

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

**Etablierung und Anwendung eines
Proteinphosphorylierungs-Assays zur Quantifizierung der
Wirkung von Endothelfaktoren auf Thrombozyten**

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

vorgelegt von
Budy Tjahyadi
aus Jakarta, Indonesien

Würzburg, August 2010

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Koreferent: Prof. Dr. med. Reinhard Schinzel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

1. Einleitung

1.1. Einführung	1
1.2. Thrombozyten	2
1.2.1. Einfluss der zyklischen Nukleotide bei der Thrombozytenhemmung bzw. - aktivierung	4
1.2.2. Vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)	6
1.2.3. Thrombozytendysfunktion bei Diabetes mellitus	8
1.3. Endothelzellen	11
1.3.1. Endothelium derived relaxing factor (EDRF/NO)	12
1.3.2. Prostaglandin	13
1.4. Zielsetzung	14

2. Material und Methoden

2.1. Material	16
2.1.1. Antikörper	16
2.1.2. Chemikalien und Lösungen	16
2.1.3. Verbrauchsmaterial	17
2.1.4. Geräte	18
2.2. Methoden	19
2.2.1. Blutentnahme	19
2.2.2. Gewinnung von Thrombozytensuspension (washed platelets)	19
2.2.3. Die Grundlage des quantitativen Immuno-Assays	20
2.2.4. Prinzip des VASP-POD-Assays	22
2.2.5. Durchführung des VASP-POD-Assays	25
2.2.6. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit SNP	28
2.2.7. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit Iloprost	30
2.2.8. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit NOC 9 bzw. PGI ₂	31
2.2.9. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit NaNO ₂ bzw. NOC- 9	32
2.2.10. Inkubation humaner Endothelzellen mit gewaschenen Thrombozyten	32

3. Ergebnisse

3.1. Natrium Nitroprusside (SNP)	35
3.1.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Natrium Nitroprusside (SNP).....	35
3.1.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit Natrium Nitroprusside (SNP)	41
3.2. 1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-6-aminohexyl)-3-methyl-1- triazene (NOC-9).....	42
3.2.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit NOC-9.....	42
3.2.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit NOC-9.....	49
3.3. Natriumnitrit (NaNO ₂)	54
3.3.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Natriumnitrit (NaNO ₂)	54
3.4. Iloprost	58
3.4.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Iloprost.....	58
3.4.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit Iloprost	62
3.5. Prostazyklin (PGI ₂)	64
3.5.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Prostazyklin (PGI ₂).....	64
3.6. Endothelzellen.....	67
3.6.1. Koinkubation von washed platelets (WP) und endothel cells (EC).....	67
3.7. Diabetes Studie.....	73
3.7.1. Inkubation von Vollblut von Diabetikern mit SNP.....	73
3.7.2. Inkubation von Vollblut von Diabetikern mit Iloprost.....	74

4. Diskussion

4.1. Vergleich der Vasodilatoren	76
4.1.1. Natrium Nitroprussid (SNP)	76
4.1.2. NOC-9	79
4.1.3. Vergleich der Wirkung von SNP und NOC-9 in gewaschenen Thrombozyten (WP) anhand der Phosphorylierungsrate von pSer-239	81
4.1.4. Natriumnitrit.....	82
4.1.5. Iloprost	82
4.1.6. Prostazyklin (PGI ₂)	85

4.1.7. Vergleich der Wirkung von Iloprost und Prostazyklin (PGI ₂) in gewaschenen Thrombozyten	86
4.2. Koinkubation mit Endothelzellen.....	87
4.2.1. Einfluss von Ca ²⁺ /Mg ²⁺ nach Zugabe zu gewaschenen Thrombozyten (WP) und Endothelzellen (EC).....	87
4.3. Vergleich der Wirkung von SNP auf gesunde und an Diabetes Mellitus erkrankte Probanden anhand der Phosphorylierung von Serin 239	90
4.4. Vergleich der Wirkung von Iloprost auf gesunde und an Diabetes Mellitus erkrankte Probanden anhand der Phosphorylierung von Serin 239	91
5. Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	96
Abkürzungsverzeichnis	
Danksagung	
Publikationen	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Einführung

Primäre und sekundäre Hämostase beginnen unmittelbar nach Verletzung der Gefäßwand. Durch Exposition von Gewebefaktoren an der verletzten Gefäßwand werden vermehrt Thrombozyten aktiviert, die an die verletzte Stelle adhären und durch Expression inflammatorischer Faktoren proaggregatorisch werden. Die daraus folgende Aktivierung der Thrombozyten resultiert in einer Thrombozytenadhäsion-aggregation und Generierung von Thrombin und Fibrin, die zur Entstehung des Thrombus beitragen (Furie *et al.*, 2008). Eine erhöhte Thrombozytenadhäsion und -aggregation spielt eine große Rolle bei der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen (insbesondere bei Herzinfarkt und Schlaganfall). Vaskuläre Komplikationen werden oft mit manchen metabolischen Erkrankungen (insbesondere Diabetes mellitus) assoziiert. Das Schicksal eines Diabetikers wird heute vor allem von der vaskulären Morbidität und Mortalität bestimmt. Im Vergleich zu gesunden Menschen ist das Risiko, einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, auf das Zweif- bis Vierfache gesteigert, was im Wesentlichen auf Begleiterkrankungen wie gesteigerte Thrombozytenadhäsion und -aggregation, verminderte Fibrinolyse (PAI erniedrigt), Hypertonus, Hyperglykämie, Dyslipoproteinämie zurückzuführen ist (Classen *et al.*, 2004). Diese Begleitkomplikationen steigern das Risiko zur Bildung von atherosklerotischen Plaques; dabei werden Lipide an der Gefäßwand eingelagert und zerstören dadurch die Endothelzellschicht, einen lebenswichtigen Faktor zur Aufrechterhaltung der Funktion unseres Blutkreislaufes. Endothelzellen kleiden die Innenseite der Gefäßwände aus, und interagieren ständig mit den Thrombozyten. Diese Interaktion manifestiert sich, indem intakte Endothelzellen Substanzen sezernieren, die die Thrombozytenaktivierung hemmen und so die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten an der luminalen Seite der Gefäßwände verhindern. Somit verhindern die Endothelzellen die Pathogenese einer Thrombusbildung. Die in den Endothelzellen synthetisierten Verbindungen Stickstoffmonoxid (NO) bzw. Prostazyklin gewinnen an Bedeutung bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen: sie hemmen

die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung durch Beeinflussung der intrazellulären cGMP- bzw. cAMP-Konzentration. Im Rahmen der Früherkennung, Vorbeugung und Behandlung von vaskulären Komplikationen ist eine exakte Bestimmung der Faktoren, die zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung beitragen deshalb sehr wichtig. Die Initialphase der Thrombozytenhemmung ist durch Phosphorylierung bestimmter intrazellulärer Proteine charakterisiert. Probleme bei der Analyse verhindern oft die Erfassung dieser Proteinphosphorylierung. Eine neue, auf einem Immunoassay basierende Methode wurde für eine schnelle Quantifizierung der Phosphorylierungsrate eines spezifischen intrazellulären Proteins (VASP) entwickelt. Diese Methode soll dazu dienen die Thrombozytenhemmung durch Endothelfaktoren zu quantifizieren.

1.2. Thrombozyten

Thrombozyten (150–300 Tsd./ μ l Vollblut) sind kernlose Fragmente der Megakaryozyten, die im Knochenmark gebildet werden. Die Blutplättchen sind mit 2–4 μ m Durchmesser wesentlich kleiner als die übrigen Blutzellen, zirkulieren etwa zehn Tage im Blut, und werden vom retikuloendothelialen System (RES) der Milz und Leber abgebaut. Ein Bündel von Mikrotubuli, das als Ring die Plasmamembran ausspannt, verleiht den Thrombozyten ihre bikonvexe Form (Lüllmann-Rauch, 2006). Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle bei der Thrombusbildung durch Steuerung der primären und sekundären Hämostase. Eine Thrombusbildung setzt eine Thrombozytenaktivierung voraus. Die Aktivierung wird durch zwei Adhäsionsrezeptoren, Glykoprotein (GP) Ib-IX-V und GP VI, die an den von Willebrand Factor (vWF) und Kollagen binden, initiiert (Kroll *et al.*, 1996; Nieswandt *et al.*, 2003). Eine Thrombozytenaktivierung kann außerdem durch Bindung etlicher Substanzen wie Thromboxan A₂ (TxA₂), Vasopressin, ADP, Thrombin, Serotonin u. a. an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren eingeleitet werden. Über diese membranständigen Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktion, die etliche Proteinkinasen phosphoryliert und zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, zur Expression und/oder Aktivierung von Membranrezeptoren wie dem Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa und zur Sezernierung von Inhaltsstoffen der Speichergranula (Fibrinogen, Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin PDGF, ADP, Serotonin, usw.),

Thrombozytenadhäsion, -aggregation, und letztendlich zur Thrombusbildung führt (Shattil et al., 1994).

Physiologisch vorkommende Thrombozytenantagonisten — wie Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO)/Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) — inhibieren die Plättchenfunktion durch Aktivierung von Adenylylzyklase (AC) und Guanylylzyklase (GC), und erhöhen somit den intrazellulären Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Der Anstieg der intrazellulären cAMP- und cGMP-Konzentration inhibiert die Plättchenaktivierung durch Beteiligung zweier Zielenzyme der zyklischen Nucleotide (cAMP- und cGMP abhängige Proteinkinase), die wiederum spezifische Proteine phosphorylieren. Die Konzentrationen von cAMP und cGMP werden durch zwei Faktoren geregelt. Während die Adenylylzyklase bzw. Guanylylzyklase die intrazelluläre cAMP- und cGMP-Konzentration erhöhen, begünstigen die Phosphodiesterasen (PDE) die Degradation dieser beiden zyklischen Nucleotide (Schwarz *et al.*, 2001).

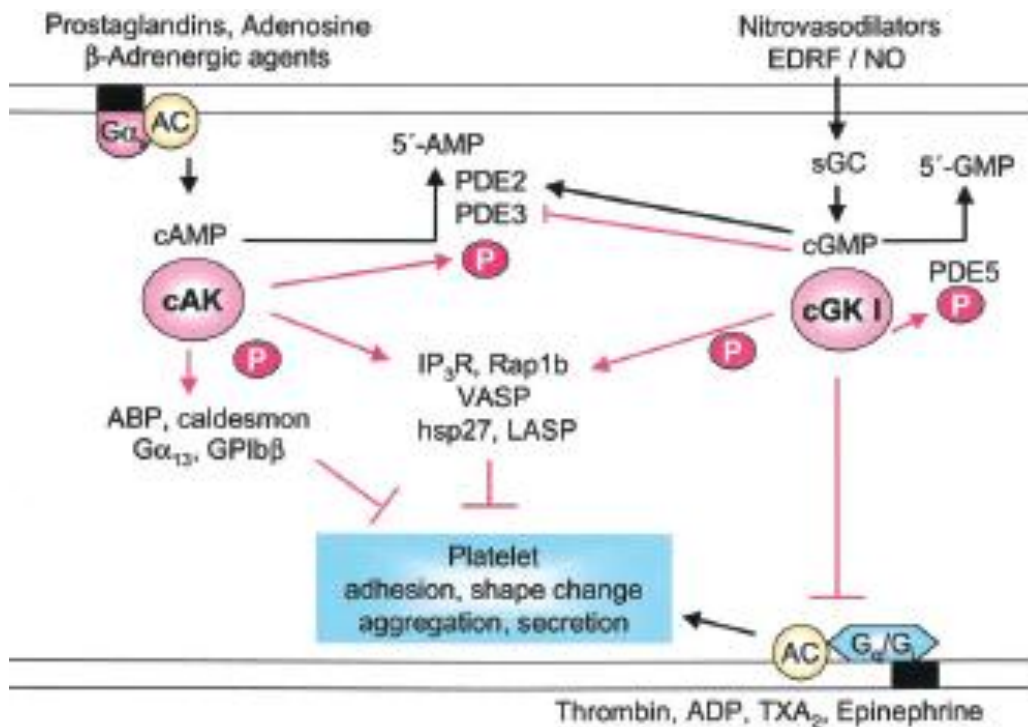


Abbildung 1.1: Regulation der zyklischen Nucleotide in Thrombozyten (Münzel et al., 2003).

1.2.1. Einfluss der zyklischen Nukleotide bei der Thrombozytenhemmung bzw. -aktivierung

Eine große Zahl von Signalstoffen bedient sich des Adenylylzyklase-Systems zur Signaltransduktion. Das Adenylylzyklase-System besteht aus Rezeptoren, heterotrimeren G-Proteinen und Adenylatcyclasen. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor aktiviert ein heterotrimeres G_s -Protein die auf der Innenseite der Zellmembran lokalisierte katalytische Domäne der Adenylylzyklase. Eine Bindung der Substanzen wie Prostaglandin E_1 (PGE_1), Prostazyklin (PGI_2), Adenosin, β -adrenerge Substanzen, Histamin oder Vasopressin an ihren jeweiligen Rezeptoren bewirkt eine Aktivierung der stimulatorischen G-Proteine (G_s -Proteine), die über ihre α -Untereinheit $G_{s\alpha}$ die Adenylylzyklase aktivieren. Diese katalysiert die Reaktion: $ATP \rightarrow 3',5'\text{-cyclo-AMP} + \text{Pyrophosphat}$. Somit wird der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht. Durch Substanzen wie Angiotensin, Somatostatin, Glutamat, Opiate, Thrombin, Epinephrin oder ADP wird ein Absinken der intrazellulären cAMP-Konzentration induziert. Dabei werden die inhibitorischen G-Proteine (G_i -Proteine) aktiviert und dies führt somit zu einer Hemmung der Adenylylzyklase durch die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit (Offermanns, 2000). Der „second messenger“ cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). PKA phosphoryliert wiederum andere intrazelluläre Proteine, die zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung beitragen. Phosphorylierung der α -Untereinheit des G_{13} -Proteins inhibiert die Rho/Rho-Kinase Signalkaskade und damit die Umorganisation des Zytoskellets (Manganello *et al.*, 1999) und Phosphorylierung von GP Ib_β führt zur Hemmung der durch Kollagen induzierten Aktinpolymerisation (Wardell *et al.*, 1989). Guanylatzyklase existiert in membrangebundener und löslicher Form. Nur die lösliche, die im Zytoplasma lokalisiert ist, wird in Thrombozyten exprimiert. Es gibt keinen Beweis dafür, dass Thrombozyten auch die membrangebundene Form der Guanylatzyklase beinhalten. Die lösliche Guanylatzyklase wird durch cGMP-aktivierende Substanzen wie den endothelium-derived relaxing factor (EDRF/NO), Natrium Nitroprusside, und andere Nitrovasodilatoren (Schwarz *et al.*, 2001) stimuliert. Eine Hypothese von Li *et al.*, 2003, die bisher nicht verifiziert wird: cGMP induziert eine biphasische Wirkung auf Thrombozyten, eine frühe stimulierende Wirkung, die die Plättchenaktivierung einleitet, und eine späte inhibierende Wirkung, die die Thrombozytenaktivierung hemmt. Die frühe plättchenstimulierende Wirkung wird

durch die cGMP-abhängige Kinase (PKG/cGK) und die PKG-abhängige Aktivierung des extracellulär signal reponsive-kinase (ERK) Signalweges vermittelt (Abb. 1.2). Der inhibitorische Effekt beruht auf der Protein-Phosphorylierung an mehreren Stellen, zwei davon sind Phosphorylierungen des vasodilator stimulated phosphoproteins (VASP) und des Thromboxan A2 Rezeptors (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999). Während in der bisher bekannten Literatur (Smolenski *et al.*, 1998; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2002; Cook und Haynes, 2007) berichtet wurde, dass VASP-Serin 239 überwiegend von PKG phosphoryliert wird, behaupten Li *et al.*, (2003), dass cGMP Analoga bzw. NO-Donatoren die VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten unabhängig von PKG induzieren, sondern wird überwiegend von PKA vermittelt. Diese Hypothese konnte aber bisher nicht verifiziert werden.

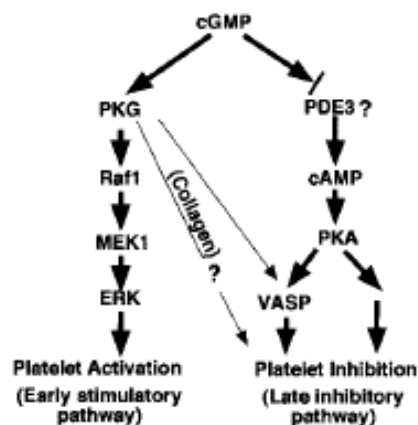


Abb. 1.2: Der Mechanismus der biphasischen Wirkung von cGMP auf Thrombozyten (Li *et al.*, 2003).

Gambaryan *et al.*, 2004 haben zwar den inhibitorischen Effekt von cGMP bestätigt, aber die Hypothese über die frühe Thrombozytenstimulierende Wirkung vermittelt durch den PKG-ERK-Signalweg von Li *et al.*, 2003 wurde nicht bewiesen. Die Erklärung für diese Diskrepanz liegt an der rapiden Inhibition von Thrombin, Thromboxane und vWF durch extrazelluläre cGMP-Analoga und der daraus folgenden Plättchenaktivierung.

Ein wichtiges Zielprotein von PKA und PKG im Rahmen der Thrombozytenhemmung ist das vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP).

Die Einbeziehung von VASP in die Plättchen-Inhibition wird dadurch stark unterstützt, dass eine erhöhte Thrombozytenaktivität bei VASP-Knockout-Mäusen und eine

reduzierte inhibierende Wirkung von cGMP nachgewiesen wurde (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999).

1.2.2. Vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)

VASP ist ein Mitglied von prolinreichen Proteinen, sogenannten Ena/VASP Proteinen (Gertler *et al.*, 1996). Alle Ena/VASP Proteine haben die gleiche Strukturdomäne: Eine N-terminale Ena/VASP Homology 1 (EVH1) Domäne, eine zentrale prolinreiche Domäne, und eine C-terminale Ena/VASP Homology 2 (EVH2) Domäne (Halbrugge und Walter 1989; Krause *et al.*, 2003) (Abb. 1.3).

Die EVH1 Domäne (Abb. 1.3) vermittelt stattdessen eine spezifische Protein-Protein-Interaktionen mit prolinreichen Peptiden. Diese Interaktion ist wichtig für die Anheftung der EVH1 Domäne an spezifischen subzellulären Stellen und an Membranrezeptoren. Die EVH1 Domäne besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen gefolgt von einer C-terminalen α -Helix (Pula *et al.*, 1998).

Die EVH2 Domäne beinhaltet die Bindungsstelle für G-Aktin (Walder-Harbeck *et al.*, 2002; Chereau und Dominguez, 2006) und F-Aktin (Bachmann *et al.*, 1999). Die Hauptfunktion von Ena/VASP Proteinen liegt darin, die Aktinfilamente vor der Bedeckung durch *capping protein* so zu schützen, dass ihre Elongation nicht gestört wird. Die Bindungsstellen für G- und F-Aktin sind notwendig zur Gewährleistung dieser Funktion (Barzik *et al.*, 2005; Bear *et al.*, 2002). Diese Schutzfunktion wird durch die Rekrutierung von Profilin in der zentralen prolinreichen Domäne verstärkt (Barzik *et al.*, 2005).

VASP wurde aus humanen Thrombozyten als 46 kDa membranassoziiertes Protein isoliert. VASP wird von PKA und PKG phosphoryliert (Halbrugge und Walter 1989; Halbrugge *et al.*, 1990). Drei Phosphorylierungsstellen wurden identifiziert (Serin 157, Serin 239 und Threonin 278), alle drei Stellen können sowohl von PKA als auch von PKG phosphoryliert werden (Butt *et al.*, 1994). In SDS-PAGE resultiert die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 in einer Veränderung der Molekularmasse von 46 kDa (im dephosphorylierten Zustand) auf 50 kDa (im phosphorylierten Zustand). Ser 157 ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der PKA, wohingegen Ser 239 von der PKG bevorzugt wird. Thr 278 wird von beiden Kinasen nur schlecht phosphoryliert (Smolenski *et al.*, 1998).

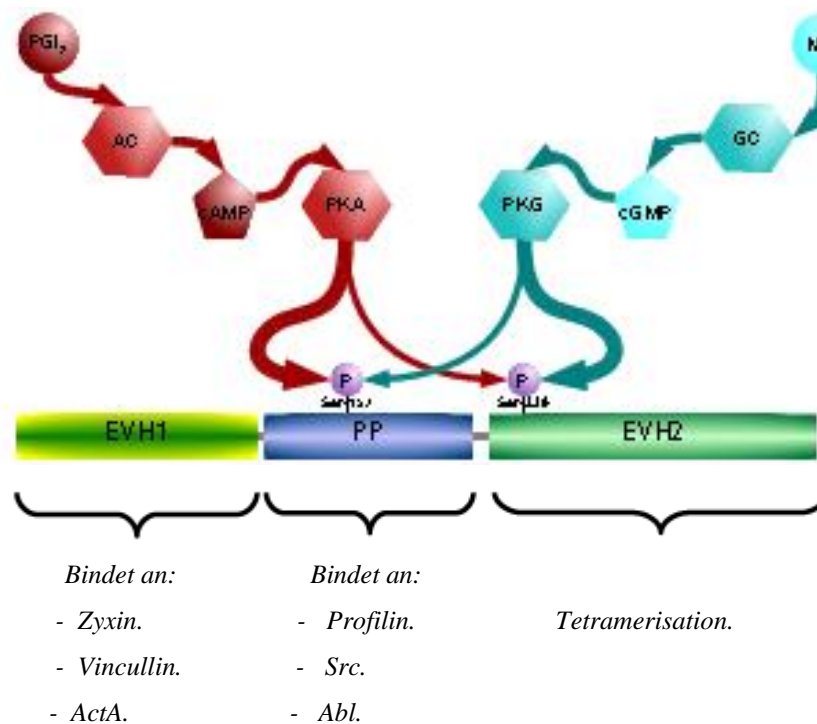


Abbildung 1.3: VASP Protein enthält drei Domänen: Ena-VASP homology domain 1 (EVH1), eine polyprolinereiche Region (PP) und ENA-VASP homology domain 2 (EVH2). Drei Phosphorylierungsstellen: Ser 157, Ser 239, Thr 278 (Geiger *et al.*, 2008).

Zusätzlich zu PKA bzw. PKG wurde berichtet (Chitaley *et al.*, 2004), dass die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 (aber nicht Serin 239) einen PKA- bzw. PKG-unabhängigen Mechanismus verwendet. In der Kultur der glatten Muskulatur der Aorta von Ratten zeigt sich, dass PKC VASP an Serin 157 direkt phosphoryliert. Wentworth *et al.* (2006) haben auch in ihrer Studie eine PKC-abhängige VASP-Phosphorylierung an Serin 157 nachgewiesen. Diese Autoren haben über eine PMA-abhängige Phosphorylierung von VASP-Serin 157 in humanen Thrombozyten berichtet (PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate ist ein Phorboldiester, der zur Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) verwendet wird) und über eine Hemmung der VASP-Phosphorylierung an Serin 157 durch Bisindolylmaleimide I (BIM I), einen spezifischen PKC-Inhibitor. Außerdem wurde in der Studie gezeigt, dass Thrombozytenaktivierung durch Thrombin, ein physiologischer Plättchenagonist, auch eine VASP-Phosphorylierung an Serin 157 induziert, welches teilweise PKC-abhängig phosphoryliert wird. Im Gegensatz dazu haben Pula *et al.* (2006) berichtet, dass VASP-Phosphorylierung an Serin 157 durch PKC negativ beeinflusst wird. Letztendlich ist der

molekulare Mechanismus für die Regulation der VASP-Phosphorylierung noch nicht eindeutig identifiziert, aber eine Teilnahme von PKA und PKG an der VASP-Phosphorylierung wurde sicher festgestellt.

VASP wird in vaskulären Endothelzellen, Thrombozyten, glatter Muskulatur und Fibroblasten stark exprimiert. Eine wichtige Funktionen von VASP ist die Regulierung der Thrombozytenadhäsion bzw. -hemmung (Massberg et al., 2004). Darüber hinaus ist phosphorylierte VASP an der Regulation von tight junction und Barrierefunktion der Endothelzellen (Comerford et al., 2002) beteiligt, VASP induziert Polymerisation von G-Aktin in F-Aktinbündel und stabilisiert diese (Laurent et al., 1999). Außerdem schützen sie Aktinfilamente vor capping protein und unterstützen die Elongation der Aktinfilamente (Bear et al., 2002). VASP spielt daher eine große Rolle sowohl in der physiologischen als auch pathophysiologischen Interaktion zwischen Plättchen und Endothelzellen. Smolenski et al. (1998) haben berichtet, dass eine Analyse der VASP-Phosphorylierung an Serin 239 als ein wichtiger Biomonitor für die PKG-Aktivität und somit für NO-Effekt in den Thrombozyten, Endothelzellen, und glatten Muskelzellen verwendet werden kann.

1.2.3. Thrombozytendysfunktion bei Diabetes mellitus

Im Allgemeinen zeigen die Thrombozyten von Diabetikern eine erhöhte Tendenz zu adhären und aggregieren, ausgelöst sowohl spontan, als auch induziert durch Stimulantien. Die aktivierten Plättchen unterliegen einer Interaktion mit anderen Zellen wie Endothelzellen, Leukozyten und anderen Prokoagulanten, welche zur Pathogenese von Atherosklerose beitragen können. Wichtige Faktoren, die zur Hyperaktivität von Thrombozyten führen, sind: Glykierung von LDL, diese erhöht die thrombininduzierte Plättchenaggregation und die Produktion von Thromboxan B₂ (ein stabiler Thromboxan A₂-Metabolit. Eine wichtige Rolle spielt dabei der NO/cGMP-Signalweg. Dieser Signalweg wird durch verschiedene und komplexe Faktoren beeinflusst. Der Mechanismus der Thrombozytenhemmung, der durch Stickstoffmonoxid (NO) reguliert wird, scheint bei Diabetes mellitus gestört zu sein. Die Störung des NO-Metabolismus beruht auf folgenden Faktoren:

A.) Gestörte Regulation von Calmodulin (CaM).

Ca²⁺-CaM aktiviert das Enzym Nitric Oxide Synthase (NOS), das NO synthetisiert. NO aktiviert wiederum die lösliche Guanylatzyklase, und erhöht damit den intrathrombozytären cGMP-Spiegel. Somit wird der Phosphorylierungsprozess von VASP stimuliert, was wiederum bedeutet, dass die Thrombozytenaktivierung gehemmt wird. Mazzanti und Mutus (1997) haben in der Studie gezeigt, dass 22 % der intrathrombozytären CaM bei Diabetikern glykosyliert vorkommen. Das bedeutet, 15 % mehr als bei normalen gesunden Menschen. Der Glykosylierungsprozess hemmt die Funktion von CaM und somit wirken glykosylierte CaM weniger effektiv auf ihre Zielenzyme. Da CaM eine indirekte Rolle in der Thrombozytenhemmung via Aktivierung der thrombozytären NOS spielen, nimmt das glykierte CaM an der Störung des NO-Metabolismus der diabetischen Thrombozyten teil.

B.) Reduzierte NO-Bioverfügbarkeit entsteht durch erhöhte Suszeptibilität für Lipidperoxidation (Ox-LDL) bei Diabetikern (Pollock *et al.*, 1991; Bergh *et al.*, 1988). Diese kann durch veränderte Lipidzusammensetzung und verminderten Antioxidant-Spiegel erklärt werden. Ox-LDL vermindert die Freisetzung von NO aus Endothelzellen durch Hemmung von endothelialen NOS (Moncada *et al.*, 1991). Außerdem aktiviert Insulin die endothelialen NOS (eNOS) (Scherrer *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 2004). Pannirselvam *et al.*, 2002 haben gezeigt, dass endotheliale NOS von diabetischen Mäusen durch Oxidation an ihrem Hauptkofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) inaktiviert werden. Fukuda *et al.* (1999) haben über Oxidation von Tetrahydrobiopterin (BH4) durch Peroxynitrite (OONO⁻) berichtet. Hink *et al.* (2001) haben in ihrer Studie gezeigt, dass erhöhte Konzentration von NAD(P)H-Oxidase und Protein Kinase C (PKC) in diabetischen Thrombozyten die Konzentration des eNOS-Inhibitors, asymmetrisches Dimethylarginin, steigern. Daraus resultiert eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit bei Diabetikern. Auch eine Inaktivierung von NO-Carrier im Serum durch einen Glykosylierungsprozess kann zur verminderten NO-Bioverfügbarkeit bei Diabetikern beitragen. 60 % des Serum-NOs zirkulieren gebunden an Serum-Albumin. Dieser Hauptcarrier wird durch Glykosylierung deaktiviert und kann somit seine Funktion als NO-Carrier im Serum nicht mehr erfüllen (Farkas und Menzel, 1995).

