric oxide stimulates the phosphorylation of rap1b in*

LITERATURVERZEICHNIS

- human platelets and acts synergistically with iloprost. *Biochem Biophys Res Commun*, **219**(1), 1–5, 1996.
121. Sabatine, M. S., C. P. Cannon, C. M. Gibson, J. L. Lopez-Sendon, G. Montalescot, P. Theroux, B. S. Lewis, S. A. Murphy, C. H. McCabe und E. Braunwald: *Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study*. *Jama*, **294**(10), 1224–32, 2005.
122. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, **239**(4839), 487–91, 1988.
123. Sambrook, J., EF Fritsch und T Maniatis: *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
124. Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(12), 5463–7, 1977.
125. Savi, P., J. Combalbert, C. Gaich, M. C. Rouchon, J. P. Maffrand, Y. Berger und J. M. Herbert: *The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A*. *Thromb Haemost*, **72**(2), 313–7, 1994.
126. Savi, P., J. M. Herbert, A. M. Pflieger, F. Dol, D. Delebasse, J. Combalbert, G. Defreyn und J. P. Maffrand: *Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel*. *Biochem Pharmacol*, **44**(3), 527–32, 1992.
127. Schmidt, V., T. Hilberg, G. Franke, D. Glaser und H. H. Gabriel: *Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets*. *Platelets*, **14**(5), 287–94, 2003.
128. Schwarz, U. R., J. Geiger, U. Walter und M. Eigenthaler: *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, 1999.
129. Siess, W., D. A. Winegar und E. G. Lapetina: *Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets*. *Biochem Biophys Res Commun*, **170**(2), 944–50, 1990.
130. Simon, M. I., M. P. Strathmann und N. Gautam: *Diversity of G proteins in signal transduction*. *Science*, **252**(5007), 802–8, 1991.
131. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson und D. C. Klenk: *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, **150**(1), 76–85, 1985.
132. Smolenski, A., C. Bachmann, K. Reinhard, P. Honig-Liedl, T. Jarchau, H. Hoschuetzky und U. Walter: *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, 1998.
133. Srivastava, S., L. N. Goswami und D. K. Dixhit: *Progress in the design of low molecular weight thrombin inhibitors*. *Med Res Rev*, **25**(1), 66–92, 2005.
134. Steinhubl, S. R., P. B. Berger, 3rd Mann, J. T., E. T. Fry, A. DeLago, C. Wilmer und E. J. Topol: *Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*. *Jama*, **288**(19), 2411–20, 2002.
135. Swiston, J., A. Hubberstey, G. Yu und D. Young: *Differential expression of CAP and CAP2 in adult rat tissues*. *Gene*, **165**(2), 273–7, 1995.
136. Tang, X., Y. Nakata, H. O. Li, M. Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T. Ohta und K. Yokoyama: *The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli*. *Nucleic Acids Res*, **22**(14), 2857–8, 1994.
137. Tegge, W., R. Frank, F. Hofmann und W. R. Dostmann: *Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on*