C. Störung des thrombozytären NO-Metabolismus.

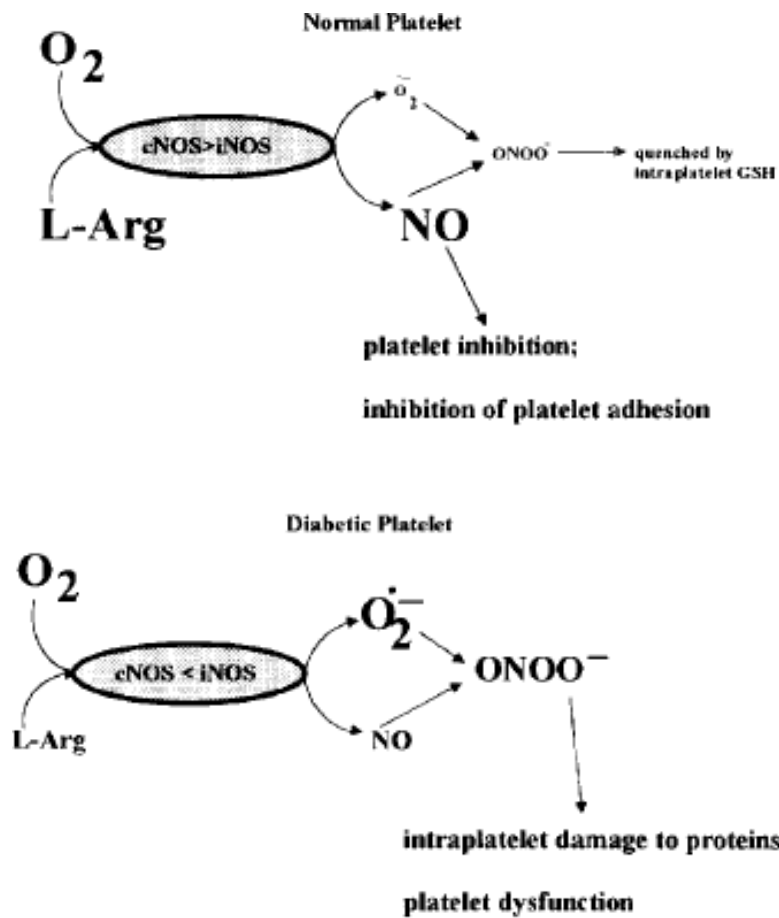


Abbildung 1.4: Vergleich zwischen pathologischem und physiologischem NO-Metabolismus in humanen Thrombozyten (Mazzanti und Mutus, 1997)

Ein indirekter Beweis für einen Rückgang des NO-Metabolismus in diabetischen Thrombozyten wurde von Muruganandam *et al.* (1993) beschrieben. Eine Veränderung der Regulation von NOS kann zu einer gesteigerten Aktivität der diabetischen Thrombozyten und evtl. zur Plättchendysfunktion führen. Die intrathrombozytäre L-Arg-Konzentration bei Diabetikern ist zwei- bis fünffach niedriger als bei gesunden Menschen, was zur reduzierten Synthese von NO führt. Im Gegensatz dazu stellt man fest, dass die NOS-abhängige Synthese von Superoxid (O₂^{•-}) in diabetischen Plättchen fünf bis 20-fach höher als bei normalen ist. Eine Kombination von reduzierter NO[•] und gesteigerter O₂^{•-} Synthese führt zur Synthese von toxischen Peroxinitriten (ONOO⁻) (Abb. 1.4). Das gestörte Gleichgewicht zwischen den Produkten (NO und O₂^{•-})

verursacht eine gesteigerte Synthese von OONO⁻ Molekülen, die Überproduktion von OONO⁻ kann dann nicht mehr von intrathrombozytärer GSH abgefangen werden und ruft eine Thrombozytendysfunktion durch eine Schädigung intrazellulärer Proteine hervor (Mazzanti und Mutus, 1997). Die Aktivität von GSH in diabetischen Plättchen ist im Vergleich zu normalen erniedrigt. Muruganandam et al. (1994) haben gezeigt, dass Thrombozyten von Diabetikern weniger GSH als die von Normalen exprimieren. Die Affinität von GSH ist außerdem reduziert durch einen nichtenzymatischen Glykosylierungsprozess (Bosia *et al.*, 1983).

1.3. Endothelzellen

Das Endothel ist ein transparenter, einschichtiger Gewebefilm, der die luminale Oberfläche des gesamten vaskulären System auskleidet. Das Endothel ist aus $1 \text{ bis } 6 \times 10^{13}$ Zellen zusammengesetzt, wiegt ca. 1 kg, und bedeckt eine Fläche von 1 bis 7 m² (Augustin *et al.*, 1994). Trotz seiner offensichtlichen Fragilität ist seine wichtige Rolle in der Regulation der Blutfließeigenschaften, im Lipoproteinmetabolismus, im kapillären Transport, in der Angiogenese, in der Interaktion zwischen Blutgefäßwand und zirkulierenden Blutelementen und in der Vasokonstriktion bzw. -dilatation nicht zu übersehen. Im Rahmen der Regulation des Blutdruckes und Blutflusses sezernieren die Endothelzellen sowohl Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) als auch Vasokonstriktoren wie Endothelin (ET) und den platelet-activating factor (PAF). Während PGI₂, ET, PAF hauptsächlich als Antwort auf eine veränderte externe Umgebung synthetisiert werden, wird NO kontinuierlich von Endothelzellen sezerniert, aber die Produktionsmenge wird durch exogene chemische und physikalische Stimuli reguliert. Ein Enzym, das zur Synthese von NO beiträgt, ist ein Isoenzym der NO-Synthase, die endotheliale NO-Synthase (eNOS/NOS III). Von der konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthase unterscheidet man grundsätzlich die ebenso konstitutiv exprimierte neuronale NO-Synthase (nNOS/NOS I). Weiterhin unterscheidet man die induzierbare NO-Synthase (iNOS/NOS II), die nur durch Zytokinstimulation z. B. im Rahmen eines septischen Schocks exprimiert wird (Moncada *et al.*, 1993). eNOS/NOS III liegt immer im aktiven Zustand vor aber wird durch rezeptorabhängige Agonisten, welche intrazelluläre Ca²⁺ erhöhen und die Asymmetrie der Plasmamembran

stören (Venema *et al.*, 1995), stimuliert. Diese Agonisten sind Thrombin, Adenosin 5'-Triphosphat, Bradykinin, Substanz P und auch *shear stress* (Topper *et al.*, 1996).

1.3.1. Endothelium derived relaxing factor (EDRF/NO)

NO wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS/NOS III) aus L-Arginin synthetisiert (Amezcuca *et al.*, 1989). Dieses Enzym ist Ca^{2+} - und calmodulinabhängig. NO erfüllt wichtige Aufgaben, wie z. B.: Aufrechterhaltung des vaskulären Basaltonus durch Entspannen der Zellen der glatten Muskulatur. Endogenes NO diffundiert durch die glatte Gefäßmuskulatur, wo es die lösliche bzw. membrangebundene Guanylatzyklase aktiviert (Chu *et al.*, 1990). Daraus entsteht aus Guanosin 5'-Triphosphat (GTP) das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieses aktiviert wieder die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK/PKG). Münzel *et al.* (2003) haben über zwei Isoenzyme der cGK/PKG berichtet. Die membranständige cGK II ist in vielen verschiedenen Organen zu finden (z.B. Alveolarzellen, Chondrozyten). Die zytoplasmatischen cGK I α und β werden in den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Die zytosolische Kalziumkonzentration wird über eine Phosphorylierung von intrazellulären Zielproteinen vermindert und somit wird die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur eingeleitet (Torfgard *et al.*, 1990). cGMP wird durch Phosphodiesterase (PDE) 1 und 5 in 5-Guanosin Monophosphat (5 GMP) abgebaut. cGMP entfaltet ihre gefäßerweiternde Wirkung durch Bindung und Aktivierung von Proteinkinase G (PKG/cGK), welche andere intrazelluläre Proteine phosphoryliert und zur Reduzierung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Wanstall *et al.* (2005) haben in ihrer Studie gezeigt, dass ein alternativer Signalweg existiert, der cGMP-unabhängig ist. Dieser cGMP-unabhängige Mechanismus wird durch mehrere Faktoren unterstützt. Diese Faktoren sind: Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen (BK_{Ca}) (Bolotina *et al.*, 1994) und Na^+/K^+ -Adenosin Triphosphatase (ATPase), Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (SR) (Pucovsky *et al.*, 2002), Hemmung der Synthese der vasokonstriktorisch wirkenden 20-Hydroxyeicostatetraenoid Säure (20-HETE) (Morgan *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998), direkte Hemmung des 5-HT₂-Rezeptors (Alonso-Garcia *et al.*, 1998) und beschleunigte Ca^{2+} -Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum durch Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums (SERCA). Letztere kann zur Hemmung der

Thrombozytenaggregation beitragen (Trepakova *et al.*, 1999). EDRF/NO hemmt außerdem Plättchenadhäsion, -aggregation und -sekretion. Diese Inhibition der Thrombozytenaktivierung erfolgt durch Hemmung der Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche und des intrazellulären Kalziumanstiegs. Durch Rückgang des intrazellulären Kalziumanstiegs kann die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des Glykoproteins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, einem Rezeptor für Fibrinogen, unterbunden werden (Michelson *et al.*, 1996).

1.3.2. Prostaglandin

Prostaglandine sind die meist synthetisierten Eicosanoide in der glatten Gefäßmuskulatur und in den Endothelzellen (Majerus, 1983). Die Synthese der Prostaglandine erfolgt in drei Stufen durch Aktivierung des Cyclooxygenase-Signalweges (Hansen *et al.*, 1999): a) Die durch Stimulus induzierte Mobilisation von Arachidonsäure aus den Phosphoglyceriden der Plasmamembran; b) Die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandin H_2 (PGH_2) durch PGH-Synthase; c) Die Isomerisation der PGH_2 in biologisch aktive Endprodukte (PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 , TXA_2). Faktoren, welche die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Plasmamembran bewirken, sind: α -Thrombin, Histamin, Bradykinin, Leukotrien C4 und *shear stress* (Alhenc-Gelas *et al.*, 1982). Zwei Enzyme sind an der Freisetzung der Arachidonsäure beteiligt: Phospholipase A_2 , welche Phosphatidylcholin spaltet und Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol spaltet (Wilson *et al.*, 1984). Eines der Prostaglandine, Prostazyklin (PGI_2), ist ein potenter Vasodilatator mit kurzer Halbwertszeit von 2–3 Min. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit wurde ein Prostazyklinanalagon (Iloprost) mit einer Halbwertszeit von 20 bis 30 Min. entwickelt. Die Wirksamkeit von Iloprost beträgt 60–90 Min., während Prostazyklin über einen Zeitraum von lediglich 15 Min. wirkt (Mutschler *et al.*, 2008). Nach Diffusion bindet es an den membranständigen G-Protein-gekoppelten IP-Rezeptor in den Thrombozyten. Dadurch wird das Gs-Protein aktiviert, das wiederum Adenylatzyklase synthetisiert. Somit steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration an. Über Aktivierung von PKA/cAK durch cAMP wird eine Phosphorylierungskaskade von Zielproteinen ausgelöst, die zur Hemmung der Thrombozytenaggregation führt (Shaul *et al.*, 1994).

1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Diagnoseverfahren, welche die intrazelluläre Aktivität humaner Thrombozyten quantitativ erfassen können. Da die Hemmung humaner Thrombozyten durch die Phosphorylierung des *vasodilator stimulated proteins* (VASP) mitreguliert wird, sollte eine Methode etabliert werden, welche auf der Verwendung phosphorylierungsspezifischer Antikörper an einem quantitativen Immunoassay basiert. Eine brauchbare Testmethode für die endotheliale Dysfunktion steht zur Zeit nicht zur Verfügung. Eine Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von VASP in Thrombozyten als FACS-Methode wurde etabliert, und inzwischen auch für den klinischen Einsatz evaluiert. Die laufende Entwicklung hat als Ziel, die Bestimmung der VASP-Phosphorylierung im Vollblut durch ein gängiges und einfach zu handhabendes Testsystem zu etablieren. Aufgrund der Beeinflussung des Phosphorylierungszustandes von VASP in den Thrombozyten durch die Wirkmechanismen mancher Vasodilatoren kann die Methode auch dazu verwendet werden, indirekt Rückschlüsse auf die Wirkweise dieser Substanzen zu gewinnen.

Eine Interaktion zwischen Endothelzellen und Thrombozyten spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines funktionell intakten Blutgefäßsystems. Ein gestörtes Gleichgewicht dieser Interaktion kann zur Entstehung vaskulärer Komplikationen wie Thrombus bzw. Atherosklerose beitragen. Aus diesem Grund versucht man, eine Analysenmethode zu entwickeln, die prädiktiv eine Störung der Endothelfunktion nachweisen kann. Dieses Analysenverfahren wird gezielt eingesetzt, um eine pathologische Veränderung des Funktionszustandes humaner Thrombozyten und eine endotheliale Dysfunktion sowohl direkt als auch indirekt in der Frühphase zu erfassen und nachzuweisen. Um ein besseres Verständnis der Rolle der Thrombozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen zu gewinnen, wird *in vitro* ein Co-Inkubation-Versuch durchgeführt. Dabei wird der Einfluss von Endothelzellen auf die Thrombozytenhemmung bzw. -aktivierung analysiert. Der Phosphorylierungszustand von VASP wird durch die Gabe verschiedener Substanzen erfasst, die Thrombozyten intrazellulär an bestimmten Stellen hemmen, oder die Endothelzellen bei der Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen unterstützen.

Im Rahmen der Pathophysiologiestudie bei Diabetes mellitus werden auch die Effekte bestimmter Vasodilatoren auf die Thrombozyten von Diabetikern anhand des Phosphorylierungszustandes von VASP analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
16C2	Phospho-VASP Ser-239		Maus	ImmunoGlobe	1:5 (für VASP-POD)
5C6	Phospho-VASP Ser-157		Maus	ImmunoGlobe	1:5 (für VASP-POD)
IE273	Gesamt-VASP		Maus	ImmunoGlobe	1:10 (für VASP-POD)
Goat-Anti-Mouse-IgG (für VASP-POD)	Maus	Peroxidase	Schaf	Chemicon	100 µl pro Napf

2.1.2. Chemikalien und Lösungen

ABTS-Tabletten

Roche

AH 6809

Albumin bovine serum (BSA)

Sigma

CAY 10441

Cayman

Diclofenac		
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Merck
EDTA		Gibco
EGTA		Sigma
Ethanol		Merck
Hepes (Sodium Salz)		Sigma
Iloprost		Schering
Kalium-Chlorid		Merck
Kalzium-Chlorid		Merck
L-Arginin		Sigma
L-NAME		Tocris
Magnesium-Chlorid		Merck
Natriumchlorid		Merck
Natriumcitrat-Dihydrat		Merck
Natriumnitrit (NaNO ₂)		Merck
Na ₂ HPO ₄ (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)		Merck
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat)		Merck
NOC-9		
PBS (Mg ²⁺ /Ca ²⁺ frei)		Dulbecco
SNP (Natrium nitroprussid /Sodium Nitroprusside)		Sigma/Aldrich
Tween		Serva

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Bechergläser		Schott
Desinfektionspray	Terralin Liquid	Schülke&Mayr
Dialysekanüle	1,8mm	Bionic Medizintechnik
Einmalhandschuhe	Flexam Puderfrei Latex	Cardinal Health
Eppendorf Caps	1,5ml und 2ml	Eppendorf
Erlenmeyerkolben		Schott
Flaschen		Schott

Material und Methoden

Greiner Röhren	50ml Cellstar [®] PP-Test tubes	Greiner bio-one
	15ml Cellstar [®] PP-Test tubes	Greiner bio-one
Hautdesinfektion	Cutasept [®] F	BODE Chemie
Low bind tubes	Protein LoBind Tube 1,5ml	Eppendorf
Multipipette Spitzen	TipStackPack	Sarstedt
Parafilm	Parafilm „M“	American National Can _{TM}
Pflaster	Hansaplast soft	Hansaplast
Pipettenspitzen	0,1-20 µl ep T.I.P.S. standard	Eppendorf
	2-200 µl ep T.I.P.S. standard	Eppendorf
	1000 Pipette Tips	Greiner bio-one
	1000 µl Filter Tip “XL”	Biozym
	cod.EG 500 pipette tip 1,5ml	BicappaLAB
Plastikpipetten	Costar [®] Stripette 10ml	Corning
	Costar [®] Stripette 25ml	Corning
POD-Platten	Nunc Immobilizer TM	NUNC
Schwarze Caps	Rotilabo [®] 1,5ml	ROTH
Tupfer	Pur-Zellin [®]	HARTMANN

2.1.4. Geräte

Eismaschine		Scotsman
Feinwaage	Sartorius	Heinse+Ziller
Magnetrührer	Ikamag	Janke&Kunkel
Mehrkanalpipette		Biohit
Millipore-Anlage	Milli-Q ^{UF}	Millipore
Plattenschüttler	Wallac	
Saugpumpe		KNF
Shaker		Heinse+Ziller
Waage	440-35N	KERN

Wascher	Microplate Washer	Tecan
Wasserbad	Thermo Electron Corporation	Haake
Vortexer	Vortex Genie 2 TM	Bender&Hobein AG
Zellzähler	Technicon H.3 RTC	Bayer
Zentrifugen	Centrifuge 5415C	Eppendorf
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	3K1	Sigma

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme

Das Blut wird aus der Armvene mit einer dicken Kanüle (Fa. Bionic: Dialysekanüle venös, Durchmesser: 1,8 mm) von gesunden, nichtrauchenden, freiwilligen Spendern, die mindestens zwei Wochen vor Entnahme des Blutes nicht unter dem Einfluss von Medikamenten, insbesondere Thrombozytenaggregationshemmer (ASS, usw.) standen, abgenommen. Ein 50 ml Greiner-Röhrchen wird vorbereitet, und 10 ml auf Raumtemperatur zuvor erwärmter CCD+EGTA-Puffer vorgelegt. Der Arm wird mit einem Stauschlauch gestaut, danach wird eine prallgefüllte Vene unter der Haut durch Abtasten gesucht, kurz vor Anlegen der Nadel wird Desinfektionsmittel auf die zu stechende Haut gesprüht. 40 ml Blut mit der Dialysekanüle abnehmen, und direkt in das Röhrchen fließen lassen. Das Röhrchen wird vorsichtig geschwenkt um eine optimale Durchmischung mit dem Puffer zu gewährleisten.

2.2.2. Gewinnung von Thrombozytensuspension (washed platelets)

In einem 50 ml-Röhrchen wird 10 ml CCD+EGTA-Puffer vorgelegt und 40 ml Blut abgenommen. Das entnommene Blut wird direkt nach der Abnahme 20 Min. bei 300 g

und 18°C zentrifugiert. Ca. 20-25ml des Überstandes (das platelet rich plasma ; PRP, welches neben Blutplasmabestandteilen nahezu ausschließlich Thrombozyten enthält) wird mit einer Einmal-Plastikpipette langsam und sorgfältig abgenommen und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt, und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird der Überstand für 10 Minuten bei 380 g und 18°C erneut zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand, nämlich das plättchenarme Plasma (platelet poor plasma; PPP) wird verworfen, und der Bodensatz (Thrombozyten) wird schnell in Hepes-Puffer resuspendiert. Anschließend bestimmt man die Thrombozytenzahl mit einem Zellzählgerät der Firma Bayer.

CCD + EGTA-Puffer (PH 6,5):

100 mM Na-Citrat

7 mM Citronensäure

40 mM Glucose

15 mM EGTA

Die Substanzen in einem Erlenmeyer-Kolben zu geben und in 800 ml Milli-Q-H₂O einrühren. Danach stellt man den pH-Wert mit 1M HCl bzw NaOH auf 6,5 ein. Nach der pH-Einstellung wird der Erlenmeyer-Kolben auf 1000 ml aufgefüllt und man lässt alles für ca. 20 Minuten rühren.

Hepes-puffer:

145 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl₂

10 mM Hepes

10 mM Glucose

2.2.3. Die Grundlage des quantitativen Immuno-Assays

Immunoassays spielen eine sehr große Rolle in der medizinischen Diagnostik und Forschung. Mittels dieser Methoden kann man Biomoleküle und andere chemische

Moleküle aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit nachweisen. Das Prinzip der Immunoassays beruht im Wesentlichen auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei bindet ein Antikörper spezifisch mit seinem Paratop das entsprechende Epitop des Antigens. Es gibt drei Faktoren, die zu dieser Antigen-Antikörper-Reaktion beitragen:

1. Die Bindung des Antikörpers an das Antigen wird über Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte vermittelt. Diese Bindung ist nicht anders als eine Gleichgewichtsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt.
2. Affinität bzw. Avidität des Paratops zu dem entsprechenden Epitop. Je größer die Affinität bzw. Avidität der Antikörper ist, desto stabiler wird die Antigen-Antikörperbindung sein.
3. Temperatur, bei der die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet. Die Immunkomplex-Bindung wird bei hohen Temperaturen schneller ausgebildet.

Zum Aufbau eines quantitativen Immunoassays (VASP-POD-Assay) benötigt man:

- Ein Antigen.

Hier wird das *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP)* verwendet. VASP, ein Protein mit einer Molekularmasse von 46 kDa in dephosphoryliertem Zustand und 50 kDa in phosphoryliertem Zustand (Halbrügge *et al.*, 1989), besitzt drei Phosphorylierungsstellen (an Serin 157, Serin 239 und Threonin 278). Ser 157 ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der PKA, wohingegen Ser 239 von der PKG bevorzugt wird. Thr 278 wird von beiden Kinasen nur schlecht phosphoryliert. Nach Aktivierung von zwei Signalwegen (NO/cGMP- und PGI₂/cAMP Signalweg) wird VASP von der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK) bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK) phosphoryliert (Smolenski *et al.*, 1998). Eine hohe VASP-Phosphorylierungsrate korreliert mit der Hemmung der Thrombozytenaktivität, was wiederum bedeutet, dass eine verstärkte Aktivierung der beiden Signalwege (NO/cGMP- und PGI₂/cAMP Signalweg) zur Hemmung der Thrombozytenaggregation führt. VASP wird vor allem in Blutgefäßwänden und Thrombozyten in hoher Konzentration exprimiert. Die Konzentration von VASP im Gesamtblut liegt bei etwa 2-3 µg/ml. Der Phosphorylierungsstatus von VASP spielt mittlerweile eine große Rolle

als Monitor des Therapieerfolges mancher Medikamente (insbesondere Thrombozytenaggregationshemmer). Einige metabolische Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus) vermindern den Therapieerfolg dieser Medikamente durch Beeinflussung des NO/cGMP- bzw. PGI₂/cAMP Signalweges.

- Antikörper.

Im VASP-POD-Assay wird ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG1 κ aus der Spezies Maus, der spezifisch gegen VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 gerichtet ist, verwendet. Monoklonale Antikörper, künstlich hergestellte Antikörper, die von einem einzigen B-Lymphozyten-Klon gebildet werden und daher einheitlich in ihrer Struktur sind, sind polyklonalen Antiseren vorzuziehen. Der Grund dafür ist, dass sie nur ein einziges Epitop auf dem Antigen erkennen. Diese Monospezifität gewährleistet ein minimales Maß an zu erwartenden Kreuzreaktivitäten und damit unspezifischer Bindungen im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern.

- Marker.

Die Quantifizierung des Antigens (VASP) wird durch Konjugation von Meerrettichperoxidase an den Anti-Maus IgG Antikörper ermöglicht. Im VASP-POD-Assay wird ABTS (Diammonium-2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) durch die Peroxidase in ein Radikal umgewandelt, das photometrisch leicht detektierbar ist. ABTS ist ein spezieller Redoxindikator. Die freie Säure, eine Verbindung aus der Stoffklasse der 2,2'-Azine kann leicht homolytisch in stabile Radikale gespalten werden. In oxidativem wässrigem Milieu bildet ABTS ein stabiles, grün gefärbtes Radikalkation, das photometrisch nachgewiesen werden kann.

Zum Verdünnen von Antikörper- und Antigenlösungen sollte man aufgrund ihrer niedrigen Proteinbindekapazität Gefäßmaterialien aus Glas oder Polycarbonat verwenden.

2.2.4. Prinzip des VASP-POD-Assays

Eine Blutprobe bzw. gewaschene Thrombozyten (WP) wird direkt nach Gewinnung mit einem CCD+EGTA-Puffer gemischt, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Anschließend wird die Blutprobe für bestimmte Zeit mit zu testenden Substanzen (Vasodilatoren, Thrombozytenaggregationshemmer) im Wasserbad bei

physiologischer Temperatur (37°C) inkubiert. Unter Wirkung dieser Substanzen ändert sich der Phosphorylierungsstatus des VASP innerhalb der Thrombozyten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird dieser Phosphorylierungsvorgang unterbrochen, indem eiskalter Lyse-Puffer dazugegeben wird, der die Thrombozyten sofort lysiert und den Phosphorylierungsvorgang des VASP innerhalb der Thrombozyten sofort unterbricht. Wichtig ist dabei, dass die Transparenz der Blutprobe von “trübe” nach “klar” wechselt. Dies zeigt den Fortgang der Lyse aller zellulären Blutbestandteile und ist bei gutem Schütteln in weniger als eine Minute vollzogen. Die Blutprobe kann jetzt bei 4°C mindestens 24 Stunden gelagert werden (ohne Verlust des VASP-Gesamtsignals und der Phosphorylierung von VASP). Die Probe kann bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut werden. Danach ist eine Bestimmung des Phospho-VASP Status problemlos möglich.

Das in der gewonnenen Mischung enthaltene VASP wird danach mit Zyxin, das spezifisch an VASP bindet, aus der Probe extrahiert. Zyxin wurde zuvor kovalent an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt. Die Bindung an Zyxin ist nicht durch den Phosphorylierungsstatus des VASP beeinflussbar. Die Detektion der Gesamt-VASP und dessen Phosphorylierung erfolgt dabei mit Hilfe monoklonaler Antikörper der Klasse IgG1κ, die an definierte Epitope binden:

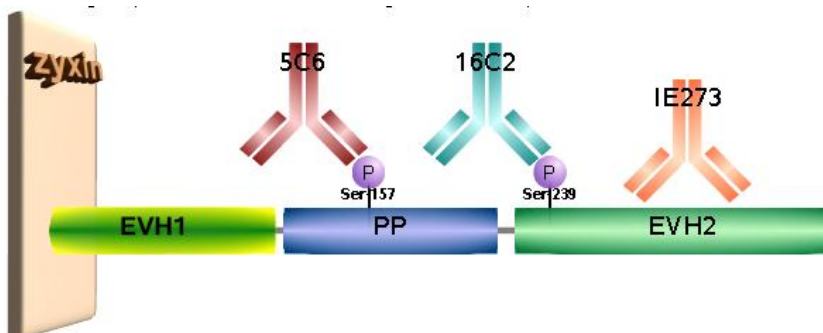


Abbildung 2.1: Quantifizierung von Phospho-VASP durch Bindung monoklonaler Antikörper. VASP ist an Zyxinbeschichtete ELISA-Platten gebunden. Die Gesamt-VASP wird durch die Antikörper gegen EVH2 Domäne-unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des VASP-bestimmt. Phospho-VASP an Serin-157 bzw. Serin-239 wird durch Antikörper 5C6 bzw.16C2 erkannt (Geiger *et al.*, 2008).

- 16C2 erkennt spezifisch phosphoryliertes VASP-Serin 239 (Abbildung 2.1).
- 5C6 erkennt phosphoryliertes VASP-Serin 157 (Abbildung 2.1).
- IE273 erkennt VASP unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus zur Bestimmung der Gesamtmenge des immobilisierten VASP (Gesamt-VASP) (Abbildung 2.1).

Alle drei Immunoglobuline sind monoklonale Antikörper derselben Klasse (IgG1 κ) aus der Spezies Maus. Der Nachweis dieser monoklonalen Antikörper wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten Anti-Maus IgG Antikörper im DELFIA-System (PE Wallac) geführt. Dabei wird eine photometrische Detektion bei 405 nm verwendet. Der Phosphorylierungsgrad von VASP kann somit als Verhältnis der ermittelten Signale von Phospho-Serin-239/Gesamt-VASP (16C2/IE273) bzw. Phospho-Serin-157/Gesamt-VASP (5C6/IE273) ausgedrückt werden. Als Leerwert wird VASP-depletiertes Blut oder 5 % Albumin Bovine Serum (BSA) in Lyse-Puffer verwendet.

Herstellung von depletiertem Blut als Leerwert im ELISA:

Für Vollblut: VASP-depletiertes Blut:

Ca. 25 ml Vollblut von gesunden humanen Spendern wird mit einer 1,8 mm Dialysekanüle aus einer Vene der Armbeuge entnommen, und direkt mit vorgelegtem 25ml Lyse-Puffer in 50ml Greiner-Röhrchen vermischt und kurz geschwenkt. Es wird darauf geachtet, dass der Spender mindestens zwei Wochen vor Entnahme des Blutes keine Medikamente eingenommen hat, welche die Blutplättchenfunktion beeinträchtigen könnten. Danach werden 100 μ l lysiertes Vollblut auf jedes „well“ einer zyxingecoateten Platte (96er Well) pipettiert und drei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird das Vollblut auf eine neue zyxinbeschichtete Platte pipettiert und wieder erneut für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann nochmals auf eine neue Zyxin-Platte gegeben und wieder drei Stunden oder über Nacht geschüttelt. Am Ende wird das Vollblut aus allen wells gepoolt, in Eppendorf Caps (1,5 ml oder 2 ml Caps) aliquotiert, und im Assay als Leerwert/Background-Wert eingesetzt.

Als Leerwert/Background-Wert für Versuche mit washed platelets:

- 5% BSA in Lyse-Puffer:

50 mg Bovines serum albumin (BSA) werden in 1 ml Lyse-Puffer gelöst. Die Lösung wird in die wells der Zyxin-Platte pipettiert und 1:10 mit 1xPBS verdünnt.

Auswertung: Der Anteil an phosphoryliertem VASP in Prozent berechnet sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte von 16C2 bzw. 5C6 und des Absorptionswertes von IE273, jeweils abzüglich der entsprechenden Leerwerte. Dabei werden die Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD) zur Berechnung verwendet (Abbildung 2.2).

$$r_{ps157} = \frac{OD_{405}(sample)_{5C6}}{OD_{405}(sample)_{IE273}} \cdot \frac{OD_{405}(depl)_{5C6}}{OD_{405}(depl)_{IE273}} \quad (1) \quad r_{ps239} = \frac{OD_{405}(sample)_{16C2}}{OD_{405}(sample)_{IE273}} \cdot \frac{OD_{405}(depl)_{16C2}}{OD_{405}(depl)_{IE273}} \quad (2)$$

r_{ps157} : VASP phosphorylation ratio for Ser-157
 $OD_{405}(depl)_{5C6}$: optical density of VASP depleted sample with 5C6 as primary antibody at 405nm
 $OD_{405}(sample)_{5C6}$: optical density of sample with 5C6 as primary antibody at 405nm
 r_{ps239} : VASP phosphorylation ratio for Ser-239
 $OD_{405}(sample)_{16C2}$: optical density of sample with 16C2 as primary antibody at 405nm
 $OD_{405}(depl)_{16C2}$: optical density of VASP depleted sample with 16C2 as primary antibody at 405nm

Abbildung 2.2: Auswertung von Phospho-VASP Ratio (Geiger *et al.*, 2008).

2.2.5. Durchführung des VASP-POD-Assays

Mithilfe dieses Assays kann der Funktionszustand von Thrombozyten anhand des Phosphorylierungsstatus von VASP in Thrombozyten mittels monoklonaler Antikörper der Klasse IgG1 κ , die spezifisch an VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 binden, erfasst werden.

Herstellung der Zyxin-Platten.

Für 4 Mikrotiterplatten (je 96 wells):

Man nimmt 1 Cap Zyxin aus dem Gefrierschrank und lässt es kurz auftauen, danach wird der Zyxin-Cap kurz anzentrifugiert. Durch Mischung von 40 ml Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0) mit 1 Cap Zyxin (100 mM) ergibt eine Endkonzentration von 0,5 μ g/Well Zyxin auf der Platte. In jedes Well werden mithilfe einer Mehrkanalpipette (Fa. Biohit) je 100 μ l Lösung gegeben. Insgesamt werden vier Platten vorbereitet und Platten

mit Alufolie bedeckt (um Abweichungen in den Messwerten aufgrund des entstehenden Kondenswassers zu vermeiden). Die mit Alufolie bedeckten Platten werden auf einen Schüttler (Wallac Schüttler) gestellt, und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag werden die beschichteten Platten vom Schüttler genommen und dreimal mit PBS-T mit einer Tecan-Waschgerät gewaschen. Zur Lagerung werden die Platten mit Frischhaltefolie umwickelt und bei -22°C eingefroren.

Befüllung der Platten:

Man nimmt zyxinbeschichtete Platten aus dem Gefrierschrank und lässt sie auftauen. Die Platten werden danach mit PBS und Proben (VB bzw. WP) befüllt (entsprechend der Verdünnung).

Für 16C2 (Verdünnung 1:5): 20 µl Probe (VB bzw. WP) + 80 µl 1xPBS.

Für 5C6 (Verdünnung 1:5): 20 µl Probe (VB bzw. WP) + 80 µl 1xPBS.

Für IE 273 (Verdünnung 1:10): 10 µl Probe (VB bzw. WP) + 90 µl 1xPBS.

Zusätzlich werden ein Leerwert (depletiertes Blut bzw. 5% BSA) aufgetragen.

Die Platten werden für eine Stunde abgedeckt auf dem Schüttler (Fa. Wallac) inkubiert und die Proben werden in den Gefrierschrank zurückgestellt.

Nach der Inkubation werden die Platten vom Schüttler genommen und 3× mit PBS-T gewaschen, bevor pro Well 100µl „Erstantikörper“ zugegeben werden.

Ansetzen des „Erst-Antikörpers“:

Für 16C2: 1:1820 verdünnt in 1xPBS (Konzentration von 5µg/ml).

Für 1 Platte: 5,5 ml 1xPBS + 3,02 µl 16C2.

Für 5C6: 1:540 verdünnt in 1xPBS (Konzentration von 5µg/ml).

Für 1 Platte: 5,5 ml 1xPBS +10,19 µl 5C6.

Für IE273: 1:1670 verdünnt in 1xPBS (Konzentration 1µg/ml).

Für 1 Platte: 5,5 ml 1xPBS + 3,29 µl IE273.

Es werden jeweils 100 µl der jeweiligen Antikörper-Verdünnungen mit einer Konzentration von je 5 µg/ml in die Wells der Platte pipettiert. Danach kommen die Platten wieder auf den Schüttler und werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Material und Methoden

Ansetzen des „Zweit-Antikörpers“:

Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP: 1:2000 verdünnt in 1xPBS.

Für 1 Platte: 11 ml 1xPBS + 5,5 µl „Zweit-Antikörper“.

Die Platten werden vom Schüttler geholt und wiederum 3× mit PBS-T gewaschen. 100µl Zweitantikörper/Well werden zugegeben. Nachdem der zweite Antikörper aufgetragen wurde, kommen die Platten wieder für eine Stunde auf den Schüttler und werden danach 3× gewaschen.

100µl der ABTS-Lösung werden in jedes Well zugegeben und die Platten werden für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgt die photometrische Messung der VASP-Phosphorylierungsrate -bei einer Absorption von 405 nm- für 1,0 Sekunden im VictorTM 1420 Multilabel Counter der Firma Wallac. Messergebnisse werden als Ratio von phosphoryliertem VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 zu Gesamt-VASP dargestellt, wobei von jeder Probe Triplikate gemessen werden.

10x PBS (pH 7,4)

1,37 M NaCl (80 g)

27 mM KCl (2 g)

10x PBS (pH 7,4)

1,37 M NaCl (80 g)

27 mM KCl (2 g)

80 mM Na₂HPO₄ (14,4 g)

17 mM NaH₂PO₄ (2,4 g)

pH-Wert mit 1M NaOH auf 7,4 einstellen.

1xPBS:

100 ml 10xPBS-Puffer

1000 HPLC-Wasser zugeben

pH-Wert mit 1M HCl bzw. NaOH auf 7,4 einstellen.

Ansetzen von PBS-T

Ein Erlenmeyerkolben wird mit 200 ml 10x PBS abgefüllt.

Danach füllt man ihn mit Milli-Q-H₂O auf 2 L auf.

2 ml 0,1% Tween-20 werden zugegeben.

Man lässt alles ca. 15 Min. rühren.

100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 8):

0,9758 g NaH₂PO₄

13,04 g Na₂HPO₄

pH-Wert mit 1M NaOH auf 8,0 einstellen.

ABTS-Lösung

36 ml HPLC-H₂O

2x2 ml ABTS-Puffer (2 Caps)

1 ABTS-Tablette

Je 100 µl in alle wells pipettieren.

2.2.6. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten (washed platelets) mit SNP

Natrium Nitroprusside (SNP) ist bekannt als ein NO-Donor. In diesem Versuch wird der Effekt von SNP auf den Phosphorylierungsstatus der Thrombozyten ermittelt, indem man 300 µl frisch entnommenes Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit 3 µl SNP in steigender Konzentration für 10 Minuten inkubiert. Die SNP-Endkonzentrationen sind: 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 500 µM, 1000 µM. Eine SNP-Konzentration von 100 mM wird als Primärlösung hergestellt, dies entspricht 29,8 mg SNP in 1 ml H₂O. Für sieben verschiedene SNP-Konzentrationen (100 mM; 50 mM; 5 mM; 2 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,2 mM) werden sieben schwarze, lichtdichte Caps (SNP ist sehr lichtempfindlich und zersetzt sich schnell) der Firma Roth verwendet.

Verdünnungsreihe für SNP:

- 100 mM SNP-Stock wird auf 50 mM SNP-Stock verdünnt (1:2 Verdünnung):
10 ml vom 100 mM SNP-Stock + 10 ml H₂O.
- 50 mM SNP-Stock wird auf 5 mM SNP-Stock verdünnt (1:10 Verdünnung):
2 ml vom 50 mM SNP-Stock + 18 ml H₂O.
- 5 mM SNP-Stock wird auf 2 mM SNP-Stock verdünnt (1:2,5 Verdünnung):
4 ml vom 5 mM SNP-Stock + 6 ml H₂O.
- 2 mM SNP-Stock wird auf 1 mM SNP-Stock verdünnt (1:2 Verdünnung):
5 ml vom 2 mM SNP-Stock + 5 ml H₂O.
- 1 mM SNP-Stock wird auf 0,5 mM SNP-Stock verdünnt (1:2 Verdünnung):
5 ml vom 1 mM SNP-Stock + 5 ml H₂O.
- 0,5 mM SNP-Stock wird auf 0,2 mM SNP-Stock verdünnt (1:2,5 Verdünnung):
4 ml vom 0,5 SNP-Stock + 6 ml H₂O.

Anschließend werden acht low bind tubes der Firma Eppendorf vorbereitet. Es wird darauf geachtet, dass unbedingt low bind tubes verwendet werden, weil diese verhindern, dass Thrombozyten oder Proteine nach der Thrombozytenlyse an der Wand des Gefäßes anheften, was zur Verfälschung der Messung führen kann. In jedes Röhrchen werden 300 µl Vollblut bzw. washed platelets und 3 µl SNP pipettiert.

Stimulation vom Vollblut (VB) bzw. von den gewaschenen Thrombozyten (WP) mit SNP:

- SNP 2 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 0,2 mM
- SNP 5 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 0,5 mM
- SNP 10 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 1 mM
- SNP 20 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 2 mM
- SNP 50 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 5 mM
- SNP 500 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 50 mM
- SNP 1000 µM (Endkonzentration): 300 µl VB bzw. WP + 3 µl SNP 100 mM

Direkt danach wird jedes Röhrchen in ein Wasserbad mit Temperatur 37°C gestellt und für zehn Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wird dieser Prozeß abgestoppt. Man nimmt die low bind tubes aus dem Wasserbad heraus, und gibt direkt danach 300 µl

eiskalten Lysepuffer zu, der die Thrombozyten sofort lysiert und den Phosphorylierungsvorgang des VASP innerhalb der Thrombozyten sofort unterbricht. Die Blutprobe kann jetzt bei 4°C mindestens 24 Stunden ohne Verlust des VASP-Gesamtsignals sowie der Phosphorylierung von VASP gelagert werden. Die Probe kann bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut werden. Danach ist eine Bestimmung des Phospho-VASP Status problemlos möglich.

Lysepuffer (pH 7,4):

20 mM Tris

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1% Triton X-100

0,5% NP-40

10 mM β -Glycerolphosphat

10 mM NaF

pH-Wert auf 7,4 mit 5 M bzw. 1 M NaOH bzw. HCl

2.2.7. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten (washed platelets) mit Iloprost

Iloprost ist ein stabiles Analogon des körpereigenen Prostazyklins. In diesem Versuch wird der Effekt von Iloprost auf den Phosphorylierungsstatus der Thrombozyten ermittelt, indem man 300 μ l frisch entnommenes Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit 3 μ l Iloprost in steigender Konzentration für zwei Minuten lang inkubiert.

- Iloprost 1 nM (Endkonzentration) : 300 μ l Vollblut + 3 μ l Iloprost 0,1 μ M
- Iloprost 2 nM (Endkonzentration) : 300 μ l Vollblut + 3 μ l Iloprost 0,2 μ M
- Iloprost 5 nM (Endkonzentration) : 300 μ l Vollblut + 3 μ l Iloprost 0,5 μ M
- Iloprost 100 nM (Endkonzentration) : 300 μ l Vollblut + 3 μ l Iloprost 10 μ M

- Iloprost 550 nM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl Iloprost 55 µM

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die low bind tubes aus dem Wasserbad herausgenommen und der Lysepuffer zugegeben, Die Proben werden sofort für eine Messung weiter verwendet, oder bei -20°C gelagert.

Der Rest des Vollblutes wird nach der Inkubation mit SNP bzw. Iloprost für zwölf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Platelet Rich Plasma (PRP) wird langsam und sorgfältig abgenommen, und 1 ml des PRP für zwei Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Plasma und die Platelets werden bei -80°C eingefroren.

2.2.8. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten (WP) mit NOC 9 bzw. PGI₂

Zwei silikonisierte Röhren mit 3 ml Volumenkapazität werden vorbereitet. 3 ml Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten werden in jedes Röhren pipettiert, 300 µl werden aus jedem Röhren für die Kontrolle abgenommen, sodass in jedem Röhren nur noch 2,7 ml verbleiben. Ein NOC 9-Primärlösung von 10 mM muss erstmal auf 1 mM verdünnt werden (1:10 Verdünnung). Für PGI₂ Inkubationsversuch verwendet man eine 500 µM Lösung.

- 10 µl vom 10 mM NOC 9-Stock + 90 µl NaOH.

27 µl NOC 9 in Konzentration von 1mM bzw. 54 µl PGI₂ in Konzentration von 500 µM werden in das Röhren, das mit 2,7 ml Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten gefüllt ist, pipettiert. Daraus ergibt sich eine Endkonzentration von 10 µM für SNP und PGI₂. Direkt nach der Gabe von NOC-9 bzw. PGI₂ wird das Röhren in das Wasserbad gestellt, und bei 10-, 30-, 60-, 90-, 120-, 180-, 300 Sekunden werden 300 µl aus dem Röhren abgenommen und durch Zugabe von 300 µl Lysepuffer lysiert. Die Probe wird dann bei -20°C eingefroren.

2.2.9. Inkubation Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten (washed Platelets) mit NaNO₂ bzw. NOC- 9

Bei diesem Versuch wird Vollblut bzw. gewaschene Thrombozyten mit NOC 9 bzw. NaNO₂ bei steigender Konzentration inkubiert. 300 µl Vollblut bzw. gewaschene Blutplättchen werden in neun low bind tubes der Firma Eppendorf pipettiert. Die Röhren werden wie folgend nummeriert:

- 1.) für Kontrollprobe (3 µl H₂O + 300 Vollblut)
- 2.) NOC-9 1 nM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NOC 9 (100 nM)
- 3.) NOC-9 10 nM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NOC 9 (1000 nM)
- 4.) NOC-9 100 nM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NOC 9 (10 µM)
- 5.) NOC-9 1000 nM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NOC 9 (100 µM)
- 6.) NaNO₂ 0,1 µM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NaNO₂ (10 µM)
- 7.) NaNO₂ 1 µM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NaNO₂ (100 µM)
- 8.) NaNO₂ 10 µM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NaNO₂ (100 µM)
- 9.) NaNO₂ 100 µM (Endkonzentration) : 300 µl Vollblut + 3 µl NaNO₂ (1000 µM)

Anschließend stellt man die fertigen Röhren in das Wasserbad (37°C Temperatur). Röhren mit NOC-9 bzw. NaNO₂ werden für zwei Minuten bzw. zehn Minuten im Wasserbad inkubiert, danach werden 300 µl Lysepuffer pipettiert. Die Probe wird dann bei -20°C eingefroren.

2.2.10. Inkubation humaner Endothelzellen mit gewaschenen Thrombozyten

Von der fertigen HUVEC-Platte, die mit Endothelzellen beschichtet ist, wird PBS mithilfe eines Sauggerätes abgesaugt. Zum Waschen werden 2 ml Resuspensionspuffer in die Platte (6er wells) pipettiert, die Platte wird kurz geschwenkt, und anschließend wird der Resuspensionspuffer wieder abgesaugt. Es wird darauf geachtet, dass man die

Material und Methoden

Pipette beim Pipettieren oder Absaugen ganz am Rand der Wells setzt, dadurch wird verhindert, dass die Endothelzellen mit abgesaugt werden oder sich vom Boden der Wells lösen. Damit die Endothelzellen nicht austrocknen, werden direkt danach 1,5 ml Washed Platelets, die in HEPES-Puffer gelöst sind, in die wells pipettiert. Folgende Substanzen werden dazugegeben:

- CaCl (2 mM Endkonzentration)
- MgCl (2 mM Endkonzentration)
- L-Arginin: Eine der Substanzen zur Bildung von NO (25 μ M Endkonzentration)
- L-NAME: Antagonist der NO-Synthase (1 mM Endkonzentration)
- Diclofenac: COX-Inhibitor (100 μ M Endkonzentration)
- AH 6809: DP1 Rezeptorantagonist (200 μ M Endkonzentration)
- CAY 10441: IP1 Rezeptorantagonist (10 μ M Endkonzentration)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO)
- EGTA/EDTA: Chelatbildner

Alle Substanzen werden zusammen mit den gewaschenen Thrombozyten (WP) und den Endothelzellen für 2- und 5 Minuten inkubiert.

Platte A:

- Well 1: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l EGTA/EDTA + 15 μ l L-Arginin
- Well 2: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺ + 15 μ l L-Arginin
- Well 3: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺ + 15 μ l L-Arginin + 15 μ l Diclofenac
- Well 4: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺
- Well 5: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺ + 15 μ l L-Arginin + 15 μ l L-NAME
- Well 6: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺ + 15 μ l L-Arginin + 15 μ l L-NAME + 15 μ l Diclofenac

Platte B:

- Well 1: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l Ca²⁺/Mg²⁺ + 15 μ l L-Arginin
- Well 2: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μ l EGTA/EDTA + 15 μ l L-NAME

Material und Methoden

- Well 3: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 15 μl L-Arginin + 8 μl CAY 10441
- Well 4: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 15 μl L-Arginin + 15 μl DMSO
- Well 5: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 15 μl L-Arginin + 30 μl AH 6809
- Well 6: Endothelzellen + 1,5 ml WP + 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 15 μl L-Arginin + 30 μl AH 6809 + 8 μl CAY 10441

Nach der Inkubation (zwei bzw. fünf Minuten) werden 200 μl Lysepuffer dazugegeben.
Die Probe wird dann bei -20°C eingefroren.

3. Ergebnisse

3.1. Natrium Nitroprusside (SNP)

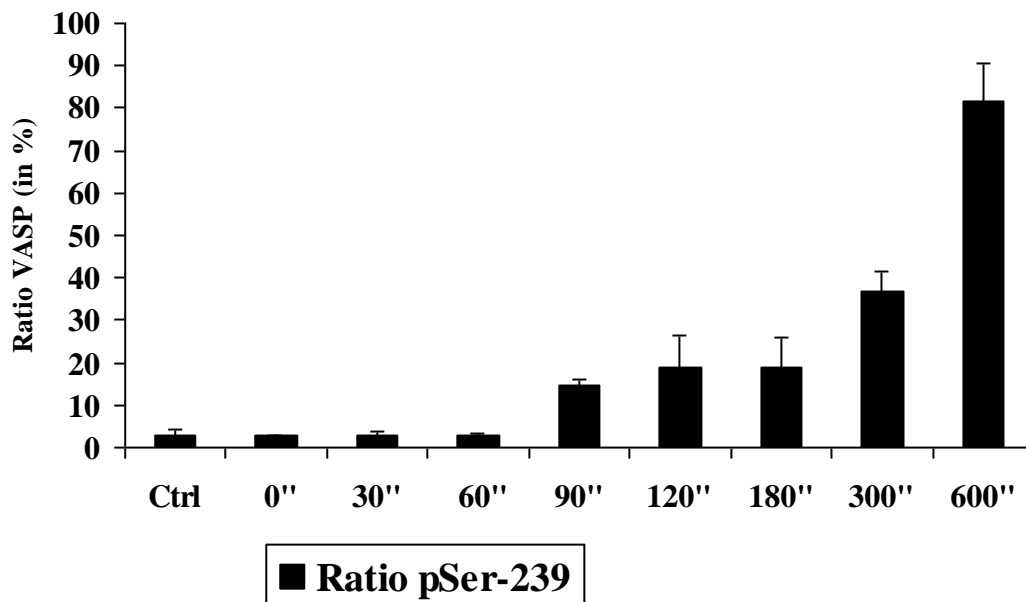
3.1.1. Inkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) mit Natrium Nitroprusside (SNP)

In diesem Versuch werden die gewaschenen Thrombozyten (WP) mit 5 μ M Natrium Nitroprusside (SNP) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Dabei wird der Einfluss von SNP als NO-Donor auf die Thrombozyten ermittelt. Es wird erwartet, dass SNP eine Hemmung der Aktivität der Thrombozyten bewirkt. Eine quantitative Messung dieser hemmenden Wirkung von SNP auf die WP erfolgt durch VASP-POD-Assay. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG1 κ (16C2 bzw 5C6), der spezifisch an phosphoryliertes VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 bindet, kann man den Anteil von phosphoryliertem VASP (pVASP) an der Stelle von Serin 239 bzw. Serin 157 zum Gesamt-VASP vergleichen. Das Verhältnis von Phospho-VASP zum Gesamt-VASP korreliert mit der Hemmung der Thrombozytenaktivität, dadurch werden indirekt die Effekte von SNP innerhalb der Thrombozyten erfasst.

Bei einer Inkubation von WP mit 5 μ M SNP nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 mit ansteigender Inkubationszeit zu. Die Mittelwerte der Ratio pVASP-Ser 239 (Ratio 16C2) zum Gesamt-VASP werden bei einer Inkubationszeit von 0, 30, 60, 90, 120, 180, 300, 600 Sekunden miteinander verglichen. Die Messung der optischen Dichte durch VASP-POD-Assay ergibt von 0 Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) bis 60 Sekunden-Inkubation fast die gleiche Ratio (außer eines ganz geringen Anstiegs gegenüber der Kontrolle bei 0 Sekunden). Bei der Kontrolle (gewaschene Thrombozyten ohne Inkubation mit SNP) wird eine Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 von 2,8 % gemessen, diese Ratio steigt gering auf 3,0 % bei einer Inkubationszeit von null Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) an, nimmt aber danach leicht (bei 30 Sekunden-

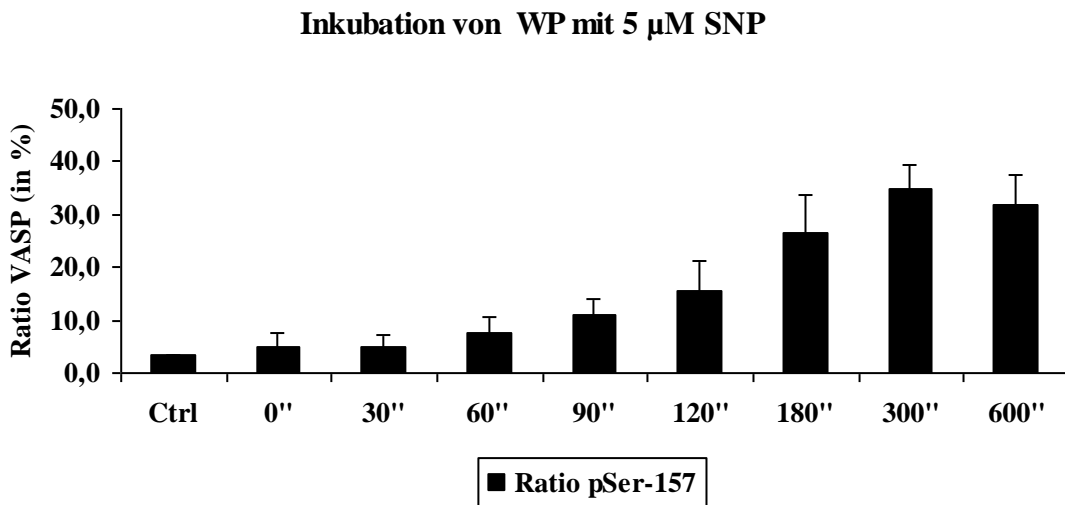
Inkubation) ab, und geht wieder auf die Ausgangsratio (2,8 %) zurück. Sie bleibt die ersten 60 Sekunden konstant, bis sie einen signifikanten Anstieg (bei 90 Sekunden) um 11,6 % auf 14,4 % aufweist. Für die nächsten 90 Sekunden (bis 180 Sekunden) zeigt die Ratio Phospho-Ser 239 geringfügige Schwankungen, von 18,7 % bei 120 Sekunden auf 18,8 % bei 180 Sekunden. Auffällig ist die Ratio bei 300 Sekunden, dabei verdoppelt sich die Ratio von VASP-Serin 239 auf 36,8 %. Besonders auffallend ist der Anstieg der Phosphorylierungsrate bei 600 Sekunden, die während der gesamten Inkubationszeit am größten ist. Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 zeigt mehr als eine Verdoppelung der Ratio im Vergleich zu der von 300 Sekunden, von 36,8 % auf 81,4 % (bei 600 Sekunden).

Inkubation von WP mit 5 μ M SNP



Grafik 3.1: Das Balkendiagramm veranschaulicht den Verlauf der VASP-Phosphorylierung innerhalb von Thrombozyten unter Wirkung von 5 μ M SNP. Mit ansteigender Inkubationszeit nimmt die Ratio von P-VASP zum Gesamt-VASP zu. Die Ratio von pSer-239 während der ersten 60 Sekunden bleibt fast gleich gegenüber der Kontrolle, steigt erst bei 90 Sekunden mit leichten Schwankungen weiter an, bis ein erheblicher Anstieg bei 600 Sekunden beobachtet wird. Zum Nachweis wird *16C2*, ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG1 κ verwendet, der spezifisch an phosphoryliertes Serin 239 bindet. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von vier Versuchen. Die Inkubationszeit wird in Sekunden angegeben.

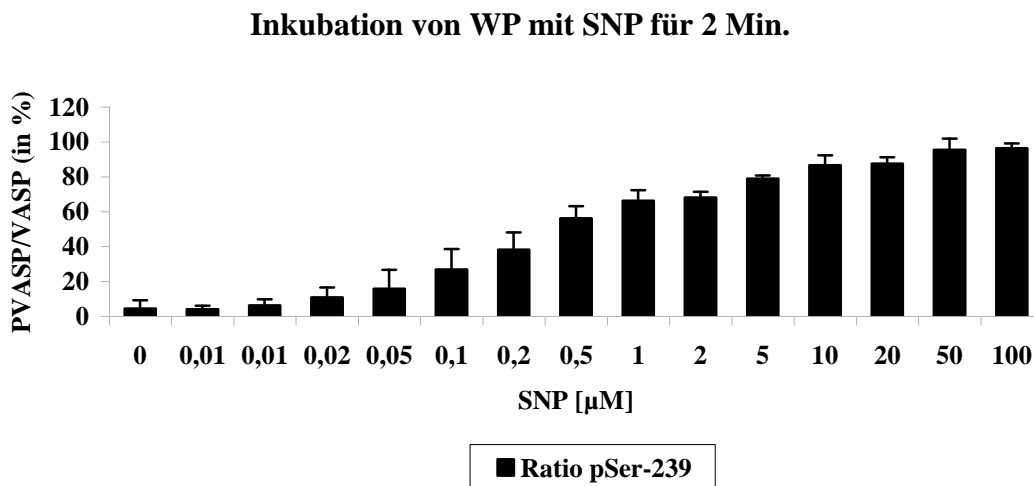
In diesem Versuch wird nicht nur *16C2* als Antikörper verwendet, sondern auch *5C6*, der spezifisch an phosphoryliertes VASP-Serin 157 bindet. Durch Markierung an zwei Stellen (Phospho-VASP-Serin 239 und Phospho-VASP-Serin 157) kann man die Phosphorylierung des VASP gut erfassen. Die beiden Phosphorylierungsstellen unterscheiden sich darin, dass der Serinrest Ser-157 bevorzugt von der PKA phosphoryliert wird, wohingegen Serin 239 das bevorzugte Substrat der PKG ist.