- cellulose paper*. *Biochemistry*, **34**(33), 10569–77, 1995.
138. The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischemic Events Trial Investigators: *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. *N Engl J Med*, **345**, 494–502, 2001.
139. Vassallo, R. R., Jr., T. Kieber-Emmons, K. Cichowski und L. F. Brass: *Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides*. *J Biol Chem*, **267**(9), 6081–5, 1992.
140. Verhofstede, C., K. Fransen, D. Marissens, R. Verhelst, G. van der Groen, S. Lauwers, G. Zissis und J. Plum: *Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods*. *J Virol Methods*, **60**(2), 155–9, 1996.
141. Vojtek, A., B. Haarer, J. Field, J. Gerst, T. D. Pollard, S. Brown und M. Wigler: *Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae**. *Cell*, **66**(3), 497–505, 1991.
142. Vojtek, A. B. und J. A. Cooper: *Identification and characterization of a cDNA encoding mouse CAP: a homolog of the yeast adenylyl cyclase associated protein*. *J Cell Sci*, **105** (Pt 3), 777–85, 1993.
143. Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton und S. R. Coughlin: *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. *Cell*, **64**(6), 1057–68, 1991.
144. Vu, T. K., V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo und S. R. Coughlin: *Domains specifying thrombin-receptor interaction*. *Nature*, **353**(6345), 674–7, 1991.
145. Wanstall, J. C., K. L. Homer und S. A. Doggrel: *Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets*. *Curr Vasc Pharmacol*, **3**(1), 41–53, 2005.
146. Wardell, M. R., C. C. Reynolds, M. C. Berndt, R. W. Wallace und J. E. Fox: *Platelet glycoprotein Ib beta is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, **264**(26), 15656–61, 1989.
147. Warnholtz, A., M. A. Ostad, N. Velich, C. Trautmann, R. Schinzel, U. Walter und T. Munzel: *A single loading dose of clopidogrel causes dose-dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease: Results of a double-blind, randomized study*. *Atherosclerosis*, 2007.
148. Weber, A., V. T. Nachmias, C. R. Pennise, M. Pring und D. Safer: *Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets*. *Biochemistry*, **31**(27), 6179–85, 1992.
149. Wenaweser, P., O. M. Hess und B. Meier: *Thienopyridines, a safety net with holes in it*. *Catheter Cardiovasc Interv*, **59**(3), 303–4, 2003.
150. Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser und K. L. Williams: *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **13**, 19–50, 1996.
151. Wiviott, S. D. und E. M. Antman: *Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story*. *Circulation*, **109**(25), 3064–7, 2004.
152. Yu, J., C. Wang, S. J. Palmieri, B. K. Haarer und J. Field: *A cytoskeletal localizing domain in the cyclase-associated protein, CAP/Srv2p, regulates access to a distant SH3-binding site*. *J Biol Chem*, **274**(28), 19985–91, 1999.
153. Zelicof, A., V. Protopopov, D. David, X. Y. Lin, V. Lustgarten und J. E. Gerst: *Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding*. *J Biol Chem*, **271**(30), 18243–52, 1996.
154. Zhang, J., S.J. Shattil, M.C. Cunningham und S.E. Rittenhouse: *Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or beta-phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of alphaIIb beta3 integrin*. *J Biol Chem*, **271**, 6265–72, 1996.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter für die Möglichkeit bedanken, in seinem Institut meine Dissertation über einen breiten Themenbereich zu verwirklichen. Auf seine Unterstützung konnte ich immer zählen – auch über die Doktorarbeit hinaus.

Herrn Dr. Jörg Geiger danke ich besonders für das Thema und die Betreuung der Arbeit. Er koordinierte das gesamte Projekt und erlebte alle Höhen und Tiefen hautnah mit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Elke Butt-Dörje und Herrn Dr. Stepan Gambaryan danke ich für die Vermittlung spezieller proteinbiochemischer Methoden. In Fragen der Molekularbiologie half mir Frau Dr. Sabine Herterich weiter. Herr Priv.-Doz. Dr. Ralf Grossmann übernahm die medizinische Leitung der Probandenstudie.

Frau Petra Hönig-Liedl machte mich mit der Praxis im Labor vertraut, stand mir kompetent zur Seite und nahm mir sehr viel Arbeit ab. Sie war verantwortlich für eine herzliche und förderliche Atmosphäre im Labor. Reichlich Hilfestellung erfuhr ich ebenfalls durch Frau Lilo Fischer. Weiterhin seien auch Inge Klier, Birgitta Schinke, Elfriede Walter und Elfriede Schulze genannt.

Frau Antonija Begonja und Herrn Thomas Grünewald danke ich für die Diskussionen.

Herzlicher Dank gilt der Firma vasopharm, die die Probandenstudie finanziell und personell unterstützte. In Zeiten des Umzuges gewährte sie uns Zuflucht. Stellvertretend seien Herr Prof. Dr. Reinhard Schinzel, Frau Claudia Wolf und Frau Angelika Waldheim genannt.

Herr Prof. Dr. Bernhard Nieswandt stellte die Infrastruktur für eine Reihe der Versuche mit VASP -/- Mäusen zur Verfügung. Herr Dr. Barsom Aktas und Frau Dr. Sabine Grüner unterstützten mich hierbei tatkräftig.