Grafik 3.2: In der vorliegenden Grafik wird veranschaulicht, dass die Phosphorylierung von VASP am Serin 157 den gleichen Verlauf wie bei VASP-Serin 239 (Grafik 1) zeigt. Die Ratio steigt langsam an, bis der Höhepunkt bei 300 Sekunden erreicht wird. Im Gegensatz zum VASP-Serin 239, bei welchem ein bemerkenswerter Anstieg bei 600 Sekunden festzustellen ist, nimmt bei VASP-Serin 157 die Phosphorylierungsrate bei 600 Sekunden etwas ab. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stellen Messwerte von vier Versuchen dar. Die Inkubationszeit wird in Sekunden angegeben.

Verglichen mit Grafik 3.1 zeigt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 mit ansteigender Inkubationszeit (Grafik 3.2) fast den gleichen Verlauf. Im gesamten Verlauf steigt die Ratio langsam und kontinuierlich an, nimmt aber bei 600 Sekunden etwas ab. Es lässt sich insgesamt feststellen, dass die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 im Vergleich zu Serin 239 (Grafik 3.1) weniger auffallend verläuft. Beginnend mit einem leichten Anstieg von 3,3 % (bei Kontrolle) auf 5,0 % (bei 0 Sekunden; die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden), bleibt danach die Ratio für die

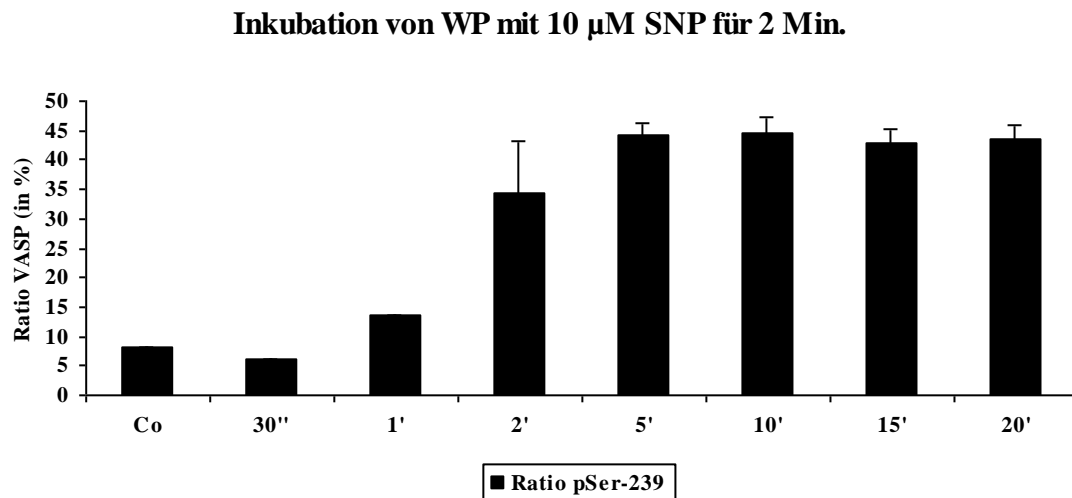
ersten 30 Sekunden-Inkubation konstant, nämlich bei 5,0 %. Ab 60 Sekunden beginnt die Ratio, langsam zuzunehmen und zeigt einen weiteren kontinuierlichen Anstieg, auf 7,6 % bei 60 Sekunden, 11,1 % bei 90 Sekunden, 15,4 % bei 120 Sekunden, 26,6 % bei 180 Sekunden, und erreicht den höchsten Punkt (34,9 %) bei 300 Sekunden-Inkubation. Es ist überraschend, dass die Ratio bei 600 Sekunden verglichen mit der bei 300 Sekunden gering sinkt, während die Ratio von Phospho-Serin 239 zum Gesamt-VASP in der Grafik 3.1 den höchsten Wert bei 600 Sekunden erreicht. Von 34,9 % bei 300 Sekunden verringert sich die Ratio um 3,1 % auf 31,8 % bei 600 Sekunden.



Grafik 3.3: Das Balkendiagramm veranschaulicht das Verhältnis der Phosphorylierungsrate (Quotient von pVASP und VASP) und der jeweils zugegebenen Konzentration an SNP in μM . Mit ansteigender Inkubationszeit steigt die Ratio von pVASP zu VASP an. Die Ratio von pSer-239 während der Zugabe von Konzentrationen bis ca. $0,02 \mu\text{M}$ SNP bleibt fast gleich, ein minimaler Anstieg ist bereits erkennbar. Bei weiterer stetiger Erhöhung der Konzentration ist eine starke Zunahme der Phosphorylierung erkennbar. Diese scheint jedoch nach experimentellen Messungen leicht treppenförmig anzusteigen, und ihr absolutes Maximum nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ SNP zu zeigen. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von fünf Versuchen. Die Konzentration wird in μM angegeben.

In diesem Versuch (Grafik 3.3) schauen wir uns den Kurvenverlauf exakt an. Hierzu dient die Ordinate des Kurvendiagramms der Quantität der Ratio der Phosphorylierungsrate von pSer-239. Ebenfalls werden die jeweils hinzugegebenen

Konzentrationen von SNP an die Abszisse angetragen. Somit kann aus den Grafikbalken exakt die jeweilige Ratio zu ihrer zugehörigen Konzentration des SNP bestimmt werden. Der erste Messbalken dient als Referenz. Im Versuch sieht man, dass nach einer Zugabe von 5 nM die Ratio mit der Kontrolle nahezu völlig übereinstimmt. Erhöht man die Konzentration des SNP auf das Doppelte (10 nM), so erkennt man einen Zuwachs der Phosphorylierungsrate um 50 % zur Kontrolle. Wird die Konzentration erneut erhöht, so steigt die Ratio auf 10,8 %. Der Zuwachs der Ratio gegenüber der vorherigen Konzentration liegt unter 50 %. Nun werden jeweils Konzentrationen von 0,05 μM – 50 μM zum Einsatz gebracht. Aus der Grafik 3.3 ist ein deutlich konstanter Anstieg der Ratio zu erkennen. Bei weiterer Zugabe bis zu 2 μM ist lediglich ein schwach wachsender Verlauf der Ratio zu erkennen, ab ca. 5 -10 μM SNP Zugabe jedoch gibt es einen stärkeren Anstieg der Ratio. Nun wird die Konzentration insgesamt bis 100 μM erhöht. Bis 20 μM verweilt die Phosphorylierungsrate plateauartig, um bei 30 μM erneut etwas zu steigen. Anschließend, bei einer Konzentration von 50 - 100 μM SNP, nivelliert die Phosphorylierungsrate auf nahezu gleichem Maximalwert in dieser Messung, welcher bei 96,4 % liegt. Bei der Versuchsreihe fällt auf, dass die Ratio zwar mit zunehmender Konzentrationszugabe von SNP stets zunimmt. Die Steigung jedoch erfolgt nicht ganz konstant, sondern leicht treppenartig. Wie bereits eben erwähnt, hat die Phosphorylierungsrate von pSer-239 nach Zugabe von 100 μM SNP ihr Maximum. In diesem Versuch wurde der Höchstwert der Ratio von 96,4 % nicht überschritten.



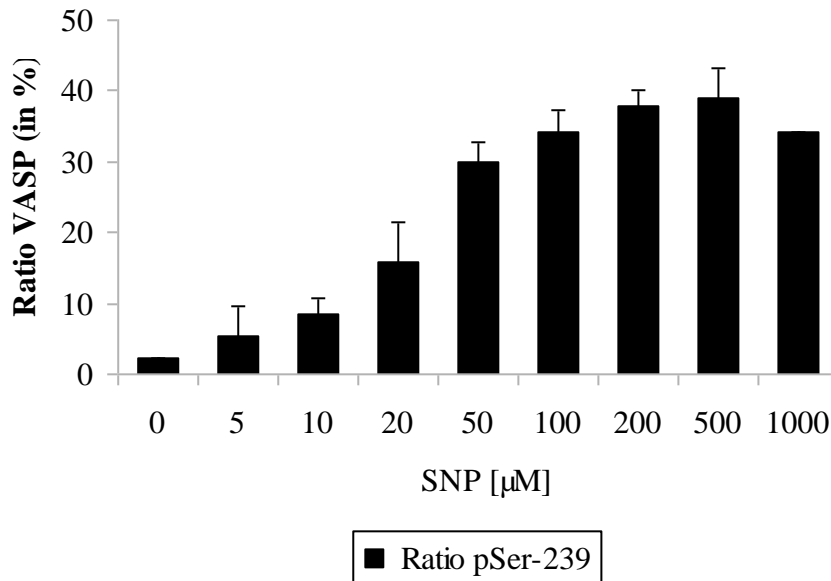
Grafik 3.4: Die Ratio von Phospho-Serin 239 zum Gesamt-VASP nimmt unter Wirkung von 10 μ M SNP mit ansteigender Inkubationszeit zu. Es ist auffällig, dass VASP-Serin 239 die höchste Phosphorylierungsrate bei zehn Minuten zeigt. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stellen Messwerte aus vier Versuchen dar. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

Nun ermittelt man, wie sich VASP-Phosphorylierung von Serin 239 unter Wirkung von 10 μ M NOC-9 mit ansteigender Inkubationszeit verhält (Grafik 3.4).

Während der ersten 30 Sekunden sieht man in der Grafik 3.4 statt einer Erhöhung der Ratio von pSer-239 eine leichte Senkung der Phosphorylierungsrate von pSer-239. Erst nach Inkubation von einer Minute zeigt der Messbalken eine leichte Zunahme der Ratio von pSer-239 (13,7 %). Die Phosphorylierungsrate von VASP an Serin 239 steigt kontinuierlich bis zu einer Inkubationszeit von zehn Minuten an. Der Höhepunkt der Ratio wird bei zehn Minuten (44,5 %) erreicht. Danach zeigt die Ratio von pSer-239 ein Plateau mit leichtem Absinken der Phosphorylierungsrate bis zum Ende der Inkubation bei 20 Minuten.

3.1.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit Natrium Nitroprusside (SNP)

Inkubation von VB mit SNP für 2 Min.



Grafik 3.5: Dieses Säulendiagramm zeigt den Phosphorylierungsverlauf von PVASP zu VASP in Abhängigkeit der jeweils zugegebenen Konzentrationen des SNP. Gleich zu Beginn ist ein Anstieg der Ratio zu erkennen, der relativ steile und konkave Kurvenverlauf der Ratio findet bei 500 μM SNP Zugabe sein Maximum. Bei Zugabe von ca. 200 μM SNP ändert sich der Kurvenverlauf von konkav zu konvex. Es ist deutlich erkennbar, dass die Ratio bis zur Zugabe von 500 μM SNP stets zunimmt, und danach trotz weiterer Erhöhung wieder unter ihr Maximum fällt. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von fünf Versuchen. Die Konzentration wird in μM angegeben.

In einem weiteren Versuch (Grafik 3.5) betrachten wir nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SNP den Phosphorylierungsquotient von pVASP zur Gesamt-VASP, welcher die Phosphorylierungsrate darstellt. Letztere wird an der Ordinate angetragen, die Konzentration des SNP an der Abszisse.

Der erste Balken dient wieder als Referenz. Bereits nach geringer Zugabe von SNP (5 μM) kann ein Anstieg der Ratio nicht übersehen werden. Sie ist bereits mehr als doppelt so hoch wie die der Referenz. Nun werden in jeweils gleichen Zeiträumen

immer höhere Konzentrationen an SNP zugegeben. Bei langsamer Zugabe bis zu 50 μM steigt die Ratio steil an, bei weitere Erhöhung bis 500 μM SNP nur noch gering. Wird die Konzentration weiter erhöht, ist sogar ein Abfall der Ratio vom Maximum (bei einer Konzentration von 500 μM SNP) um 4,7 % zu verzeichnen. Der Höchstwert bei 500 μM SNP liegt bei 43,2 %, der bei der höchsten im Versuch verwendeten Konzentration von 1 mM lediglich bei 38,9 %.

3.2. 1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-6-aminohexyl)-3-methyl-1-triazene (NOC-9)

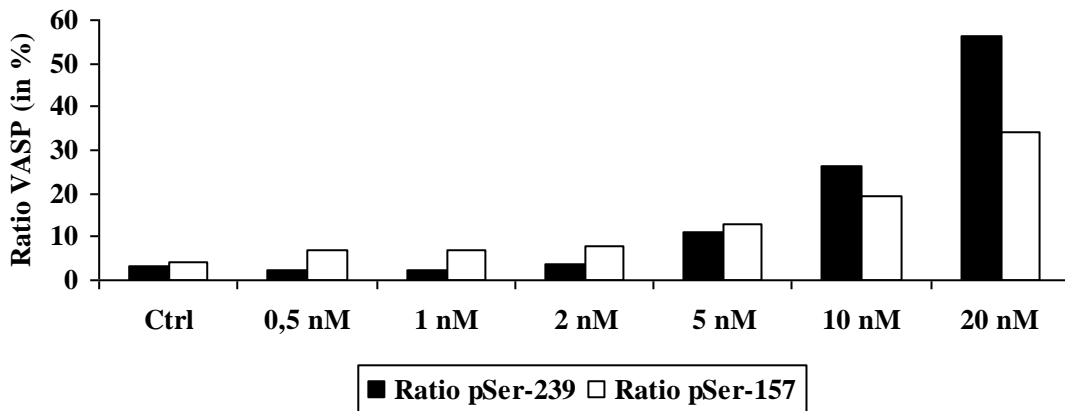
3.2.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit NOC-9

NOC-9 (1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-6-aminohexyl)-3-methyl-1-triazene) ist als einer der NO-Donoren bekannt. In diesem Versuch wird ermittelt, wie die gewaschenen Thrombozyten (WP) unter Einwirkung von NOC-9 nach zwei Minuten- Inkubation intrazellulär reagieren. Dabei wird die intrazelluläre VASP-Phosphorylierung am Serin 239 und Serin 157 nach Inkubation mit 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM NOC-9 analysiert.

In der untenstehenden Grafik 3.6 wird der Verlauf von Serin-239-, und Serin-157-Phosphorylierung von VASP nach Inkubation mit NOC-9 in verschiedenen Konzentrationen verglichen. Es lässt sich feststellen, dass die VASP-Phosphorylierung sowohl von Serin 239 als auch von Serin 157 unter Wirkung von NOC-9 mit ansteigender Konzentration einen ähnlichen Verlauf zeigt. Eine Erhöhung von NOC-9-Konzentration auf 2 nM zeigt keinen nennenswerten Anstieg der VASP-Phosphorylierung und führt zu keiner auffälligen Veränderung der Phosphorylierung von beiden Serinresten. Trotzdem ist es auch nicht zu übersehen, dass die ersten beiden

Konzentrationen (mit 0,5 nM und 1 nM NOC-9) bei VASP-Serin 239 zu einer leichten Abnahme der Phosphorylierungsrate im Vergleich zur Kontrolle führen. Während die Kontrolle eine Ratio von 3,4 % zeigt, nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Ser-239 um 1,1 % auf 2,5 % ab, wobei sich die NOC-9-Konzentration auf 1 nM erhöht. Im Gegensatz dazu führt bei VASP-Ser-157 eine Erhöhung der Konzentration auf 0,5 nM bereits zu einem leichten Anstieg der Phosphorylierungsrate, von 4,3 % bei der Kontrolle auf 7,0 % bei 0,5 nM. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 1 nM bewirkt statt einer weiteren Zunahme der Ser-157-Phosphorylierung von VASP, eine leichte Abnahme der Ratio auf 6,9 %. Erst bei einer Konzentration von 2 nM nimmt die Phosphorylierungsrate der beiden Serinresten (3,7 % bei VASP-Ser-239 und 8,0 % bei VASP-Ser-157) zu. Ein nennenswerter Anstieg der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 lässt sich bei Konzentration von 5 nM messen, die Rate nimmt um 7,3 % auf 11,0 % zu. Besonders auffallend ist die Phospho-Ser-239-Rate bei NOC-9-Konzentration von 10 nM und 20 nM. Bei 10 nM verdoppelt sich die Rate im Vergleich zu der von 5 nM (von 11,0 % auf 26,2 %), und verdreifacht sich beinahe bei weiterer Konzentrationerhöhung um 10 nM (auf 56,2 % bei 20 nM). Eine Ähnlichkeit im Verlauf zeigt auch die Ser-157-Phosphorylierung von VASP. Ab einer Konzentration von 5 nM bis 20 nM lässt sich ein langsamer, aber kontinuierlicher Anstieg feststellen. 12,9 % bei 5 nM, 19,6 % bei 10 nM, und eine starke Zunahme der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 auf 33,9 % bei 20 nM.

Inkubation von WP mit NOC-9 für 2 Min.



Grafik 3.6: VASP-Phosphorylierung von Serin 239 (16C2) und Serin 157 (5C6) im Vergleich. Analysiert wird die Phosphorylierungsrate von beiden Serinresten nach zwei Minuten Inkubation in verschiedenen NOC-9-Konzentrationen. Die dunklen Balken zeigen die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 und die hellen die von Serin 157. Bis zu einer Konzentration von 2 nM zeigen beide Serinreste keine nennenswerte Veränderung, steigen jedoch kontinuierlich ab einer Konzentration von 5 nM bis 20 nM. Während VASP-Serin 239 einen sprunghaften Anstieg zeigt, lässt sich bei VASP-Serin 157 nur einen langsamen Anstieg messen.

Wie die Grafik 3.6 zeigt, dass die Phosphorylierungsrate von Thrombozyten-VASP den Höhepunkt bei 20 nM NOC-9 erreicht, wird bei dem nächsten Versuch ermittelt, wie sich die VASP-Phosphorylierung innerhalb von Thrombozyten in ansteigender Inkubationszeit unter Wirkung von 20 nM NOC-9 verhält. Die gewaschenen Thrombozyten (WP) werden mit 20 nM NOC-9 inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt.

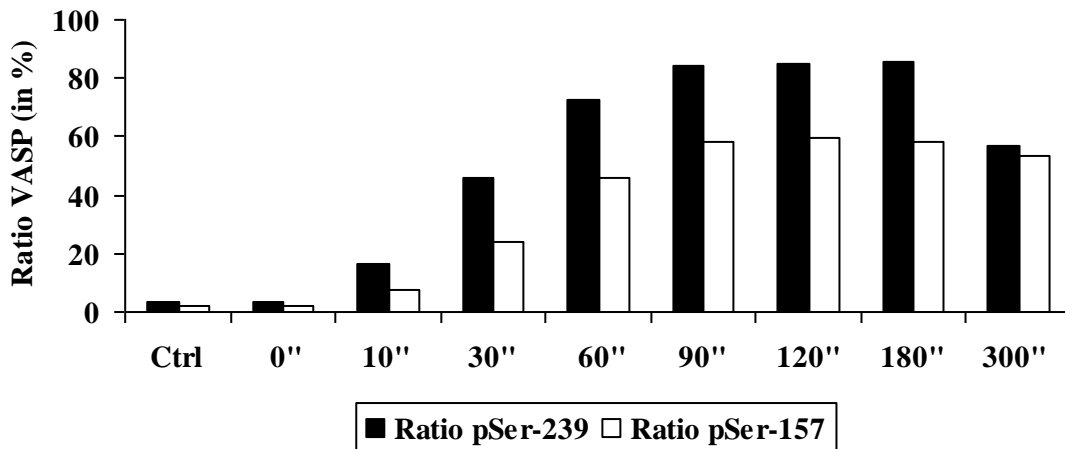
Bei einer Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit 20 nM NOC-9 (Grafik 3.7) erzielt die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 bereits nach einer Inkubationszeit von zehn Sekunden einen Anstieg gegenüber der Kontrolle, von 3,3 % bei der Kontrolle auf 16,6 % bei zehn Sekunden. Bei weiterer Erhöhung der Inkubationszeit auf 30 Sekunden lässt sich eine rapide Steigerung der Ratio auf 46,1 % feststellen. Besonders auffallend ist auch die Zunahme der Ratio bei 60 Sekunden, die Ratio steigt um 26,7 % auf 72,8 %. Weitere kleine Zunahmen der VASP-

Phosphorylierungsrate von Serin 239 werden auch bei einer Inkubationszeit von 90 bis 180 Sekunden gezeigt, wobei VASP-Serin 239 bei 180 Sekunden am stärksten phosphoryliert wird. Nach weiteren 120 Sekunden Inkubation fällt die Ratio, von 85,9 % bei 180 Sekunden auf 56,9 % bei 300 Sekunden steil ab.

Die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 157 (Grafik 3.7) ändert sich ebenfalls konzentrationsabhängig und verläuft ähnlich wie VASP-Serin 239. Der erste nennenswerte Anstieg gegenüber der Kontrolle wird bereits bei einer Inkubationszeit von zehn Sekunden gemessen, die Ratio steigt bei der Kontrolle von 2,4 % um das Dreifache auf 7,2 %. Besonders auffällige Zunahmen der Ratio werden zwischen 30- und 90 Sekunden-Inkubationszeit festgestellt. Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 steigt während dieser Inkubationszeit von 7,2 % bei zehn Sekunden auf 23,9 % bei 30 Sekunden, 45,6 % bei 60 Sekunden und 58,2 % bei 90 Sekunden steil an. Danach (bis 180 Sekunden-Inkubationszeit) bleibt die Ratio fast konstant, nur kleine Schwankungen lassen sich messen. Ein auffälliger Abfall der Ratio zeigt sich bei 300 Sekunden.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass eine Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit 20 nM NOC-9 ab einer Inkubationszeit von 10- bis 90 Sekunden zu einer rapiden und steilen Zunahme der Ratio führt. Der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157 wird aber erst nach 120 Sekunden-Inkubation mit 20 nM NOC-9 erreicht. Das bedeutet wiederum, dass die Thrombozytenaktivität zu diesem Zeitpunkt am stärksten gehemmt wird.

Inkubation von WP mit 20 nM NOC-9



Grafik 3.7: Die Ratio von phosphoryliertem VASP-Serin 239 (Ratio pSer-239) und phosphoryliertem Serin- 5C6 (Ratio pSer-157) im Vergleich. Analysiert werden die VASP-Phosphorylierung von Serin 239 (Ratio 16C2) und Serin 157 (Ratio 5C6) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit 20 nM NOC-9. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

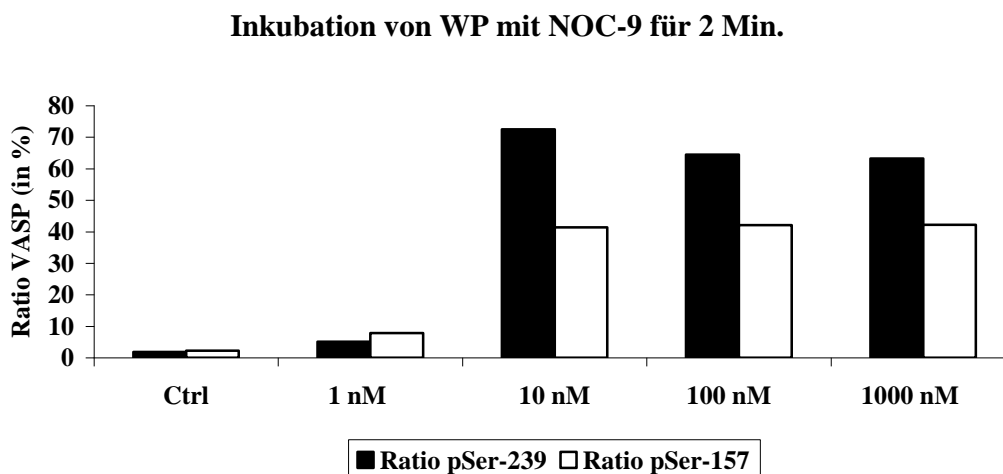
Bei einem anderen Versuch wird ermittelt, wie sich VASP-Phosphorylierung von Serin 239 und Serin 157 bei weiterer Konzentrationserhöhung von NOC-9 verhält.

Einen Anstieg der VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 (Grafik 3.8) erkennt man bereits bei der Inkubation von Washed Platelets in 1 nM NOC-9. Im Vergleich zur Kontrolle (1,8%) ist ein Anstieg um 3,23 % bei 1 nM NOC-9 kaum zu übersehen. Eine Erhöhung der NOC-9 Konzentration auf das Zehnfache bewirkt sogar einen extrem auffälligen Effekt, die VASP-Serin 239-Phosphorylierungsrate vervielfacht sich auf 72,5 %. Statt einer weiteren Zunahme der Ratio bringt eine weitere Erhöhung der NOC-9 Konzentration auf das Zehnfache eine geringe Abnahme der VASP-Phosphorylierung von Serin 239. Dabei verringert sich die Ratio um 8,1 % auf 64,4 % und bleibt trotz einer Erhöhung der Konzentration auf 1000 nM (63,2 %) konstant.

Die Aktivität von cAMP lässt sich auch durch Messung der VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 157 (Ratio 5C6) indirekt ermitteln. Insgesamt stellt man fest, dass die Phosphorylierung von VASP-Serin 157 unter Wirkung von NOC-9 bei verschiedenen Konzentrationen ähnlich wie bei VASP-Serin 239 verläuft.

Beginnend mit einer Inkubation in 1 nM NOC-9 steigt die Ratio von Phospho-Serin 157 zum Gesamt-VASP im Vergleich zur Kontrolle von 2,3 % auf 7,8 %. Eine auffällige Zunahme der Ratio wird mit Erhöhung der Konzentration auf 10 nM festgestellt. Verglichen mit Phospho-Serin 239 ist der Anstieg zwar kleiner, aber eine äußerst große Zunahme der Ratio um 33,6 % auf 41,4 % ist nicht zu übersehen. Eine weitere Erhöhung der Konzentration (100 nM und 1000 nM) führt fast zu keiner Veränderung im Verlauf der Phosphorylierung. Die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 157 bleibt bei 42,2 % fast konstant.

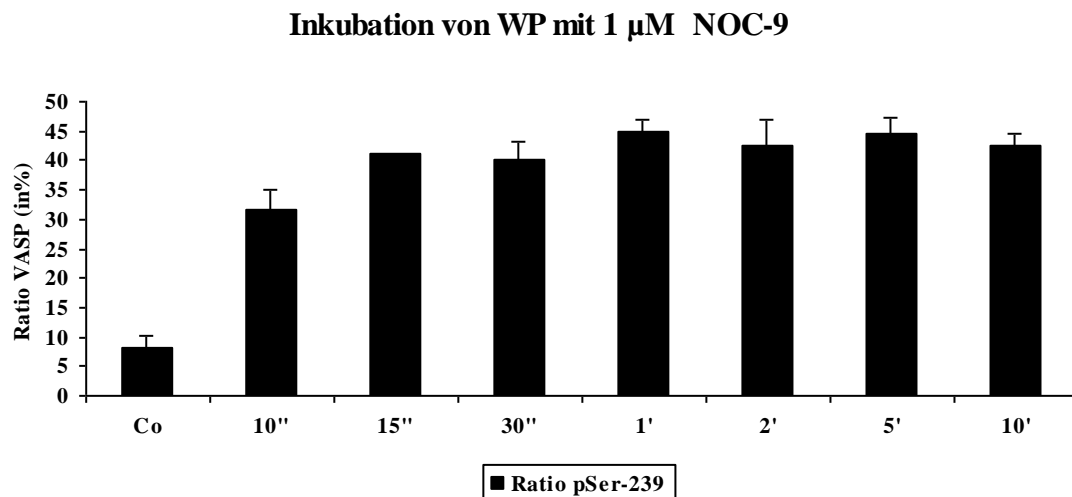
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die VASP-Phosphorylierungsrate konzentrationsabhängig ist. Nach zwei Minuten Inkubation erweist sich 10 nM NOC-9 als die effektivste Konzentration, um die Thrombozytenaktivität zu hemmen.



Grafik 3.8: Vergleich der VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 und Serin 157 innerhalb von Thrombozyten. Dabei werden gewaschene Thrombozyten mit NOC-9 in verschiedenen Konzentrationen für zwei Minuten inkubiert. Die Steigerung der Rate erreicht den Höhepunkt bei 10 nM NOC-9.

Nun wird NOC-9 zu den gewaschenen Thrombozyten hinzugegeben, und die Phosphorylierung von Serin 239 betrachtet (Grafik 3.9). Die Kontrolle liegt bei 8,1 %. Die Zugabemenge von NOC-9 ist bei allen Versuchen 1 μ M, lediglich die Inkubationszeit variiert. Bereits nach zehn Sekunden steigt die Ratio im Vergleich zur Kontrolle auf beinahe das Vierfache, nämlich auf 31,6 %. Nach 15 Sekunden liegt die

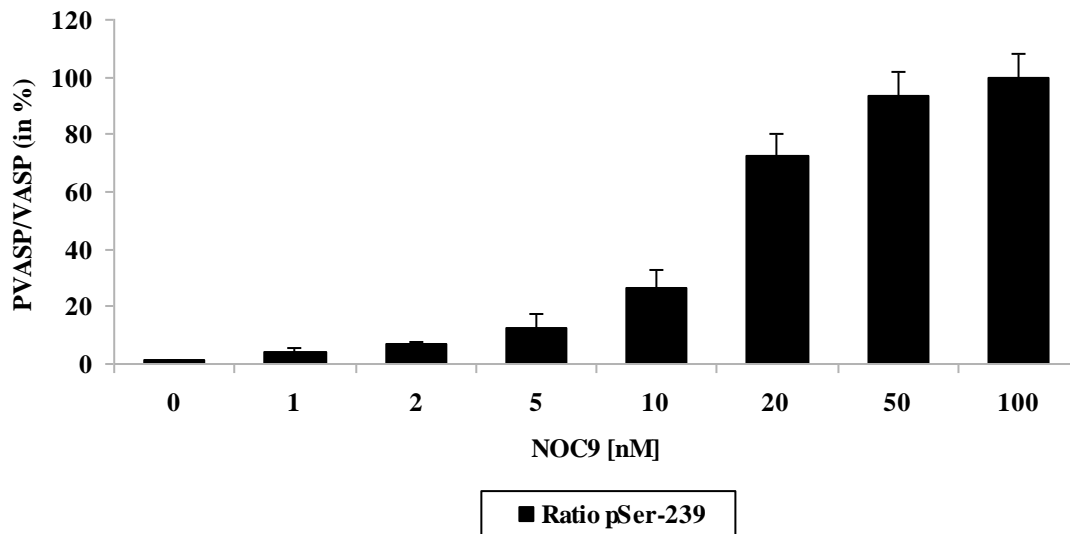
Ratio bei 41,2 %. Anschließend ist im zeitlichen Verlauf folgendes zu erkennen: Die Ratio bleibt bis zum Ende der Versuchsreihe ungefähr konstant. Ihr Maximum hat sie nach einer Minute. Es beträgt 44,8 %.



Grafik 3.9: Betrachtung der Ratio bei Zugabe konstanter Konzentration von NOC-9 in gewaschenen Thrombozyten (WP). Sofortiger Anstieg der Ratio erkennbar, zum Ende der Messreihe hin wird er leicht treppenförmig. An der Abszisse ist die Inkubationszeit angetragen, an der Ordinate die Ratio in Prozent. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils gemessen in fünf Experimenten.

Jetzt geben wir erneut NOC-9 hinzu, jedoch in verschiedenen Konzentrationen. Wir betrachten die Phosphorylierungsratio von Serin 239 (Grafik 3.10). Der komplette Anstieg der Ratio hat einen eindeutigen exponentiellen Charakter. Es seien einige Werte genannt: Die Ratio beträgt bei 1 nM 4,2 %, bei 5 nM 12,4 %. Im letzten Versuch mit 100 nM liegt die gemessene Ratio am höchsten, nämlich bei 99,6 %.

Inkubation von WP mit NOC-9 für 2 Min.

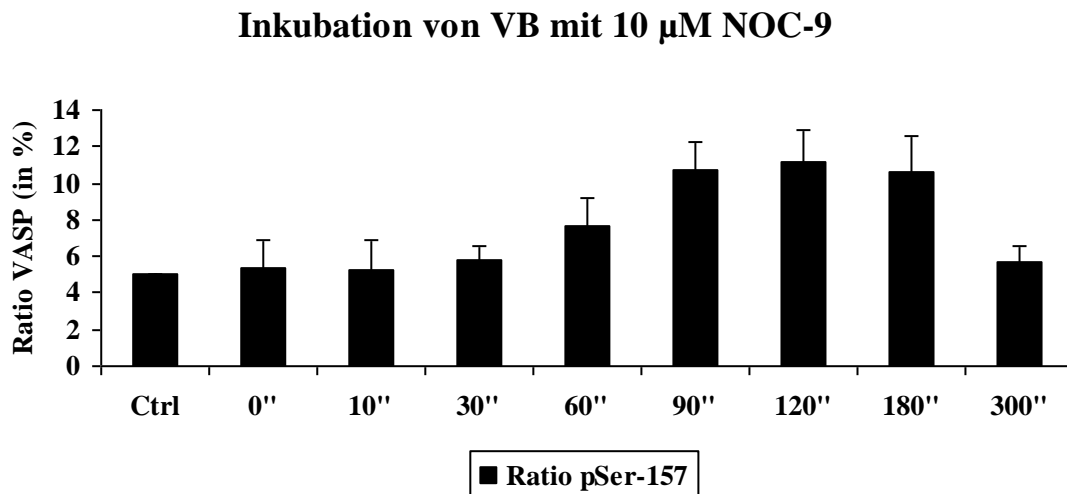


Grafik 3.10: Inkubation mit verschiedenen NOC-9 Konzentrationen unter Betrachtung der Phosphorylierungsrate von Serin 239 in gewaschenen Thrombozyten. Wie aus der Kurve und den Werten ersichtlich, exponentieller Anstieg mit plateauartigem Ende der Kurve. Einheit der Abszisse: NOC-9 Konzentration in nM, Einheit der Ordinate: Phosphorylierungsrate von Serin 239 in Prozent. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung, jeweils gemessen in fünf Experimenten.

3.2.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit NOC-9

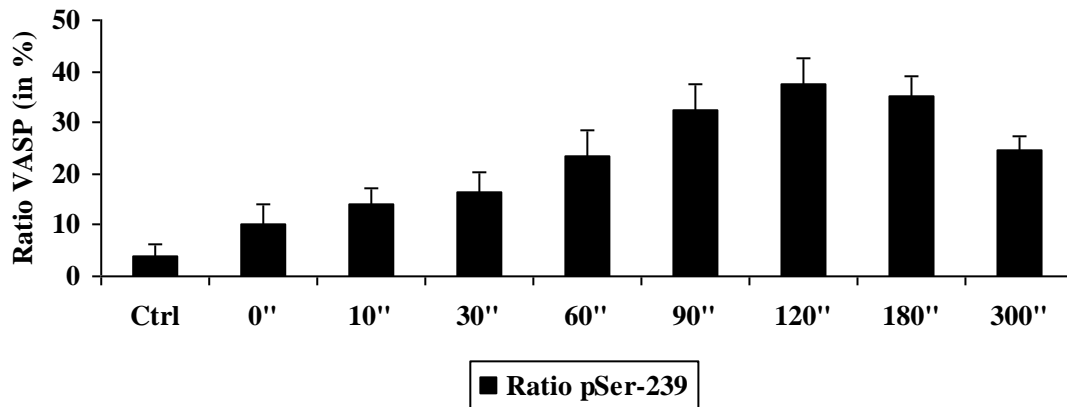
Mit Zitratlösung stabilisiertes Vollblut wird mit 10 μ M NOC-9 inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. In der ersten Inkubationszeit von 30 Sekunden zeigt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 kaum einen nennenswerten Anstieg gegenüber der Kontrolle (Grafik 3.11). Inkubiert man nun das Vollblut mit 10 μ M NOC-9 60 Sekunden lang, steigt die Ratio -von 5,8 % bei 30 Sekunden- auf 7,7 % bis 60 Sekunden an. Eine große Zunahme der Phosphorylierungsrate lässt sich auch bei 90 Sekunden feststellen, wobei die Ratio um 3 % auf 10,7 % ansteigt. Eine weitere

Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 Sekunden führt zu kleinen Schwankungen der Phosphorylierungsrate. Der Höhepunkt der Phosphorylierung von VASP-Serin 157 wird zwar bei 120 Sekunden (11,1 %) erreicht, nimmt aber wieder um 0,5 % auf 10,6 % bei 180 Sekunden ab. Besonders auffallend ist der Zeitpunkt der Inkubation bei 300 Sekunden. Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 verringert sich um die Hälfte im Vergleich zu letzterer bei 180 Sekunden, d.h. 5,6 % bei 300 Sekunden zeigt den Rückgang der VASP-Phosphorylierung von Serin 157 auf beinahe den Ausgangswert (bei 0 Sekunden – die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) an.



Grafik 3.11: Man stellt während der ersten 30 Sekunden einen fast konstanten Verlauf der Phosphorylierung von VASP-Serin 157 fest. Die erste Steigerung der Ratio wird erst nach einer Inkubationszeit von 60 Sekunden erreicht und die Steigerung weiter, bis die höchste Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 bei 120 Sekunden erreicht wird. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dar, die aus vier Experimenten ermittelt werden. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

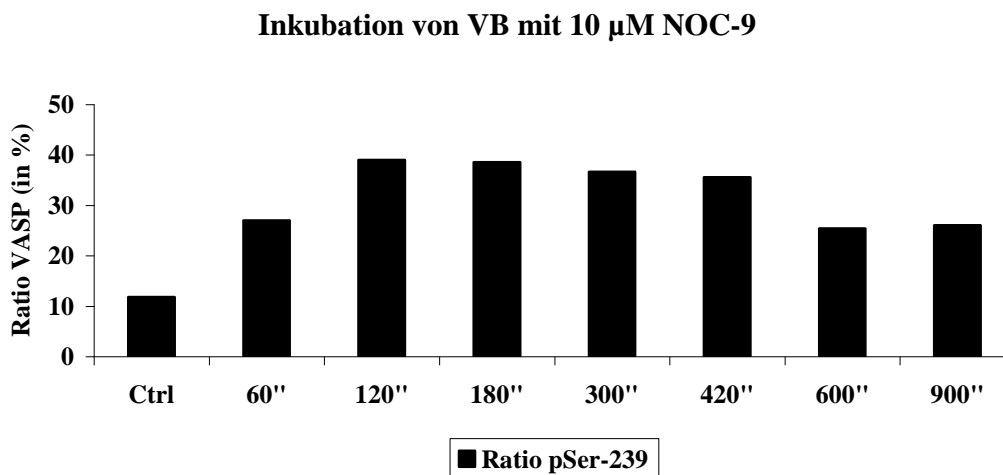
Inkubation von VB mit 10 μ M NOC-9



Grafik 3.12: Ein Anstieg der VASP-Phosphorylierung anstelle von Serin 239 wird fast unmittelbar nach Inkubation von Vollblut mit 10 μ M NOC-9 gezeigt. Während man während der ersten 30 Sekunden- Inkubationszeit nur einen langsamen Anstieg feststellt, nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 ab einer Inkubationszeit von 60 Sekunden steil zu und geht über einen Zeitraum von 180- bis 300 Sekunden wieder zurück. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von fünf Versuchen. Die Inkubationszeit wird in Sekunden angegeben.

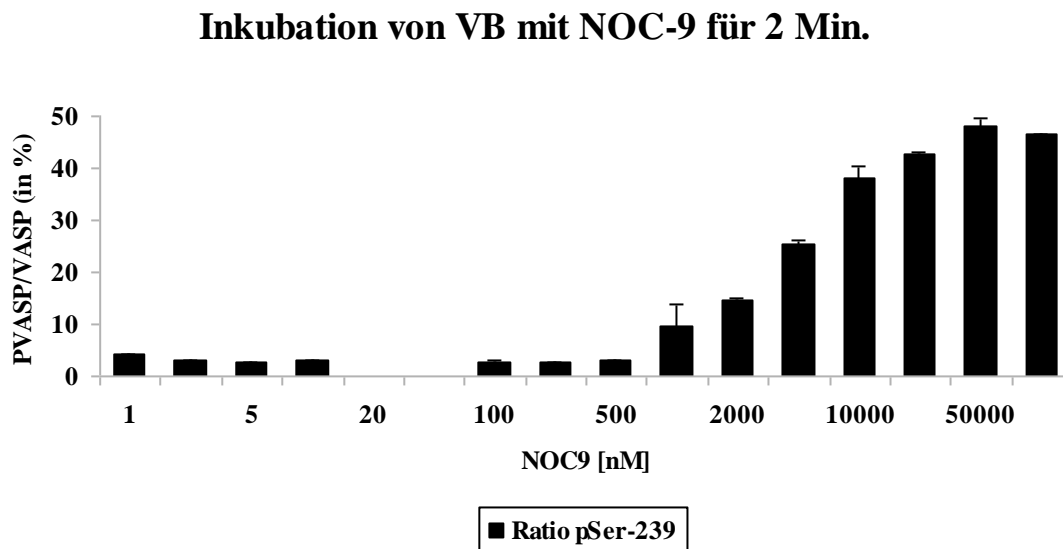
Ein ähnlicher Verlauf zeigt auch die VASP-Phosphorylierung von Serin 239 (Grafik 3.12). Im Vergleich zur Phosphorylierung von VASP-Serin 157 (Grafik 3.11) zeigt die Ratio bereits bei 0 Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) einen erkennbaren Anstieg gegenüber der Kontrolle. Beginnend mit 10,3 % bei 0 Sekunden vergrößert sich der Anteil an phosphoryliertem VASP-Serin 239 langsam bis zur Inkubationszeit von 30 Sekunden. Ein steiler Anstieg lässt sich ab einer Inkubationszeit von 60 Sekunden messen, die Ratio nimmt um 7,1 % ausgehend von 16,4 % bei 30 Sekunden auf 23,5 % bei 60 Sekunden, auf 32,5 % bei 90 Sekunden zu. Der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 wird bei 120 Sekunden (37,5 %) erreicht. Ab einer Inkubationszeit von 180 Sekunden beginnt die Phosphorylierungsrate abzunehmen. Bei 180 Sekunden liegt die Ratio bei 35,2 %. In den folgenden 120 Sekunden (bis 300 Sekunden) verringert sich letztere auf 24,8 %.

Analysiert man nun die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 mit Erhöhung der Inkubationszeit bis auf 900 Sekunden (Grafik 3.13), steigt die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 nur während der ersten 120 Sekunden an, danach flacht die Ratio wieder ab. In diesem Versuch ist äußerst auffällig, dass bereits bei der Kontrolle eine hohe VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 gezeigt wird. Nach einer Minute Inkubation steigt die Ratio von Phospho-Serin 239 zum Gesamt-VASP auf 27 % und erreicht den Höhepunkt bei 120 Sekunden (39,0 %). Diese hohe Phosphorylierungsrate von Serin 239 hält aber nicht lange an, weil nach weiteren 60 Sekunden Inkubation mit 10 μM NOC-9 anfängt abzunehmen. Die Ratio beginnt bei 180 Sekunden auf 38,6 % zu sinken und in den nächsten 240 Sekunden nimmt die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 konstant ab. Eine abrupte Abnahme der Ratio bei 600 Sekunden ist sicherlich nicht übersehbar. Die Phosphorylierungsrate verringert sich bei 420 Sekunden von 35,6 % um 10,2 % auf 25,4 % bei 600 Sekunden. Damit erreicht die Phosphorylierungsrate die gleiche Ratio wie bei 60 Sekunden. Bis 900 Sekunden zeigt die Phosphorylierungsrate keine Änderung, und damit bleibt bis zum Ende der Inkubationszeit (900 Sekunden) konstant.



Grafik 3.13: Das Balkendiagramm zeigt den Verlauf von VASP-Phosphorylierung an Serin 239. Dabei wird Vollblut mit 10 μM NOC-9 inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

Zur Inkubation verwendet man nun verschiedene Konzentrationen von NOC-9 im Versuchsintervall, und betrachtet derweil die Phosphorylierungsrate von Serin 239 im Vollblut (Grafik 3.14). Trotz konstanter Erhöhung der NOC-9 Konzentration erfährt die Ratio keinerlei Änderung bis einschließlich 500 nM. Schließlich steigt die Ratio konstant an, und fällt beim letzten Versuch leicht ab. Am Anfang der Messreihe verweilt sie bei ca. 3 % (ebengenanntes Plateau), bei 1 μM steigt sie auf 9,5 %. Bei 50 μM hat die Ratio mit 48,3 % ihr absolutes Maximum im Kurvenverlauf. Bei 100 μM , der letzten im Versuch verwendeten Konzentration, fällt die Ratio im Vergleich zum Vorwert leicht ab, nämlich auf 46,4 %.

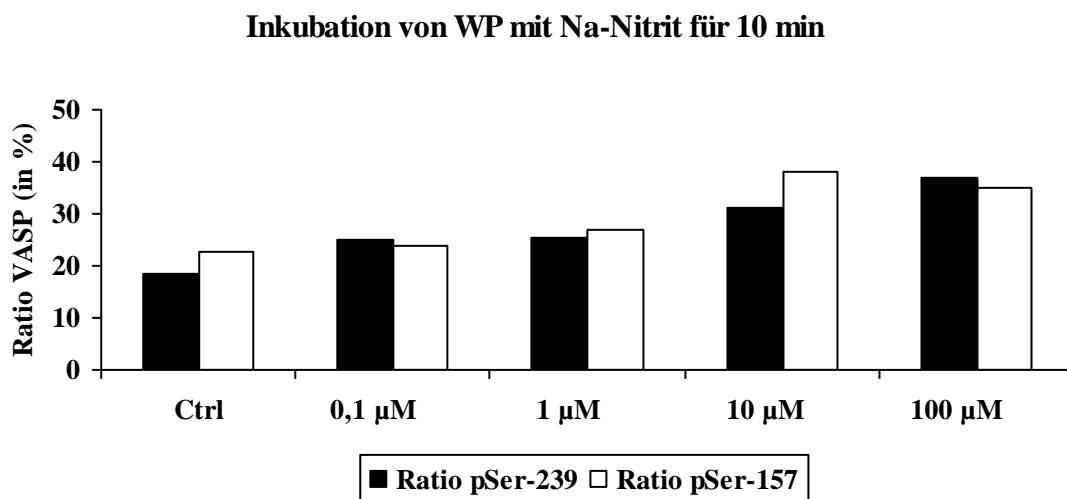


Grafik 3.14: Inkubation von NOC-9 in Vollblut unter gleichzeitige Betrachtung der Phosphorylierungsrate von Serin 239. Trotz Konzentrationserhöhung längere Zeit keine Änderung der Ratio, dann jedoch zuerst steiler Anstieg mit anschließendem, leichtem Abfall zum Ende der Messung. Einheit der Abszisse in nM, die der Ordinate wie bislang in Prozent. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von fünf Versuchen.

3.3. Natriumnitrit (NaNO_2)

3.3.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Natriumnitrit (NaNO_2)

Inkubiert man nun die gewaschenen Thrombozyten mit Natriumnitrit für zehn Minuten während die Konzentration ansteigt (Grafik 3.15), stellt man fest, dass die VASP-Phosphorylierung von Serin 239 bereits bei $0,1 \mu\text{M}$ Na-Nitrit gegenüber der Kontrolle leicht ansteigt, von 18,3 % bei der Kontrolle auf 25,1 % bei $0,1 \mu\text{M}$. Eine Erhöhung der Na-Nitrit-Konzentration um das zehnfache auf $1 \mu\text{M}$ bringt fast keine Veränderung bzgl. der Ratio, eine leichte Zunahme der Ratio um 0,3 % auf 25,4 % lässt sich dennoch messen. Eine Behandlung der Thrombozyten mit $10 \mu\text{M}$ Natriumnitrit sorgt für eine Steigerung der Rate auf 31,2 %. Bei Erhöhung der Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ wird der Höhepunkt der VASP-Phosphorylierung von Serin 239 aufgezeigt (37,1 % bei $100 \mu\text{M}$).

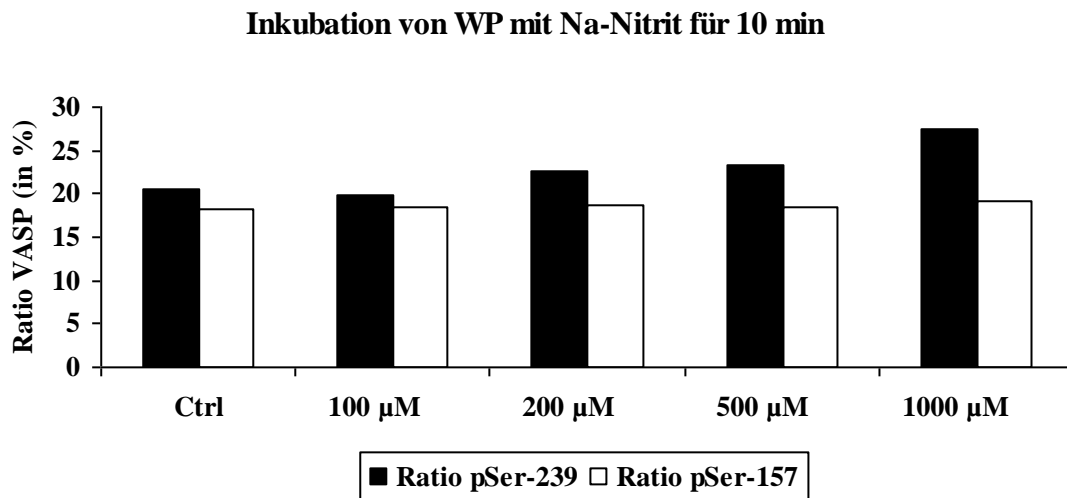


Grafik 3.15: Nach zehn Minuten Behandlung mit Natriumnitrit steigt die VASP-Phosphorylierung sowohl von Serin 239 (dunkle Balken) als auch von Serin 157 (helle Balken) konzentrationsabhängig an. Während der Höhepunkt von VASP-Phospho-Serin 239 bei $100 \mu\text{M}$ erreicht wird, zeigt er sich bei VASP-Phospho-Serin 157 bereits bei $10 \mu\text{M}$.

Die VASP-Phosphorylierung von Serin157 (Grafik 3.15) zeigt auch einen ähnlichen Verlauf wie die von Serin 239. Bereits bei der Anfangskonzentration von 0,1 μM steigt die Ratio gegenüber der Kontrolle leicht an (von 22,8 % bei der Kontrolle auf 24,0 % bei 0,1 μM). Auch unter Wirkung von 1 μM Na-Nitrat wird eine Steigerung der Ratio auf 27,1 % gemessen. Weitere konzentrationsabhängige Zunahme der VASP-Phosphorylierung von Serin 157 stellt man auch bei 10 μM fest, bei 38,1 % wird der höchste Punkt erreicht. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 100 μM bringt statt einem Anstieg eine Verringerung der Ratio um 3,2 % auf 34,9 %.

Ein weiterer Versuch zur Ermittlung der VASP-Phosphorylierung unter Wirkung von Natriumnitrit wird durchgeführt. In diesem Versuch (Grafik 3.16) wird die Konzentration von Natriumnitrit bis 1000 μM weiter erhöht. Während in der Grafik 3.15 eine Inkubation von Washed Platelets mit 100 μM Na-Nitrit für eine Steigerung des phosphorylierten Anteils von VASP-Serin 239 sorgt, ergibt hier eine Stimulation von WP mit 100 μM Natriumnitrit nach zehn Minuten-Inkubationszeit fast keine Änderung der Ratio. Eine kleine Zunahme der Ratio wird erst bei 200 μM Natriumnitrit festgestellt (von 20,6 % bei der Kontrolle auf 22,6 % bei 200 μM). Auch unter Wirkung von 500 μM Na-Nitrat zeigt eine Zunahme des phosphorylierten VASP-Serin 239 um 0,6 % auf 23,2 %. Der höchste Punkt der VASP-Phosphorylierung von Serin 239 wird aber erst bei 1000 μM erreicht.

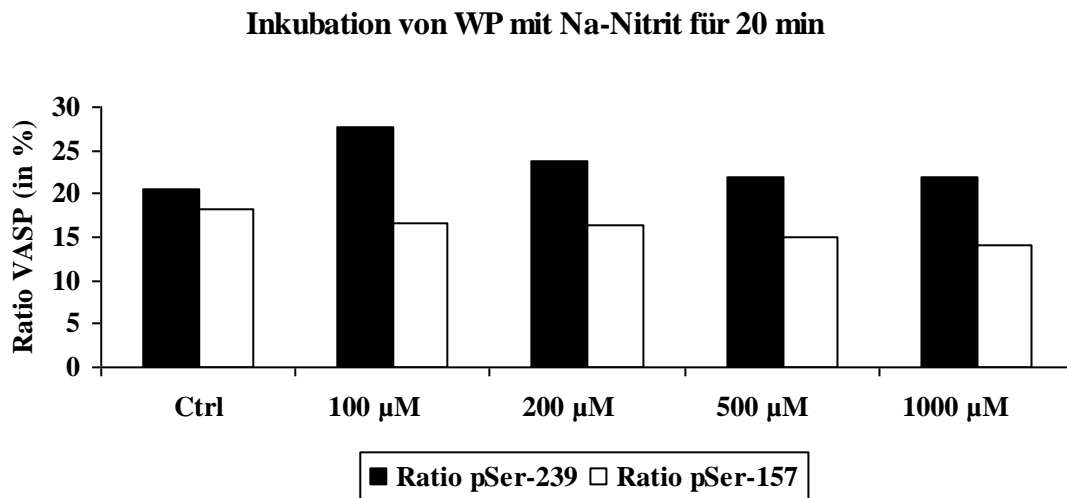
Im Gegensatz zur VASP-Phosphorylierung am Serin 239 bewirkt eine Erhöhung der Konzentration von Natriumnitrit fast keine Änderung der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 (Grafik 3.16). Eine kleine Zunahme der Ratio stellt man erst bei einer Inkubation mit 1000 μM Natriumnitrit fest und dies stellt damit den höchsten Punkt der VASP-Phosphorylierung von Serin 157 dar.



Grafik 3.16: Während nach zehn Minuten-Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit Natriumnitrit bei ansteigender Konzentration eine Zunahme des phosphorylierten Anteils von VASP-Serin 239 festgestellt wird, ergibt sich bei Phospho-Serin 157 fast keine Änderung im Vergleich zu dem Zeitpunkt der Kontrolle. Der Höhepunkt sowohl von Phospho-Serin 239 als auch von Phospho-Serin 157 wird erst bei einer Inkubation mit 1000 µM Natriumnitrit erreicht.

Wie bereits oben beschrieben, wird die Thrombozytenaktivität nach zehn Minuten Inkubation mit 1000 µM Natriumnitrit am stärksten gehemmt. Die Inkubationszeit wird auf 20 Minuten erhöht und der Effekt der erhöhten Inkubationszeit wird anhand der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 und Serin 157 ermittelt (Grafik 3.17).

Eine 20 Minuten-Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit Natriumnitrit bei ansteigender Konzentration resultiert in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der VASP-Phosphorylierung sowohl von Serin 239 als auch von Serin 157. VASP-Serin 239 wird bei einer 20 Minuten-Inkubation mit 100 µM Na-Nitrat am stärksten phosphoryliert (27,7 %). Bei weiterer Erhöhung der Konzentration erfolgt eine langsame aber kontinuierliche Verringerung der VASP-Serin239-Phosphorylierungsrate (23,8 % bei 200 µM und 21,9 % bei 500 µM). Der Tiefpunkt der VASP-Phosphorylierung von Serin 239 wird bei 1000 µM erreicht (21,8 %).



Grafik 3.17: Nach 20 Minuten Behandlung mit Natriumnitrit bei ansteigender Konzentration zeigt VASP-Phosphorylierung sowohl von Serin 239 als auch von Serin 157 eine stetige Abnahme der Ratio. Unter Wirkung von 1000 µM Na-Nitrit liegt sogar der Anteil des phosphorylierten VASP-Serin 239 und Serin 157 unter dem der Kontrolle.

Ähnlich verläuft auch die VASP-Phosphorylierung von Serin 157 (Grafik 3.17). Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 nimmt bei Erhöhung der Natriumnitrit-Konzentration regelmäßig und langsam ab, bis der Tiefpunkt bei 1000 µM erreicht wird.

Fasst man nun die Ergebnisse einer Inkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) mit Natriumnitrit zusammen, so kann man feststellen, dass bei der zehninuitigen Inkubation der Anteil des VASP-Phospho-Serin 239 und VASP-Phospho-Serin 157 konzentrationsabhängig konstant zunimmt. Außerdem erweist sich 1000 µM Na-Nitrat als die effektivste Konzentration um die Thrombozytenaktivität zu hemmen.

Wenn man jedoch die Inkubationszeit auf 20 Minuten erhöht, wird eine langsame und konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierungsrate beider Serinreste festgestellt. Bei dem zwanzigminütigen Inkubationsversuch wird die höchste VASP-Phosphorylierungsrate bei 100 µM Natriumnitrit erreicht, was wiederum bedeutet, dass die Aktivität der Thrombozyten am stärksten gehemmt wird.

3.4. Iloprost

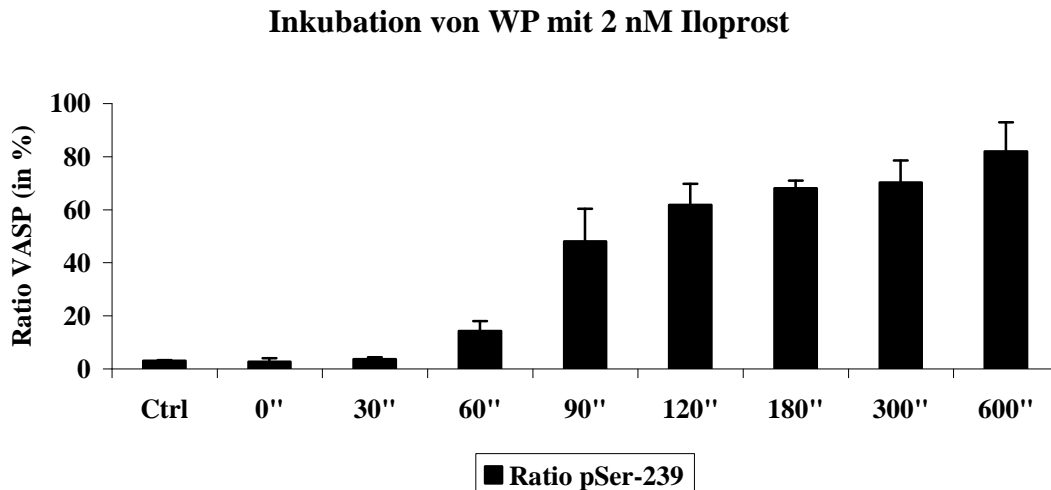
3.4.1. Inkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) mit Iloprost

Iloprost ist ein stabiles Analogon des körpereigenen Prostazyklins. Prostazyklin wird als Gewebshormon hauptsächlich im Endothel der Blutgefäße, aber z. B. auch in glatten Muskelzellen gebildet. Seine physiologische Bedeutung beruht auf vasodilatativen, antiproliferativen, zytoprotektiven Eigenschaften. Prostazyklin ist der stärkste endogene Thrombozytenaggregationshemmer. Über die Bindung an den IP-Rezeptor stimuliert Prostazyklin die Adenylat-Zyklase, woraus eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes resultiert. Iloprost hat aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur ebenfalls eine hohe Affinität zum IP-Rezeptor und eine vergleichbare pharmakodynamische Wirkung.

Die Wirkung von Iloprost auf gewaschene Thrombozyten (WP) wird durch Messung der Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 als auch von Serin 157 ermittelt. Dabei werden Thrombozyten mit 2 nM Iloprost inkubiert, und zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. In diesem Versuch werden wieder die Antikörper 16C2 und 5C6 verwendet.

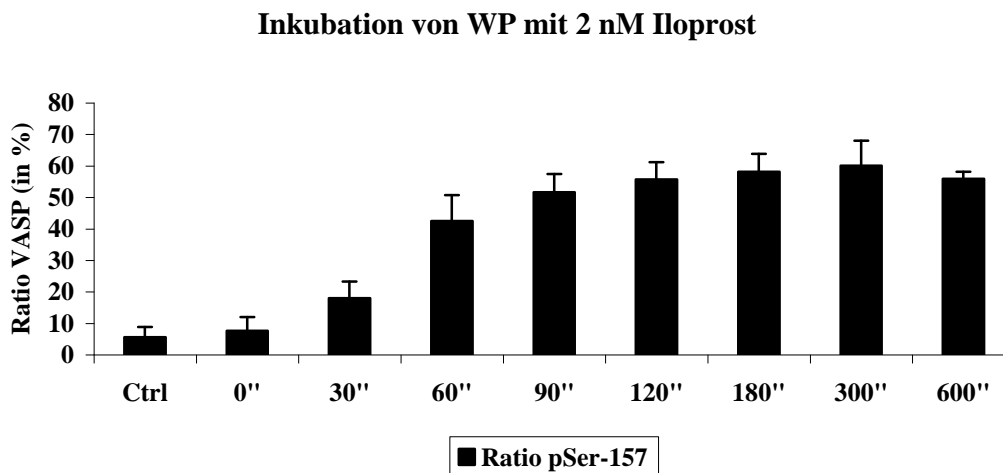
Bei einer Inkubationszeit von 0 Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 gegenüber der Kontrolle gering ab (Grafik 3.18). Während die Messung eine Ratio von 3,0 % bei der Kontrolle ergibt, reduziert sich der Wert um 0,3 % auf 2,7 % bei 0 Sekunden. Nach weiteren 30 Sekunden-Inkubation steigt wieder die Ratio um 0,7 % auf 3,7 % gegenüber der Kontrolle. Einen wesentlichen, auffälligen Anstieg sieht man erst bei 60 Sekunden-Inkubation, hier steigt die Ratio von Phospho-Serin 239 fast um das fünf-fache gegenüber der Kontrolle auf 14,2 %. Es fällt besonders auf, dass die Ratio 16C2 bei 90 Sekunden sprunghaft zunimmt. Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 vervielfacht sich um 33,8 % auf 48,0 %. Ein weiterer massiver Anstieg der Ratio lässt sich bei 120 Sekunden feststellen, die Zunahme ist zwar wesentlich kleiner als bei 90 Sekunden, deutlich sichtbar ist jedoch, dass die Ratio um 13,8 % auf 61,8 % ansteigt. Nach weiteren 60 Sekunden zeigt die Ratio eine Zunahme, die nur noch halb so groß wie die von 90 Sekunden, eine Ratio von 68,0 % lässt sich bei 180 Sekunden messen.

Über den Zeitraum von 180 Sekunden bis 300 Sekunden findet man einen fast gleichmäßigen Verlauf der Ratio, mit leichtem Anstieg um 2,2 % auf 70,2 %. Zum Ende der Messreihe zeigt sich ein Anstieg der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 um 11,7% auf 81,9% bei 600 Sekunden.



Grafik 3.18: Das Balkendiagramm zeigt lediglich geringe Verlaufsänderung der VASP-Phosphorylierung an Serin 239 gegenüber der Kontrolle während der ersten 30 Sekunden. Den ersten Anstieg stellt man erst bei 60 Sekunden fest. Besonders auffallend ist die sprunghafte Zunahme bei 90 Sekunden, danach verlaufen die Balken fast gleichmäßig. Es zeigen sich jedoch noch weitere kleine Zunahmen der Ratio, bis der Höhepunkt bei 600 Sekunden erreicht wird. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen, die aus vier Experimenten ermittelt werden. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

Die Phosphorylierung von VASP-Serin 157 (Grafik 3.19) unter Wirkung von 2 nM Iloprost mit ansteigender Inkubationszeit zeigt ähnlichen Verlauf wie bei VASP-Serin 239, aber es lässt sich feststellen, dass die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 früher und schneller ansteigt im Gegensatz zu VASP-Serin 239, wonach die beiden Serinreste gegen Ende der Inkubationszeit fast ähnlich verlaufen, unterscheiden sich aber in dem Höhepunkt. VASP-Serin 239 erreicht die höchste Phosphorylierungsrate erst bei 600 Sekunden, VASP-Serin 157 hingegen bereits bei 300 Sekunden.



Grafik 3.19: Die Ratio von Phospho-Serin 157 zum Gesamt-VASP nimmt unter Wirkung von 2 nM Iloprost mit ansteigender Inkubationszeit zu. Der Verlauf der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 zeigt Ähnlichkeit mit VASP-Serin 239, unterscheidet sich aber im Höhepunkt. Es ist auffällig, dass VASP-Serin 157 die höchste Phosphorylierungsrate bereits bei 300 Sekunden zeigt, während diese bei VASP-Serin 239 erst 300 Sekunden später erreicht wird. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stellen Messwerte aus vier Versuchen dar. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

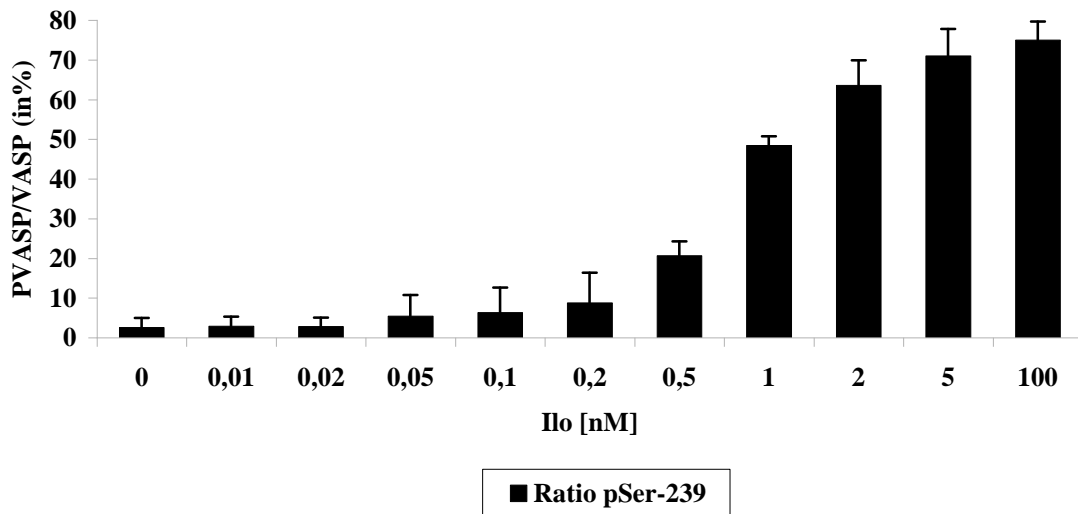
In der Grafik 3.19 kann man erkennen, dass die gewaschenen Thrombozyten direkt nach Zugabe von 2 nM Iloprost sofort reagieren. Einen kleinen Anstieg stellt man schon bei 0 Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) fest, die Ratio steigt von 5,6 % (bei der Kontrolle) um 2,1 % auf 7,7 % an. Nach 30 Sekunden-Inkubationszeit ergibt sich ein sehr deutlicher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Bei 17,9 % nimmt die Phosphorylierungsrate mehr als das Dreifache (verglichen mit der Kontrolle) zu. Bei Erhöhung der Inkubationszeit auf 60 Sekunden ist ein sprunghafter Anstieg nicht zu übersehen, Die Ratio nimmt um 24,5 % auf 42,4 % zu. In dem Inkubationszeitintervall von 90 Sekunden bis 300 Sekunden lassen sich keine großen Veränderungen messen. Obwohl die Ratio leicht aber kontinuierlich ansteigt, verläuft aber die Phosphorylierung von VASP-Serin 157 während dieser 210 Sekunden-Inkubation mit 2 nM Iloprost insgesamt gleichmäßig. Bei 51,7 % zum Zeitpunkt von 90 Sekunden, 55,7 % bei 120 Sekunden, 58,1 % bei 180 Sekunden, und 60,1 % bei 300 Sekunden verflachen sich die Anstiegraten und bilden ein Plateau während des Zeitraums von 60 bis 300 Sekunden. Obwohl nicht zu erwarten, wird der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate bei 300 Sekunden erreicht. Bei 600 Sekunden stellt man jedoch

fest, dass die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 auf 55,9 % sich nur geringfügig verringert.

Fasst man nun die Ergebnisse einer Inkubation von gewaschenen Thrombozyten mit 2 nM Iloprost zusammen, kann man feststellen, dass Iloprost (Analogon des körpereigenen Prostazyklins) seine Wirkung als Hemmer der Thrombozytenaktivierung rasch entfaltet, und sich als eine stabile Substanz (im Vergleich mit SNP) mit Halbwertszeit von mehreren Minuten erweist.

In einem anderen Versuch inkubieren wir gewaschene Thrombozyten (Grafik 3.20) mit verschiedenen Konzentrationen von Iloprost. In der Grafik 3.20 dient der erste Balken wieder als Referenz. Nun werden Schritt für Schritt die Konzentrationen des Iloprost erhöht. Bis 0,02 nM ergibt sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Die Ratio liegt < 20 %. Die Konzentration wird weiter erhöht. Nun ist ein Anstieg der Phosphorylierungsrate zu verzeichnen, der bis 0,2 nM leicht progressiv, ab 0,5 nM jedoch sehr steil wird. Hier überschreitet die Ratio 20 %. Bei 5 nM verharrt die Ratio schließlich auf einem konstanten Plateau. Nun wird die Konzentration stark erhöht, von 5 auf 100 nM, die Kurve beginnt auf einem Plateau zu nivellieren. Das Plateau, das sich im Konzentrationsintervall von 5 bis 100 nM kaum verändert, interferiert zwischen 63,6 % und 75,0 %. Da keine weiteren Messdaten vorliegen, kann nicht auf den weiteren Kurvenverlauf geschlossen werden. Aus dem Versuch wird deutlich, dass bis zu 5 nM Iloprost die Phosphorylierungsrate leicht ansteigt, bei weiterer Konzentrationserhöhung steil. Jedoch gibt es ab 5 nM Iloprost gibt es keine nennenswerte Änderung der Ratio mehr, selbst wenn man die Iloprost Konzentration auf das 20-fache (100 nM) erhöht.

Inkubation von WP mit Iloprost für 2 Min.



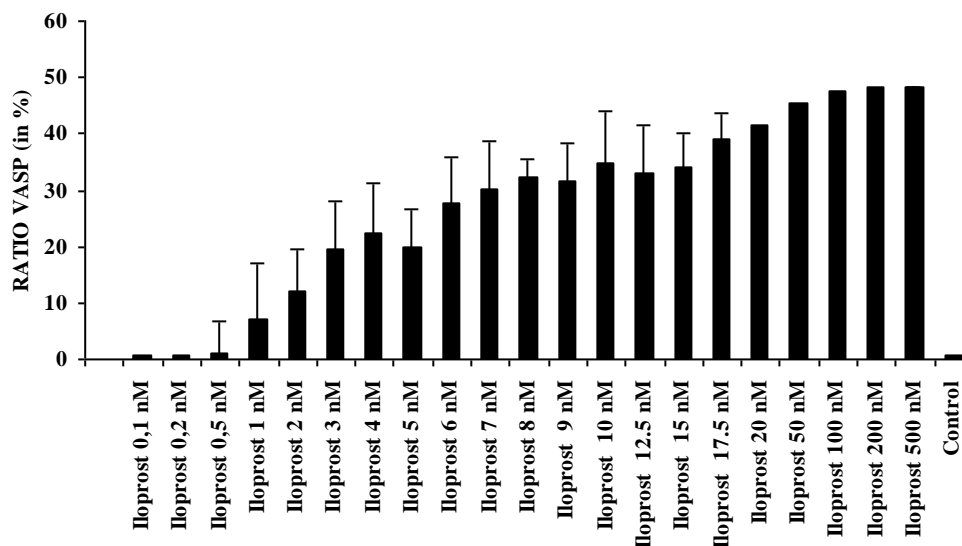
Grafik 3.20: Analyse der Phosphorylierung von Serin-239 unter Zugabe von Iloprost. Aus dem Kurvendiagramm ist zuerst ein stetiger progressiver Anstieg der Phosphorylierung zu erkennen, der sich zwischen 0,5 und 2 nM steil erhöht, und danach keinen markanten Anstieg trotz der Vervielfachung der Konzentration mehr zeigt. Alle Messwerte sind gemittelt nach dem mathematischen Axiom der Standardabweichung. Insgesamt bezieht sich die Messreihe auf fünf Versuchen. Die an der Abszisse angetragenen Zahlenwerte sind in nM angegeben.

3.4.2. Inkubation von Vollblut (VB) mit Iloprost

Vollblut wird mit verschiedenen Konzentrationen an Iloprost inkubiert und die Phosphorylierung von Serin 239 gemessen (Grafik 3.21). Die Kontrolle ist in diesem Diagramm am Ende der Messreihe angetragen. Die Konzentration des Iloprost wird schrittweise von 0,1 bis 0,5 nM erhöht. Ein Unterschied zur Kontrolle ist nicht erkennbar. Nun wird die Konzentration auf 1 nM erhöht. Hier zeigt sich erstmals ein größerer Gradient der Ratio. Dies wird darin deutlich, dass letztere sprunghaft auf 6,9 % ansteigt, dies entspricht mehr als dem 8-fachen Wert der Ratio gegenüber der Kontrolle. Die Konzentration wird weiter erhöht. Bis 4 nM steigt die Ratio konstant. Bei 5 nM ist ein leichter Einbruch der Ratio zu erkennen. Betrag sie bei 4 nM noch 22,5 %, so liegt

sie nach Zugabe von 5 nM Iloprost lediglich bei 19,7 %. Bei weiterer Erhöhung bis auf 8 nM ist der Anstieg erneut stetig. Bei 9 nM liegt die Ratio bei 31,6 %, sie ist im Vergleich zu 8 nM um 0,7 % gefallen. Bei 10 nM beträgt die Ratio 34,9 %, und sinkt noch minimal bei 12,5 nM. Hier beträgt die Ratio 33,1 %, und steigt bei weiterer Konzentrationszugabe konstant an. Sie findet ihr Plateau ab einer Konzentration von 100 nM. Selbst bei erneuter Zugabe von Iloprost bis zur 5-fachen Konzentration (500 nM) bleibt die Ratio fast konstant auf 48 %.

Inkubation von VB mit Iloprost für 2 Min.

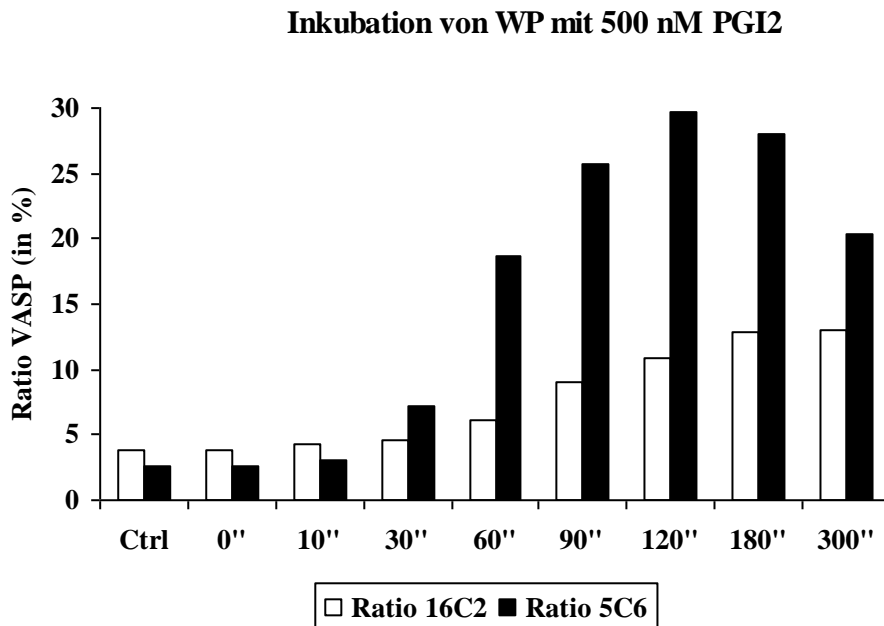


Grafik 3.21: Grafischer Verlauf der Phosphorylierung von Serin 239 nach Iloprostzugabe in Vollblut. Ein nennenswerter Anstieg zur Kontrolle ist erst ab 1 nM erkennbar, der Verlauf der Ratio ansteigend, wobei durch einige Einbrüche ein leichter treppenhafter Anstieg bedingt ist. Ab 100 nM Iloprost interferiert die Ratio um ihr Maximum bei ca. 48%. Die Einheit der X-Achse ist nM, die der Y-Achse Prozent. Die Messwerte sind Mittelwerte aus fünf Experimenten.

3.5. Prostazyklin (PGI₂)

3.5.1. Inkubation von washed platelets (WP) mit Prostazyklin (PGI₂)

Prostazyklin (PGI₂) wird in Endothelzellen mit Hilfe der Prostazyklinsynthase aus Prostaglandin PGH₂ gebildet. Die Prostazyklinsynthase ist wichtig für das normale Gleichgewicht der Durchblutung und Thrombenbildung. Gefäßzellen bilden viele Prostaglandine, Prostazyklin ist jedoch das Hauptprostaglandin, welches durch die Endothelzellen der Gefäße gebildet wird, in denen die Prostaglandin-I-Synthase angereichert vorkommt. Prostazyklin bindet am G-Protein gekoppelten Prostazyklin-Rezeptor der glatten Muskelzellen der Gefäße, und hemmt über eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs die Gefäßkontraktion. Es hemmt auch die Thrombozytenaggregation und fungiert somit auch hier funktionell als ein Gegenspieler des v. a. in Thrombozyten gebildeten Thromboxans.



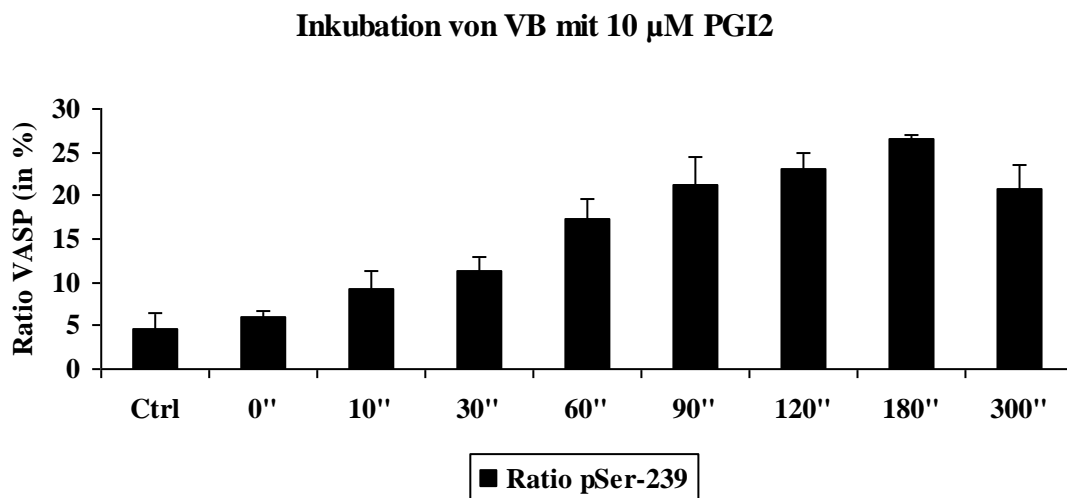
Grafik 3.22: Unter Wirkung von 500 nM PGI₂ nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 (Ratio 5C6) sprunghaft zu und erreicht ihren höchsten Punkt bei 120 Sekunden, während VASP-Serin 239 (Ratio 16C2) nur langsam und kontinuierlich phosphoryliert wird. Die Inkubationszeit ist in Sekunden angegeben.

Eine Inkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) mit 500 nM PGI₂ (Grafik 3.22) zeigt in den ersten 30 Sekunden kleine Zunahmen, jedoch kaum eine Änderung zu der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 (Ratio 16C2) gegenüber der Kontrolle. Bei einer Inkubationszeit von 60 Sekunden beginnt der Anteil von phosphoryliertem VASP-Serin 239 anzusteigen (von 4,5 % bei 30 Sekunden auf 6,1 % bei 60 Sekunden und zwischen 90 Sekunden und 300 Sekunden nimmt die Ratio langsam und kontinuierlich weiter zu, bis die höchste VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 bei 300 Sekunden (13,0 %) erreicht wird.

Misst man nun die VASP-Phosphorylierung von Serin 157 (in Grafik 3.22 als Ratio 5C6 dargestellt), so stellt man fest, dass am Anfang (in der ersten Zehn-Sekunden der Inkubationszeit) weniger VASP-Serin 157 phosphoryliert wird -im Vergleich zu VASP-Serin 239; außerdem zeigt die Ratio während dieser Inkubationszeit fast keinen Unterschied gegenüber der Kontrolle. Die erste Zunahme der VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 157 lässt sich kaum übersehen, die Ratio steigt von 3,1 % bei zehn Sekunden auf 7,2 % an, zugleich übertrifft die Phosphorylierungsrate von Serin 157 die von Serin 239. Es ist extrem auffällig, dass die Phosphorylierungsrate bei 60 Sekunden sprunghaft zunimmt, verglichen mit der von 30 Sekunden wächst die Ratio auf mehr als das Doppelte (18,7 %). Weitere Zunahmen der Ratio stellt man bis 120 Sekunden fest, bei 29,6 % wird der Höhepunkt erreicht. Verlängert man die Inkubationszeit auf 180 Sekunden, verringert sich die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 auf 27,9 % und bis 300 Sekunden reduziert sich die Ratio auf 20,4 %.

Inkubiert man nun Vollblut mit 10 µM PGI₂ (Grafik 3.23) nimmt die Phosphorylierungsrate von Serin 239 mit ansteigender Inkubationszeit zu. Die Mittelwerte der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 (Ratio 16C2) werden bei einer Inkubationszeit von 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 300 Sekunden miteinander verglichen. Eine klare Reaktion der Thrombozyten mit 10 µM PGI₂ wird durch eine kleine Zunahme der Ratio gegenüber der Kontrolle bereits bei 0 Sekunden (die Inkubation erfolgt nur für Bruchteil von Sekunden) gezeigt. Nach weiteren 10 Sekunden Inkubation steigt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 auf 9,3 % an, eine weitere Vergrößerung des phosphorylierten Anteils wird außerdem auch bei 30 Sekunden (11,2

%) gemessen. Einen steilen Anstieg stellt man aber erst bei 60 Sekunden fest, die Ratio steigt um 6 % auf 17,2 %. Danach wächst die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 langsam und kontinuierlich über den Zeitraum von 60 bis 180 Sekunden. Damit wird der Gipfel bei Inkubationszeit von 180 Sekunden erreicht. Inkubiert man nun das Vollblut für 300 Sekunden, erfolgt statt einer weiteren Zunahme der Ratio eine abrupte Abnahme um 6 % auf 20,7 %.

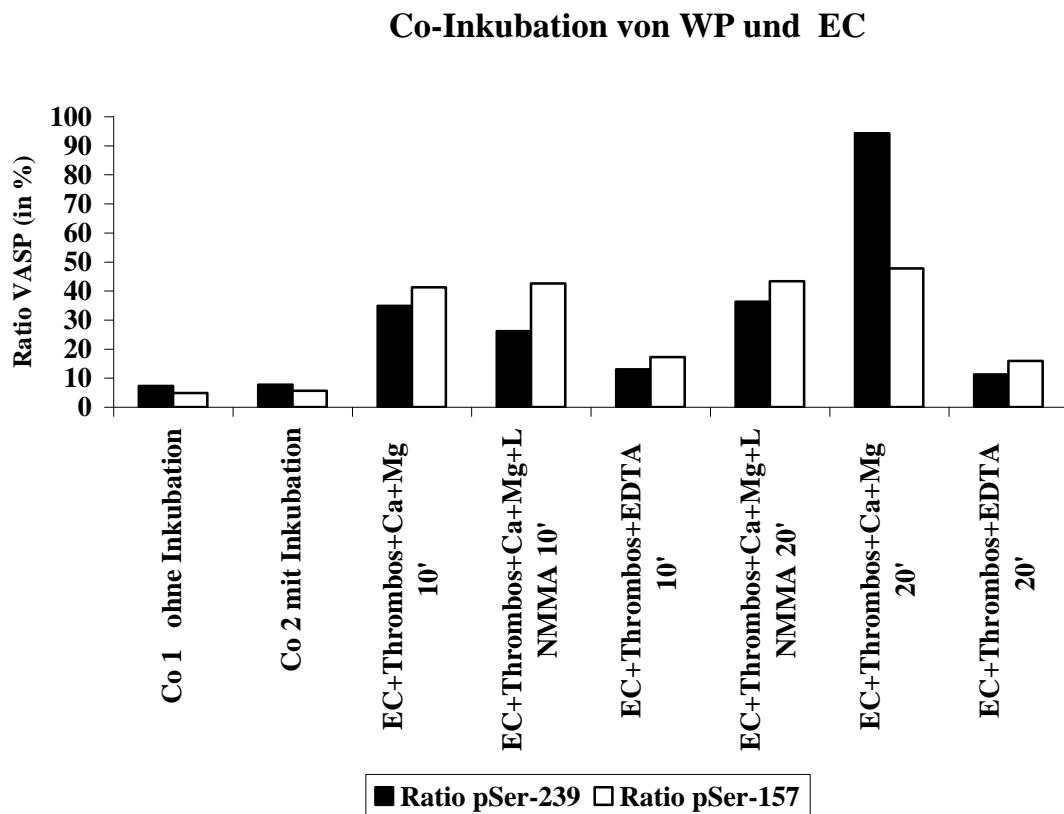


Grafik 3.23: Eine Inkubation von Vollblut mit 10 μ M PGI₂ resultiert in einer zeitabhängigen Zunahme der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239. Dabei stellt man zudem fest, dass in diesem Versuch, im Vergleich zu dem Versuch mit gewaschenen Thrombozyten, VASP-Serin 239 trotz höherer Konzentration von PGI₂ schwächer phosphoryliert wird. Der größte Anteil von phosphoryliertem VASP-Serin 239 wird bei Inkubationszeit von 180 Sekunden erreicht.

3.6. Endothelzellen

3.6.1. Koinkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) und Endothelzellen (EC)

In diesem Versuch werden gewaschene Thrombozyten (WP) zusammen mit Endothelzellen (EC) inkubiert. Nach Koinkubation von WP, EC mit Substanzen, die die VASP-Phosphorylierung fördern oder hemmen, erfasst man den Funktionszustand der Thrombozyten quantitativ anhand des Phosphorylierungsstatus von VASP-Serin 239 und VASP Serin 157.



Grafik 3.24: Mit zunehmender Inkubationszeit steigen die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 und Serin 157 unter Wirkung von 50 µl LNMMA (10mM) oder 10 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM) an. Im Gegensatz dazu stellt man fest, dass eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 20 Minuten unter Wirkung von 10 µl EDTA (200mM) eine kleine Abnahme der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 und VASP-Serin 157 bewirkt.

Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten (Grafik 3.24) ergibt der VASP-POD-Assay einen nennenswerten Anstieg der VASP-Phosphorylierung sowohl von Serin 239 als auch von Serin 157 gegenüber der Kontrolle unter Wirkung von $10 \mu\text{l Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM). Bei dieser Inkubation wird gezeigt, dass der phosphorylierte Anteil von VASP-Serin 157 (41,2 %) im Vergleich zu dem von VASP-Serin 239 (34,9 %) größer ist. Fügt man noch zusätzlich $50 \mu\text{l LNMMA}$ (10 mM) hinzu, ein NO-Synthase-Inhibitor und inkubiert für zehn Minuten, nimmt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 ab, während es bei VASP-Serin 157 fast keinen Unterschied gibt.

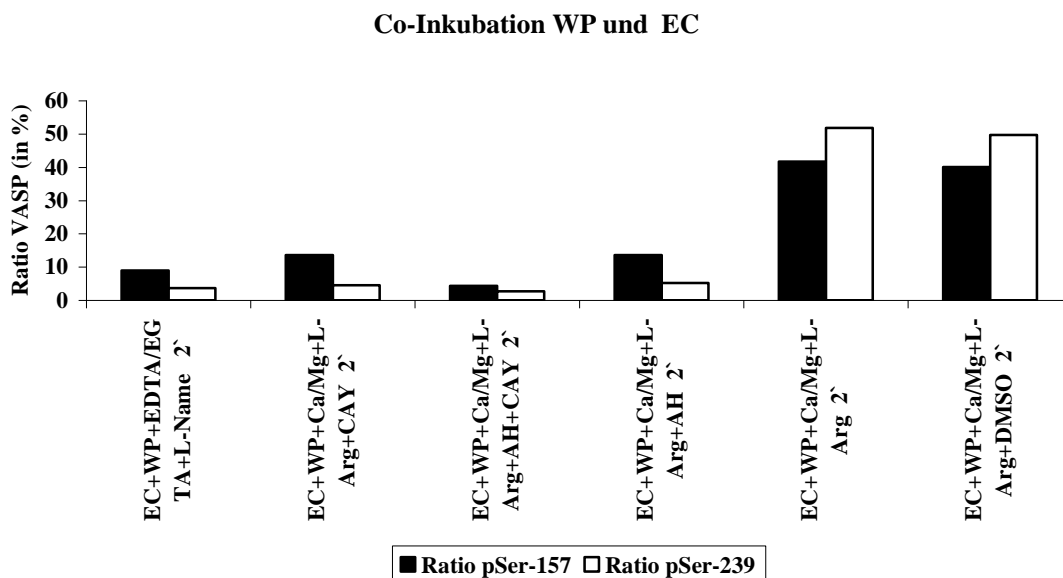
Nach Behandlung der Thrombozyten und Endothelzellen mit $10 \mu\text{l EDTA}$ (200 mM) sinken die VASP-Phosphorylierungsrate sowohl von Serin 239 als auch von Serin 157 auf 13,1 % bei VASP-Serin 239 und 17,2 % bei VASP-Serin 157. Im Gegensatz zu der Inkubation von WP, EC mit $50 \mu\text{l LNMMA}$ (10 mM) für zehn Minuten nimmt die VASP-Phosphorylierung von Serin 239 und Serin 157 bei Erhöhung der Inkubationszeit auf 20 Minuten zu. Die Ratio steigt auf 36,2 % bei Serin 239 und auf 43,3 % bei Serin 157. Die Zunahme der VASP-Phosphorylierungsrate nach 20 Minuten-Inkubation stellt man zudem auch bei der Behandlung der Thrombozyten- und Endothelzellen mit $10 \mu\text{l Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) fest. Im Vergleich zu der Inkubation von WP, EC mit $10 \mu\text{l Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) für zehn Minuten, steigt die VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 nach 20 Minuten-Inkubation sprunghaft um 59,4 % auf 94,3 % an, während VASP-Serin 157 nur einen Anstieg von 6,6 % auf 47,8 % zeigt. Unter Wirkung von $10 \mu\text{l EDTA}$ (200 mM) für 20 Minuten wird eine kleine Abnahme der Ratio von VASP-Serin 239 und VASP-Serin 157 verglichen mit der von zehn Minuten festgestellt. Die VASP-Phosphorylierungsrate geht auf 11,3 % bei Serin 239 und auf 15,9 % bei Serin 157 zurück.

Die untenstehende Grafik (Grafik 3.25) stellt die Ergebnisse der Inkubation von gewaschenen Thrombozyten (WP) und Endothelzellen (EC) mit Thrombozyten hemmenden Substanzen bzw. Thrombozyten aktivierenden Substanzen dar.

3,7 % des VASP-Serin 239 und 8,9 % des VASP-Serin 157 werden bei einer Koinkubation von WP, EC, $15 \mu\text{l EGTA/EDTA}$ (200 mM), und $15 \mu\text{l L-NAME}$ (100 mM) für zwei Minuten phosphoryliert. Inkubiert man nun die Thrombozyten- und

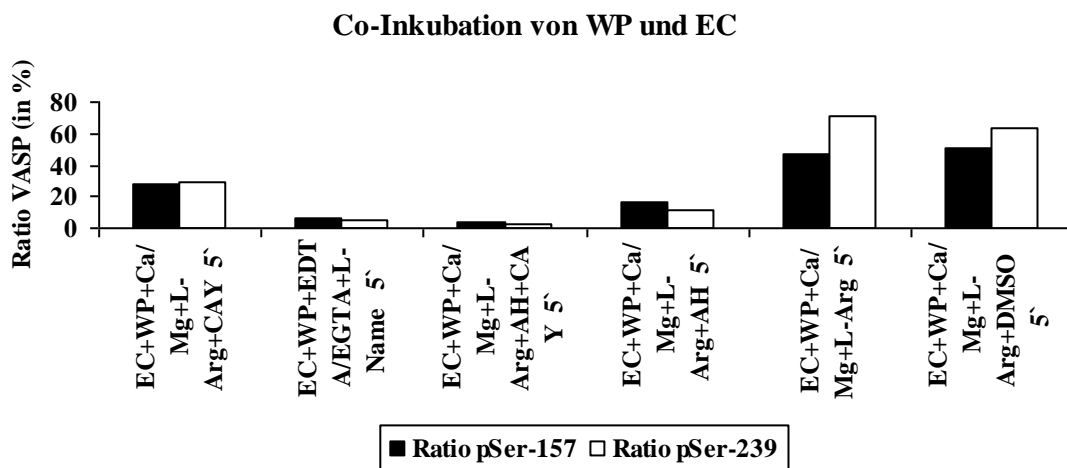
Endothelzellen mit 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM), 15 μl L-Arginin (2,5 mM) und 8 μl CAY 10441 (2 mM), so steigt der phosphorylierte Anteil von VASP-Serin 239 auf 4,5 % und von VASP-Serin 157 auf 13,6 % an. Eine zusätzliche Gabe von 30 μl AH 6809 (10 mM) bewirkt eine Abnahme der Ratio auf 2,7 % bei VASP-Serin 239 und auf 4,4 % bei VASP-Serin 157.

Unter Wirkung von 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) , 15 μl L-Arginin (2,5 mM) und 30 μl AH 6809 (10 mM), ohne Gabe von CAY 10441 (2 mM) stellt man fest, dass die Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 (5,2 %) als auch von VASP-Serin 157 (13,6 %) eine Zunahme im Vergleich zu der Inkubation mit zusätzlicher Gabe von 8 μl CAY 10441 (2 mM) zeigt. Besonders auffallend ist eine Koinkubation von WP, EC, 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM), 15 μl L-Arginin (2,5 mM) ohne Gabe von AH 6809 (10 mM), dabei zeigt sich ein sprunghafter Anstieg der VASP-Phosphorylierungsrate von Serin 239 auf 51,8 % und Serin 157 auf 41,7 % gezeigt. Eine zusätzliche Gabe von 15 μl DMSO ergibt fast keine Änderung zu der Phosphorylierung sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157.



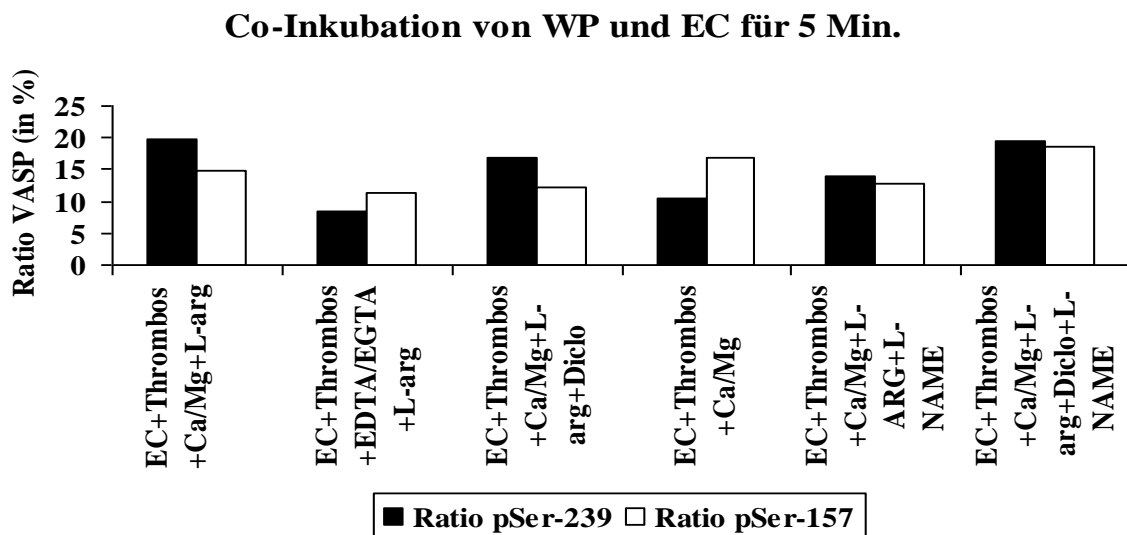
Grafik 3.25: Eine besonders hohe Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157 stellt man bei der Koinkubation von gewaschenen Thrombozyten und Endothelzellen mit 15 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) sowie 15 μl L-Arginin (2,5 mM) für zwei Minuten fest. Fast die gleiche Phosphorylierungsrate wird durch zusätzliche Gabe von 15 μl DMSO erreicht.

Mit Erhöhung der Inkubationszeit auf fünf Minuten (Grafik 3.26) steigt der phosphorylierte Anteil sowohl von VASP-Serin 239 (29,7 %) als auch von VASP-Serin 157 (27,8 %) unter Wirkung von 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM), 15 µl L-Arginin (2,5 mM), und 8 µl CAY 10441 (2 mM) im Vergleich zu der zwei Minuten-Inkubation. Behandelt man die Thrombozyten- und Endothelzellen mit 15 µl EDTA/EGTA (200 mM) und 15 µl L-NAME (100 mM) sinken die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 auf 5,4 % und von VASP-Serin 157 auf 6,1 %. Eine fast gleiche Phosphorylierungsrate stellt man außerdem auch bei der Inkubation mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM), 15 µl L-Arginin (2,5 mM), 8 µl CAY 10441 (2 mM) und 30 µl AH 6809 (10 mM) fest. Die gleiche Koinkubation ohne zusätzliche Gabe von CAY 10441 (2 mM) bewirkt eine kleine Zunahme der Ratio von VASP-Serin 239 auf 11,6 % und von VASP-Serin 157 auf 16,5 %. Inkubiert man nun die Zellen nur mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM), vervielfacht sich die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 und Serin 157, der phosphorylierte Anteil von VASP-Serin 239 bzw. Serin 157 steigt auf 71,2 % bzw. 46,5 % an. Eine zusätzliche Gabe von 15 µl DMSO ergibt fast keine Änderung zu der Phosphorylierungsrate, die Ratio sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157 bleiben nahezu konstant verglichen mit der gleichen Koinkubation ohne Gabe von DMSO.



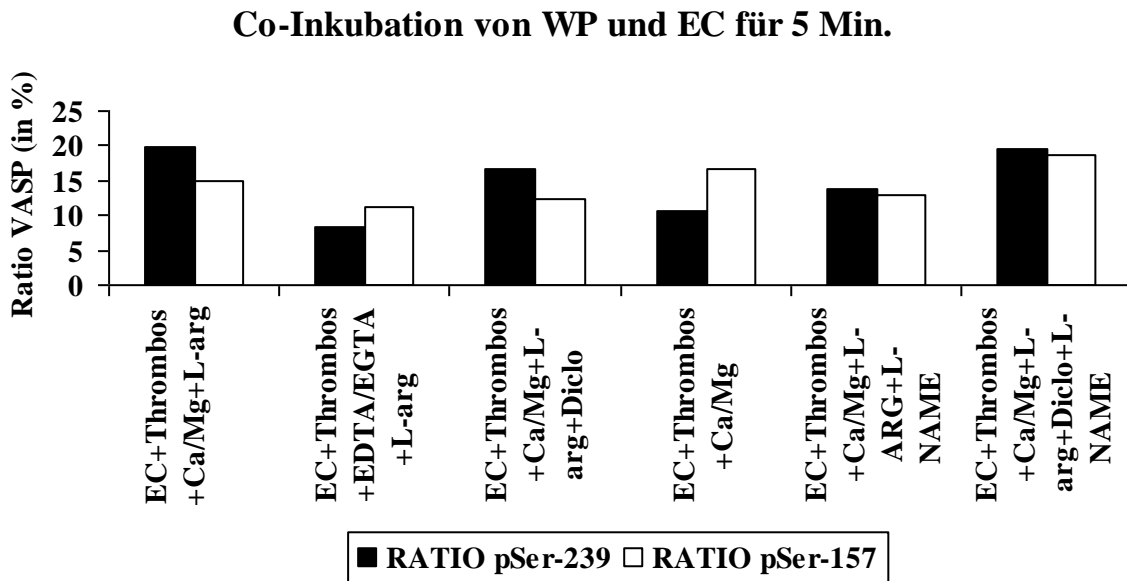
Grafik 3.26: Die höchste Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157 wird bei der Co-Inkubation von WP und EC mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM), 15 µl L-Arginin (2,5 mM), ohne oder mit 15 µl DMSO erreicht.

Nach einer Koinkubation von gewaschenen Thrombozyten, Endothelzellen, 15 µl EDTA/EGTA (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM) für fünf Minuten ergibt der VASP-POD-Assay eine Phosphorylierungsrate von 18,6 % von VASP-Serin 239 und 18,2 % von VASP-Serin 157 (Grafik 3.27). Eine kleine Zunahme der Ratio auf 23,7 % bei VASP-Serin 239 und auf 24,6 % bei VASP-Serin 157 wird bei der Inkubation von WP, EC, mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM) festgestellt. Eine zusätzliche Inkubation mit 15 µl Diclofenac (10 mM) verursacht sogar eine Steigerung der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 auf 29,3 % bzw. auf 26,1 %. Inkubiert man nun die Zellen nur mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM) nimmt die Ratio auf 22,5 % bei VASP-Serin 239 und auf 24,2 % bei VASP-Serin 157 ab, fügt man zusätzlich 15 µl L-Arginin (2,5 mM) und 15 µl L-NAME (100 mM) hinzu, stellt man eine Abnahme der Phosphorylierungsrate von 3,1 % von VASP-Serin 239 auf 19,4 % und von VASP-Serin 157 auf 21,4 % fest. Ein kleiner Anstieg der Ratio auf 22,6 % bei VASP-Serin 239 wird durch zusätzliche Gabe von 15 µl Diclofenac (10 mM) festgestellt, während VASP-Serin 157 eine kleine Abnahme um 1,3 % auf 20,1 % zeigt.



Grafik 3.27: Durch eine Koinkubation von WP und EC mit 15 µl Ca²⁺/Mg²⁺ (200 mM) 15 µl L-Arginin (2,5 mM) und 15 µl Diclofenac (10 mM) wird die höchste Phosphorylierungsrate sowohl von VASP-Serin 239 als auch von VASP-Serin 157 erreicht. Unter Wirkung von 15 µl EDTA/EGTA (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM) werden VASP-Serin 239 und VASP-Serin 157 am wenigsten phosphoryliert.

Nach fünf Minuten Koinkubation von gewaschenen Thrombozyten und Endothelzellen mit 15 µl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM) wird eine Phosphorylierungsrate von 19,9 % bei VASP-Serin 239 und 14,9 % bei VASP-Serin 157 gemessen (Grafik 3.28). Inkubiert man nun die Thrombozyten und Endothelzellen mit 15 µl EDTA/EGTA (200 mM) und 15 µl L-Arginin (2,5 mM) halbiert sich die Ratio von VASP-Serin 239 auf 8,3 %, während VASP Serin 157 nur eine geringe Abnahme der Ratio um 3,7 % auf 11,2 % zeigt. Unter Wirkung von 15 µl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM), 15 µl L-Arginin (2,5 mM) und 15 µl Diclofenac (10 mM) steigt wieder die Ratio sowohl von VASP-Serin 239 auf 16,7 % als auch von VASP-Serin 157 auf 12,3 %. Eine alleinige Inkubation der Zellen mit 15 µl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (200 mM) bewirkt eine Abnahme der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 auf 10,5 %, während die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 eine Zunahme auf 16,8 % zeigt. Gibt man zusätzlich 15 µl L-Arginin (2,5 mM) und 15 µl L-NAME (100 mM) dazu, nimmt die Ratio von VASP-Serin 239 auf 13,9 % zu, im Gegensatz dazu verringert sich die Ratio von VASP-Serin 157 auf 12,9 %. Unter zusätzlicher Wirkung von Diclofenac steigt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 bzw. VASP-Serin 157 auf 19,4 % bzw. 18,6 %.



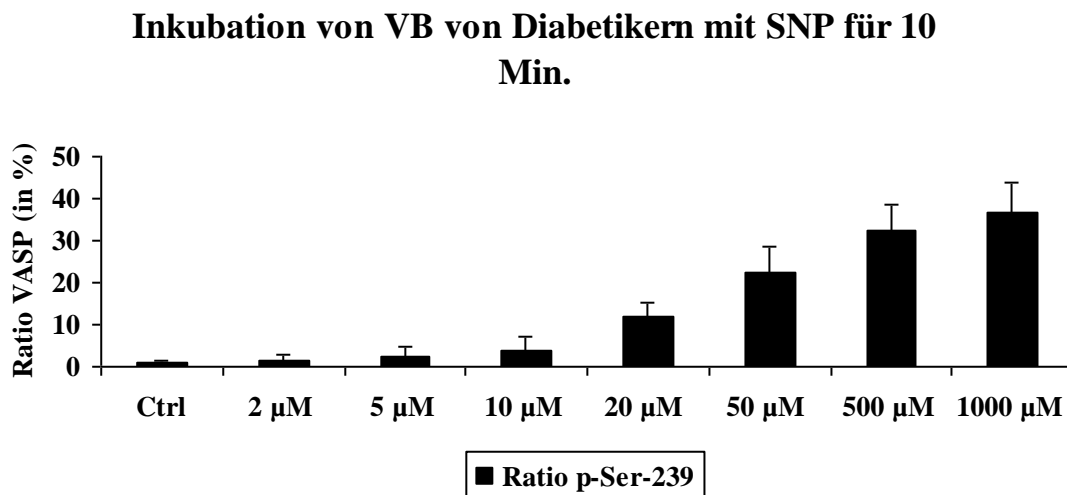
Grafik 3.28: Eine Koinkubation von WP und EC mit verschiedenen Substanzen, die sowohl Thrombozytenaktivierung als auch Thrombozytenhemmung fördern.

3.7. Diabetes Studie

3.7.1. Inkubation von Vollblut von Diabetikern mit SNP

Einen Anstieg der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 gegenüber der Kontrolle stellt man bereits unter Wirkung von 2 μM SNP fest (Grafik 3.29). Bei Erhöhung der SNP-Konzentration auf 10 μM erfolgt eine langsame aber kontinuierliche Zunahme der Ratio (2,5 % bei 5 μM , 3,9 % bei 10 μM). Eine steile Zunahme der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 erzielt man ab Inkubation mit 20 μM SNP. Die Ratio verdreifacht sich im Vergleich zu der von 10 μM auf 12,1 %. Erhöht man die SNP-Konzentration auf 50 μM , nimmt der phosphorylierte Anteil von VASP-Serin 239 auf 22,3 % zu. Eine zehnfache Erhöhung der SNP Konzentration auf 500 μM bewirkt eine

Steigerung der Ratio um 10,1 % auf 32,4 %. Die höchste Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 (36,8 %) wird unter Wirkung von 1000 μ M SNP erreicht.



Grafik 3.29: Mit ansteigender SNP-Konzentration steigt die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 kontinuierlich an. Den deutlichsten Effekt erzielt man mit 1000 μ M SNP. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dar, die aus zwölf Experimenten ermittelt werden.

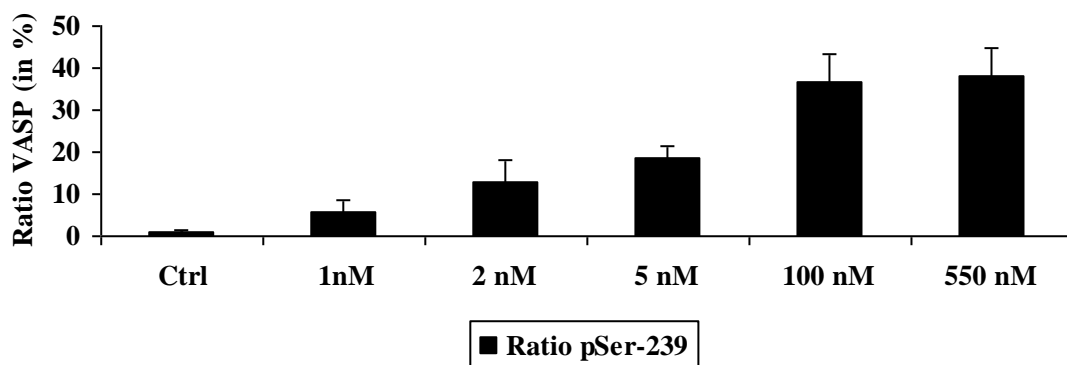
3.7.2. Inkubation von Vollblut von Diabetikern mit Iloprost

Unter Wirkung von Iloprost bei ansteigender Konzentration zeigt die Phosphorylierung von VASP-Serin 157 fast den gleichen Verlauf wie unter Wirkung von SNP (Grafik 3.30).

Der erste Anstieg der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 gegenüber der Kontrolle erzielt man bereits mit 1 nM Iloprost. Dabei wird gezeigt, dass 5,6 % der VASP-Serin 239 in phosphoryliertem Zustand vorliegen. Bei Erhöhung der Iloprost-Konzentration auf 2 nM verdoppelt sich die Rate auf 12,7 %. Diese langsame und kontinuierliche Zunahme der Rate beobachtet man bis zu einer Iloprost-Konzentration von 5 nM, bei der 18,8 % von VASP Serin 239 phosphoryliert vorliegen. Inkubiert man nun das Vollblut von Diabetikern mit 100 nM Iloprost, stellt man einen sprunghaften

Anstieg der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 auf 36,6 % fest. Eine weitere Erhöhung der Iloprost-Konzentration auf 550 nM zeigt nur eine unwesentliche Zunahme der Phosphorylierungsrate von 1,5 % auf 38,1 %.

Inkubation von VB von Diabetikern mit Iloprost für 2 Min.



Grafik 3.30: Man stellt unter Wirkung von 100 nM Iloprost eine sprunghafte Zunahme der Phosphorylierungsrate an VASP-Serin 239 fest. Die größte Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 wird aber erst bei der Inkubation mit 550 nM Iloprost erreicht. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten und den Standardabweichungen von zwölf Versuchen.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der Vasodilatoren

4.1.1 Natrium Nitroprussid (SNP)

4.1.1.1 Vergleich der Phosphorylierungsrate von Serin 239 (pSer-239) und Serin 157 (pSer-157) in gewaschenen Thrombozyten (WP) unter Wirkung von 5 μ M SNP

Bei pSer-239 (**Kap. 3.1.1, Grafik 3.1**) zeigt sich im Zeitintervall von 0–60 Sekunden keine relevante Änderung im Vergleich mit der Kontrolle, in den folgenden 30 Sekunden hingegen ist ein relativ steiler Anstieg zu verzeichnen, welcher sich zwischen 90 und 120 Sekunden etwas verringert. Zwischen 120 und 180 Sekunden ist der Zustand plateauartig ohne signifikante Änderung, ab 180 bis 600 Sekunden kann man einen exponentiellen Anstieg erkennen. Die höchste Phosphorylierungsrate von Serin 239 wird bei 600 Sekunden erreicht (81,4 %).

Im Vergleich dazu kann man aus der Grafik der Phosphorylierungsrate von Serin 157 (**Kap. 3.1.1, Grafik 3.2**) folgendes ersehen: Bereits bei 30 Sekunden liegt die Ratio leicht über der Kontrolle, steigt im Intervall von 30-120 Sekunden konstant an, um in dem Zeitraum von 120–180 Sekunden kurzfristig noch stärker anzusteigen. Im Zeitintervall von 180–300 Sekunden steigt die Ratio erneut an, jedoch etwas geringer, beginnt jedoch danach erstmals abzufallen. Das Maximum liegt bei 300 Sekunden (34,9 %).

Fazit: Die beiden Grafiken korrelieren allenfalls bedingt bis 300 Sekunden, danach divergieren sie stark, und verhalten sich sogar entgegengesetzt (ein exponentieller Anstieg im Zeitintervall von 300–600 Sekunden bei pSer-239, bei pSer-157 hingegen währenddessen ein leichter Abfall). Es ist zu konstatieren, dass VASP an Serin 239 mehr phosphoryliert und langsamer dephosphoryliert wird als Serin 157.

SNP als NO-Donor ist von Bedeutung bei der Hemmung der Thrombozytenaktivität. Diese wird durch Aktivierung von löslicher Guanylatzyklase (sGC) initiiert.

Die paramagnetische Eigenschaft von NO-Molekülen erklärt die hohe Affinität für Hämeisen. Die wichtigste NO-Häm-Interaktion ist die Interaktion des NO-Moleküls mit löslicher Guanylatzyklase im Zytosol. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase durch direkte Bindung an Fe^{2+} unter Bildung des Eisen-Nitrosyl-Häm-Komplexes, der die katalytische Domäne des Enzyms aktiviert und somit zu einer gesteigerten Synthese des *Second-Messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) führt (Stone und Marletta, 1996). Die Bindung von cGMP aktiviert die cGMP abhängigen Proteinkinasen I und II (cGK bzw. PKG I und II), die eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren. Eine Folge von diesem Phosphorylierungsvorgang ist die Umverteilung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, die zur Reduktion des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels führt und somit zur NO-induzierten Hemmung der Thrombozytenaggregation (Gewaltig *et al.*, 2002).

Ein anderes Protein, das durch PKG I bzw. cGK I phosphoryliert wird, ist das vasodilatatorstimulierte Phosphoprotein (VASP). Die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 und 239 reduziert seine Bindung an Aktinfilamente, woraufhin die Plättchenaktivierung inhibiert wird. Außerdem wird der Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein $\alpha_{\text{IIb}\beta_3}$) durch VASP-Phosphorylierung gehemmt.

Drei Phosphorylierungsstellen des VASPs wurden identifiziert: Serin 157, Serin 239 und Threonin 278. Die cGK I phosphoryliert VASP an zwei Stellen, an Serin 239 und Serin 157. VASP an Serin 239 aber stellt die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der cGK I dar. PKA bzw. cAK hingegen phosphoryliert bevorzugt Serin 157. Threonin 278 wird von beiden Kinasen nur schlecht phosphoryliert (Butt *et al.*, 1994). Die stärkere Phosphorylierung von VASP an Serin 239 im Vergleich zu Serin 157 lässt sich bei dem Versuch hierdurch erklären.

Die Phosphorylierung von VASP wird aus diesem Grund als biochemischer Marker für die Aktivierung von NO/PKG- bzw. Prostazyklin/PKA- Signalweg verwendet.

4.1.1.2 Vergleich der Wirkung von SNP in Vollblut (VB) und in gewaschenen

Thrombozyten (WP) anhand der VASP-Phosphorylierungsrate an Serin 239

Vergleicht man nun die Mittelwerte der VASP Ratio von pSer-239 in Abhängigkeit der zugegebenen Konzentration von SNP, so zeigt sich anhand der empirisch ermittelten Daten mindestens bis zur Konzentration von 100 μM SNP eine direkte Proportionalität (**Kap. 3.1.1, Grafik 3.3** und **Kap. 3.1.2, Grafik 3.5**). Jedoch liegt bei gewaschenen Thrombozyten in der ganzen Messreihe stets die VASP-Phosphorylierungsrate an Serin 239 über der des Vollbluts. Man kann folgern, dass das Maximum der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 im Vollblut (**Kap. 3.1.2, Grafik 3.5**) bei einer Konzentration von 500 μM (43,2 %) liegt, und der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate in gewaschenen Thrombozyten bei 100 μM (96,4 %) (**Kap. 3.1.1, Grafik 3.3**).

Anhand beider Grafiken wird im Nachhinein deutlich sichtbar, dass bei gleichen Konzentrationen die Ratio des pSer-239 bei gewaschenen Thrombozyten immer deutlich über der von Vollblut liegt.

NO ist ein sehr kleines, lipophiles Molekül, das rasch durch die biologischen Membranen diffundieren kann. Intrazellulär reagieren NO-Moleküle rasch mit Häm-enthaltenen Proteinen wie z. B. zytosolische Guanylatzyklase und Hämoglobin. Die geringe Bioverfügbarkeit von NO in Vollblut hat ihre Ursache in der hohen Affinität von NO an Hämoglobin. NO reagiert mit Hämoglobin zu Nitrosyl-Hämoglobin (NOHb), das zu Nitrit- bzw. Nitrationen (NO_2^- bzw. NO_3^-) oxidiert, und ins Serum abgegeben wird. Außerdem interagieren NO-Moleküle mit anderen Häm-enthaltenden Proteinen, wie z. B. Interaktion mit Myoglobin und Enzymen, welche Eisen-Schwefel-Bindung enthalten (Yoshida *et al.*, 1980). Diese Interaktion von NO-Molekülen mit anderen Proteinen findet bei der Inkubation in gewaschenen Thrombozyten nicht statt. Die kontinuierlich größere Phosphorylierungsrate beider Serine bei den gewaschenen Thrombozyten hat ihre Ursache darin, dass in diesem Fall eine höhere Bioverfügbarkeit von NO vorliegt, welche einen langsameren Abbau von NO mit sich bringt.

4.1.2 NOC-9

4.1.2.1 Vergleich der Phosphorylierungsrate von Serin 239 (pSer-239) und Serin 157 (pSer-157) in Vollblut unter Wirkung von 10 μ M NOC-9

Bei der Phosphorylierung von pSer-157 durch 10 μ M NOC-9 ist im Zeitraum bis 30 Sekunden kaum ein Anstieg gegenüber der Kontrolle erkennbar, danach steigt die Ratio im Zeitintervall im Zeitraum von 30–120 Sekunden an, erreicht den Höhepunkt bei 120 Sekunden (11,1 %) und fällt danach ab, zuerst bis 180 Sekunden gering, danach stärker (**Kap. 3.2.2, Grafik 3.11**).

Das pSer-239 wird bei einer Konzentration von 10 μ M im Zeitraum von 0–120 Sekunden zunehmend phosphoryliert. Das Maximum wird bei 120 Sekunden (37,5 %) erreicht und fällt danach wieder ab (**Kap. 3.2.2, Grafik 3.12**).

Vergleicht man nun die beiden Grafiken miteinander, so kann man nahezu eine Korrelation feststellen, Anstieg bis 120 Sekunden und Abfall danach sind identisch, lediglich die Ratio des pSer-157 steigt erst ab 30 Sekunden signifikant, die des pSer-239 schon von Beginn der Messung an. Aus den Kurven (**Kapitel 3.2.2, Grafik 3.11 und 3.12**) ist ersichtlich, dass Serin 239 unter Wirkung von 10 μ M NOC-9 insgesamt mehr phosphoryliert wird als Serin 157. Außerdem zeigt pSer-239 eine viel höhere Phosphorylierungsrate im Maximum (bei 120 Sekunden) als pSer-157. Bei einer weiteren Messung der Phosphorylierung von pSer-239 über einen deutlich längeren Zeitraum von 900 Minuten lässt sich noch Folgendes erkennen: In der Zeit 300–420 Sekunden bleibt die Ratio nahezu konstant. Im Zeitintervall von 420–600 Sekunden fällt sie sichtbar ab, um schließlich bis 900 Sekunden wieder beinahe konstant zu bleiben.

Wie oben schon ausführlich beschrieben, dass NO die lösliche, zytosolische Guanylatzyklase aktiviert. Dabei wird Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (GMP) umgewandelt. NOC-9 als einer von NO-Donoren hat eine analoge Wirkung wie SNP. NOC-9 inhibiert die Plättchenaggregation durch die Aktivierung der NO-cGMP-Signalkaskade. cGMP aktiviert wiederum PKG bzw. cGK I und II. Die Proteinkinase G (PKG bzw. cGK) phosphoryliert verschiedene Zielproteine. Eines von diesen Zielproteinen ist das VASP. VASP an Serin 239 ist die bevorzugte

Phosphorylierungsstelle von cGK I bzw. PKG I. Dies erklärt der deutlich stärkere Anteil von Phosphoserin 239 am Gesamt-VASP bei der Messung, verglichen mit Phosphoserin 157.

4.1.2.2 Vergleich der Wirkung von NOC-9 in Vollblut (VB) und in gewaschenen Thrombozyten (WP) anhand der VASP-Phosphorylierungsrate an Serin 239

Trotz Erhöhung der Konzentration des NOC-9 bleibt die Phosphorylierung des Ser-239 bis ca. 500 nM plateauartig auf gleichem Niveau, jedoch ab einer Konzentration von ca. 1000 nM (1 μ M) steigt die Ratio konstant an um schließlich bei 50 μ M den Höchstwert zu erreichen (48,3 %) und anschließend leicht zu fallen (**Kap. 3.2.2, Grafik 3.14**).

Ein ähnlicher Trend ist auch in der Ratio der gewaschenen Thrombozyten zu erkennen, jedoch gibt es hier zu Beginn der Messreihe keinen plateauartigen Zustand (**Kap. 3.2.1, Grafik 3.10**). Bei zunehmender Konzentration steigt die Ratio von Beginn der Messung deutlich konstant an und scheint, wie erwartet, bei 100 nM (0,1 μ M) ihr Maximum zu erreichen (99,6 %). Es ist zu konstatieren, dass bei den gewaschenen Thrombozyten die Phosphorylierungsrate des VASP an Serin 239 deutlich höher liegt als in Vollblut, und ebenfalls den Anstieg deutlich schneller erfährt.

Wie schon oben erwähnt (s. **Kap. 4.1.1.2**) ist erkennbar, dass die höhere Phosphorylierungsrate beider Serine bei der Inkubation in gewaschenen Thrombozyten in Vollblut darauf beruht, dass die Bioverfügbarkeit von NO-Molekülen dort größer ist. In gewaschenen Thrombozyten finden weniger Proteininteraktionen mit NO-Molekülen statt, welche die Bioverfügbarkeit von NO-Molekülen vermindern können.

4.1.3 Vergleich der Wirkung von SNP und NOC-9 in gewaschenen Thrombozyten (WP) anhand der Phosphorylierungsrate von pSer-239

Nach Zugabe von SNP steigt die Ratio langsam über der gesamten Messreihe relativ konstant über den ganzen Zeitraum (20 Minuten) an. Nach einer Minute Inkubation mit 10 μM zeigt der erste Anstieg betreffs der Kontrolle (**Kap.3.1.1, Grafik 3.4**). Der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate wird nach zehn Minuten Inkubation erreicht (44,5 %).

Unter Zugabe von NOC-9 hingegen ist bereits nach kurzer Zeit (nach 10 Sekunden) ein deutlicher Anstieg der Ratio zu verzeichnen, der plateauförmig nivelliert und nach 5 Minuten leicht abzunehmen scheint. Das Maximum wird nach einer Inkubationszeit von einer Minute erreicht (44,8 %) (**Kap. 3.2.1, Grafik 3.9**).

Deutlich sichtbar aus den Experimenten wird die schnelle transiente NO-Bildung unter Zugabe von NOC-9, ebenso die langsame aber stetige NO-Bildung unter SNP. Leider liegen keine längeren Messdaten vor.

Diese Langzeitwirkung von SNP beruht auf der Tatsache, dass Natrium- Nitroprussid (SNP) zu den S-nitrosierenden Substanzen gehört. SNP ist in der Lage, die oxidierte Form von NO (NO^+) freizusetzen, die anschließend zu den SH-Gruppen von Cysteinresten im Gewebe übertragen werden. Diese S-Nitrosierung von Cysteinresten dient als lokales NO-Depot in Arterien Geweben, aus denen bioaktive NO-Moleküle langsam freigesetzt werden können (Broillet, 1999). Theoretisch entfalten die freigesetzten NO-Moleküle ihre Wirkung sowohl via cGMP, als auch unabhängig davon. Das Vorkommen von Proteinen, die an den Cysteinresten S-nitrosiert werden, wurde bereits von einigen Autoren fachlich beschrieben. Diese befinden sich auf der Außenseite der Plasmamembran oder in der extrazellulären Matrix. Andere Mechanismen, die auch zur Langzeitwirkung von SNP beitragen, wurden von einigen Autoren in deren Studien aufgezeigt. Diese Mechanismen schließen den cGMP-unabhängigen Weg ein. Nozik-Grayck *et al.*, 2002 bewiesen, dass der 5-HT₂ Rezeptor durch S-Nitrosierung chemisch modifiziert wird. Dadurch wird die vasokonstriktorische Wirkung von

5- Hydroxytryptamin (5-HT) inhibiert. Außerdem spielt die Aktivierung von K^+ - Kanälen durch Transnitrosierung eine Rolle (Da Silva-Santos *et al.*, 1999).

4.1.4 Natriumnitrit

4.1.4.1. Deutung und Wirkung der Zugabe von Na-Nitrit von pSer-239 und pSer-157 für zehn Minuten

Bei zunehmender Konzentration von Na-Nitrit steigt die Phosphorylierung der pSer-239 lediglich schwach, aber ziemlich konstant an. Parallel dazu ist bei pSer157 bis zu einer Konzentration von 10 μ M ebenfalls ein Anstieg zu erkennen, bei höherer Konzentration jedoch lässt sich ein geringer, aber nicht signifikanter Rückgang erkennen (**Kap. 3.3.1, Grafik 3.15**). Bei einer höheren Konzentration des Na-Nitrits steigt die Phosphorylierung von pSer-239 weiterhin sehr schwach, aber konstant an (**Kap. 3.3.1, Grafik 3.16**). Die Ratio von pSer-157 hingegen bleibt trotz deutlicher Konzentrationserhöhung des Na-Nitrits konstant.

Anhand der Messung der Phosphorylierungsrate von VASP an Serin 239 und Serin 157 kann man die Wirkung von Na-Nitrit als NO-Donor nicht eindeutig erkennen. Es lässt sich feststellen, dass Na-Nitrit wenig oder kein Stickstoffmonoxid freisetzt.

4.1.5 Iloprost

4.1.5.1 Vergleich der Phosphorylierungsrate von Serin 239 (pSer-239) und Serin 157 (pSer-157) in den gewaschenen Thrombozyten (WP) unter Wirkung von Iloprost

Bis zum Zeitpunkt von 30 Sekunden ist die Phosphorylierung des Ser-239 durch 2 nM Iloprost im Vergleich zur Kontrolle nahezu identisch. Danach ist bis zum Ablauf von 90 Sekunden ein sprunghafter Anstieg der Ratio zu erkennen, welcher sich bis zum Ende der Messreihe – bei 600 Sekunden – in einen konstanten, leichten Anstieg ändert. Der Höhepunkt wird bei 600 Sekunden erreicht (81,9 %) (**Kap. 3.4.1, Grafik 3.18**).

Das Ser-157 ist bereits nach 30 Sekunden phosphoryliert, ab 60 Sekunden steigt sie nur noch wenig an, bis sie schließlich bei 300 Sekunden ihr Maximum (60,1 %) erreicht, um danach wieder leicht abzufallen. Der letzte Messwert der Ratio bei 600 Sekunden (55,9 %) liegt etwas unter dem bei 300 Sekunden (**Kap. 3.4.1, Grafik 3.19**).

Iloprost, ein stabiles Prostazyklinanalogon, hat eine vergleichbare pharmakodynamische Wirkung wie Prostazyklin (PGI₂) aufgrund ähnlicher Molekülstruktur. Prostazyklin ist der potenteste endogene Thrombozytenaggregationsinhibitor. Iloprost bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und eine Aktivierung der Adenylatcyclase via Rezeptorbindung (IP-Rezeptor). Die Bindung von Prostazyklin bzw. Iloprost am IP-Rezeptor löst eine Konformationsänderung in der intrazellulären Domäne des Rezeptors aus, die seine Wechselwirkung mit dem zweitem Protein in der Signalübertragungskette beeinflusst, einem stimulierenden G-Protein oder G_s auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Der aktivierte IP-Rezeptor geht mit G_s eine Wechselwirkung ein und katalysiert den Austausch von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP), wodurch G_s in seine aktive Form überführt wird. Aktives G_s stimuliert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) in der Plasmamembran durch das Enzym Adenylatzyklase. Der second messenger cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA bzw. cAK). Diese kann – ähnlich dem cGK – über eine Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine eine Hemmung der Thrombozytenaktivität bzw. eine Relaxation der glatten Muskelzelle bewirken (Shaul *et al.*, 1992). Die Phosphorylierung von ABP (actin binding protein) und Caldesmon durch cAK/PKA stabilisiert das intrazelluläre Zytoskelett, das zur Stabilisierung des intrazellulären Gerüsts beiträgt. Die Reduktion des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels – durch Phosphorylierung von IP₃-Rezeptor – führt zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die Inhibition der Thrombozytenaktivierung kann außerdem durch VASP-Phosphorylierung vermittelt werden (Schwarz *et al.*, 2001).

PKA bzw. cAK phosphoryliert VASP sowohl an Serin 239, als auch Serin 157, bevorzugt aber Serin 157. Aus den Experimenten und Messreihen lässt sich zwar eine etwas höhere VASP-Phosphorylierungsrate an Serin 239 als der an Serin 157 feststellen, aber die Phosphorylierungsrate von Ser-239 steigt langsamer an. Dieser Unterschied lässt

sich dadurch erklären, dass das Verhältnis von 5C6/IE273 und 16C2/IE273 nicht nur von der Phosphorylierung sondern auch der Antikörperbindung abhängt. Darin könnte die Ursache der etwas stärkeren VASP-Phosphorylierung an Serin 239 – verglichen mit Serin 157 – bestehen.

4.1.5.2 Vergleich der Wirkung von Iloprost in gewaschenen Thrombozyten und in Vollblut anhand der Phosphorylierungsrate von Serin-239 (pSer-239)

Bei beiden Messreihen, sowohl in Vollblut als auch in den gewaschenen Thrombozyten, steigt die Phosphorylierungsrate bei zunehmender Konzentration von Iloprost (bis 100 nM) konstant an. Jedoch ist deutlich erkennbar, dass die Phosphorylierungsrate von VASP an Serin 239 in Vollblut (**Kap. 3.4.2, Grafik 3.21**) deutlich unter der in den gewaschenen Thrombozyten (**Kap. 3.4.1, Grafik 3.20**) liegt. Bei jeweils 100 nM Iloprost beträgt die Ratio im Vollblut 47,5 %, bei gewaschenen Thrombozyten liegt sie deutlich höher, nämlich bei 75,0 %.

Über die Bindung an IP-Rezeptor stimuliert Prostazyklin die Adenylatzyklase, woraus eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes resultiert. Iloprost hat aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur ebenfalls eine hohe Affinität zum IP-Rezeptor und eine vergleichbare pharmakodynamische Wirkung. Die Inaktivierung von Prostaglandin und seinem Analogon (Iloprost) erfolgt sehr rasch durch verschiedene intrazelluläre Enzyme, insbesondere durch 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase und die Δ 13-Reduktase. Die höchste PG-Dehydrogenaseaktivität findet man in der Lunge, der Milz und in den Nieren, die höchste Reduktaseaktivität im Fettgewebe. Iloprost wird als lipophiles Molekül im Vollblut an Lipiden absorbiert. Dies erklärt die geringere Bioverfügbarkeit von Iloprost in Vollblut im Vergleich zu gewaschenen Thrombozyten. Die Halbwertszeit von Iloprost beträgt 30 Minuten. Die Substanz wird über β -Oxidation der Carboxylseitenkette metabolisiert (Mutschler *et al.*, 2009).

4.1.6. Prostazyklin (PGI₂)

4.1.6.1 Vergleich der Phosphorylierungsrate von Serin 239 (pSer-239) und Serin 157 (pSer-157) in gewaschenen Thrombozyten (WP) unter Wirkung von Prostazyklin (PGI₂)

Bis ca. 30 Sekunden bleibt die Phosphorylierung an Serin-239 im Vergleich zur Kontrolle konstant. Anschließend ist ein leichter, gleichmäßiger Anstieg zu erkennen (**Kap. 3.5.1, Grafik 3.22**). Das endgültige Plateau, das Maximum der Phosphorylierungsrate, ist bei 300 Sekunden (13,0 %) erreicht. Bis 30 Sekunden bleibt die Phosphorylierung am Ser 157 ebenfalls konstant auf dem Basalspiegel. Nach 30 Sekunden jedoch steigt die Phosphorylierung steil an. Sie findet ihren Höhepunkt bei 120 Sekunden (29,6 %), und fällt danach bis zum Ende der Messung (bei 300 Sekunden) ab.

Vergleicht man die beiden Kurven, so zeigt sich zu Beginn der Messung eine relative Äquivalenz, welche jedoch nach 30 Sekunden endet. Ab diesem Zeitpunkt ist der große Gradient der Ratio, sowie der unterschiedliche Verlauf der Kurve deutlich ersichtlich. Anhand der Messung der Phosphorylierungsrate beider Serine lässt sich eindeutig erkennen, dass VASP an Serin 157 deutlich bevorzugt phosphoryliert wird, verglichen mit Serin239. Das körpereigene Prostazyklin wirkt stark vasodilatierend und thrombozytenaggregationshemmend (seine hemmende Wirkung korreliert mit der Phosphorylierung von VASP). Prostazyklin wird im Gefäßendothel durch Prostazyklin-Synthase gebildet. Seine Wirkungen kommen durch Stimulation von IP-Rezeptoren und der Aktivierung von Adenylatzyklase zustande. Es wird durch Aktivierung der Prostazyklin/PKA bzw. cAK-Signalkaskade mehr VASP an der Stelle von Serin 157 als an der von Serin 239 phosphoryliert. Der Rückgang des Anteils von Phosphoserin157 am Gesamt-VASP nach 120 Sekunden (zwei Minuten) beruht auf der kurzen Halbwertszeit von Prostazyklin. Prostazyklin wird rasch – mit einer Halbwertszeit von ca. zwei bis drei Minuten – biotransformiert. Die bereits nicht mehr aktiven Primärmetaboliten werden wie andere Fettsäuren durch β -Oxidation weiter abgebaut (Mutschler *et al.*, 2009). Diese Beobachtung stimmt mit den Erwartungen überein.

4.1.7 Vergleich der Wirkung von Iloprost und Prostazyklin (PGI₂) in gewaschenen Thrombozyten

Die Phosphorylierung am Ser-239 durch Prostazyklin (**Kap. 3.5.1, Grafik 3.22**) oder Iloprost (**Kap. 3.4.1, Grafik 3.18 und 3.19**) bleibt bis 30 Sekunden identisch mit der Kontrolle. Anschließend ist ein leichter, nicht sehr markanter, aber trotzdem stetiger Anstieg bis zum Zeitpunkt von 180 Sekunden zu verzeichnen. Die Phosphorylierungsrate verweilt schließlich bis zum Ende der Messung (bei 300 Sekunden) auf dem Plateaumaximum (bei 13,0 %). Signifikant ist, dass die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 der Inkubation mit Prostazyklin (PGI₂) stets deutlich unter der des Iloprosts liegt. Bei Inkubation mit letzterem erfolgt der Anstieg der Ratio 30 Sekunden früher, verläuft ansonsten aber äquivalent. Unübersehbar ist die im gesamten Kurvenverlauf deutlich höhere Ratio der Inkubation mit Iloprost im Vergleich mit Prostazyklin (PGI₂). Der Höhepunkt der Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 239 (bei 81,9 %) unter Wirkung von Iloprost wird nach 600 Sekunden Inkubationszeit erreicht.

Die Phosphorylierung von Serin 157 verhält sich unterschiedlich. Nach Zugabe von Iloprost kann nach Ablauf von 30 Sekunden ein signifikanter Anstieg der Ratio beobachtet werden, der jedoch ab 180 spätestens 300 Sekunden plateauartig auf dem Maximum (60,1 %) nivelliert. Ab 300 Sekunden beginnt ein leichter Abfall der Ratio.

Während der Inkubationszeit nach Zugabe von Prostazyklin (PGI₂) liegt ab 30 Sekunden ein nahezu exponentieller Anstieg der Ratio vor, der insbesondere nach 180 Sekunden teil abfällt. Das Maximum liegt nach 120 Sekunden-Inkubationszeit bei 29,6 %. Die Phosphorylierungsrate von VASP-Serin 157 nach Zugabe von Prostazyklin (PGI₂) liegt während der gesamten Versuchsdauer deutlich unter der nach Zugabe von Iloprost. Die VASP-Phosphorylierungsrate sowohl an Serin 239 als auch Serin 157 nach Zugabe von Iloprost ist während der gesamten Dauer der Versuche nahezu doppelt so groß wie nach Zugabe von Prostazyklin (PGI₂).

Der Grund für diese Verläufe der jeweiligen Rationes liegt darin, dass Prostazyklin (PGI₂) als ein starker Vasodilator mit nur kurzer Halbwertszeit von nur 2–3 Minuten fungiert und deshalb ein Prostazyklin Analogon, nämlich eben jenes Iloprost mit einer

um den Faktor 10 längeren Halbwertszeit, entwickelt wurde. Die wirksame Bioverfügbarkeit liegt somit zwischen 60–90 Minuten. Prostazyklin hingegen wirkt nur etwa 15 Minuten. Aufgrund der kurzen terminalen Halbwertszeit (Eliminationshalbwertszeit) des Prostazyklins war es von Nöten, ein länger wirkendes Derivat – eben Iloprost – zu entwickeln. Ein schneller Abbau nach Erreichen des steady-state wird somit effizient vermieden.

4.2 Koinkubation mit Endothelzellen

4.2.1 Einfluss von Ca^{2+}/Mg^{2+} nach Zugabe zu gewaschenen Thrombozyten (WP) und Endothelzellen (EC)

Bei der Koinkubation von Endothelzellen (EC) und gewaschenen Plättchen (WP) mit Ca^{2+} und Mg^{2+} kann man sehen, dass nach 10 Minuten die Ratio von pSer-239 um den Faktor 3 gestiegen ist (von 9,2 % bei der Kontrolle auf 34,9 %) (**Kap. 3.6.1, Grafik 3.24**). Nach der gleichen Zeit und Koinkubation von EC, WP mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und LNMMA (NO-Synthase-Inhibitor) ist der Anstieg geringer, am kleinsten ist er nach Inkubation von EC, WP mit EDTA (13,1 %).

Nach erneutem Versuch mit denselben Substanzen (**Kap. 3.6.1, Grafik 3.24**), wobei lediglich das Zeitintervall verdoppelt wird (auf 20 Minuten), zeigt die Phosphorylierung nach Koinkubation mit EC den höchsten Wert (94,3 %). Die Ratio nach Koinkubation von EC, WP mit LNMMA ist unverändert im Vergleich zu der Messung nach 10 Minuten, ebenfalls die Koinkubation von EC, WP mit EDTA.

Nach 10 Minuten Koinkubation von EC, WP mit Ca^{2+} , Mg^{2+} zeigt die Phosphorylierungsrate von pSer-157 einen Anstieg verglichen mit der Kontrolle (von 5,6 % auf 41,2 %) (**Kap. 3.6.1, Grafik 3.24**). Eine zusätzliche Zugabe von LNMMA bringt wenig Veränderung der Phosphorylierungsrate. Die Phosphorylierungsrate unterscheidet sich nur geringfügig nach 10 und 20 Minuten Koinkubation von EC, WP mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , ebenfalls nach Zugabe von LNMMA. Etwas geringer ist die Ratio nach Koinkubation

von EC, WP mit EDTA. Trotzdem zeigt sich kein Unterschied der Ratio zwischen 10 und 20 Minuten Inkubationszeit.

In einem anderen Versuch (**Kap. 3.6.1, Grafik 3.25**) werden Inhibitoren wie z. B. L-NAME (NO-Synthase Inhibitor), CAY 10441 (Prostacyclin Antagonist), AH 6809 (Prostanoidrezeptor inhibitor) mit einbezogen. Die Phosphorylierungsrate beider Serine (Serin 239 und Serin 157) werden nach Inkubation mit sowohl stimulierenden Substanzen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , L-Arginin), als auch Inhibitoren (EDTA, L-NAME, AH 6809, und CAY 10441) verglichen. Auffallend bei dem Versuch ist, dass die Koinkubation von EC, WP mit stimulierenden Substanzen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , L-Arginin) die höchste Phosphorylierungsrate im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Dabei lässt sich außerdem feststellen, dass die Phosphorylierungsrate von pSer-239 im Vergleich zu der von pSer-157 weit höher liegt (51,8 % bei pSer-239 und 41,7 % bei pSer-157). Die DMSO Kontrolle zeigt keine Veränderung dieser hohen Phosphorylierungsrate beider Serine. Bei diesen Versuchen lag die Inkubationszeit stets bei zwei Minuten.

Nach Verlängerung der Inkubationszeit auf fünf Minuten (**Kap. 3.6.1, Grafik 3.26**) kann man folgendes ersehen: Die geringste Ratio liegt bei Koinkubation von EC, WP mit Inhibitoren (EDTA, L-Name, L-Arginin, AH 6809, und CAY 10441), 5,4 % bei pSer-239 und 6,1 % bei pSer-157. Eine etwas höhere Ratio finden wir bei der Koinkubation von EC, WP mit L-Arginin, Ca^{2+} , Mg^{2+} , AH 6809. Die Phosphorylierungsrate beträgt 29,7 % bei pSer-239 und 27,8 % bei pSer-157. Die höchste Ratio liegt bei Inkubation von EC, WP mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , L-Arginin und DMSO vor (71,2 % bei pSer-239 und 46,5 % bei pSer-157).

Die Versuche zeigen, dass der intrathrombozytäre P-VASP-Level auffallenderweise durch NO-Sekretion aus den Endothelzellen beeinflusst wird. Die Phosphorylierung von VASP sowohl an Serin 239 als auch an Serin 157 läuft innerhalb der Thrombozyten unter Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade ab. Durch Gabe von Substanzen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , L-Arginin wird die Synthese von NO-Molekülen in Endothelzellen induziert. Vermehrte endotheliale NO-Freisetzung korreliert mit VASP-Phosphorylierung an Serin 239 und Serin 157 in den Thrombozyten.

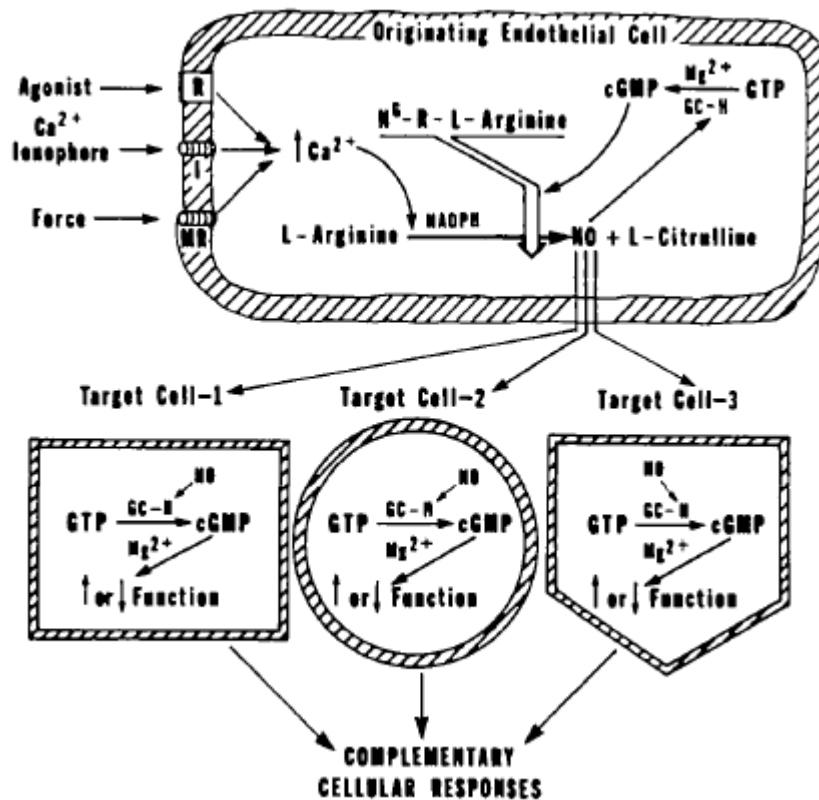


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung physiologischer NO-Synthese in der Endothelzelle. NO entfaltet ihre Wirkung in den Zielzellen durch Erhöhung des cGMP-Spiegels. Eine von den Zielzellen ist Thrombozyt (dargestellt in der Abbildung als Target Cell-2). Die intrazelluläre Aktivität in den Zielzellen wird somit durch NO beeinflusst (Ignarro, 1990).

NO wird nicht nur in Endothelzellen synthetisiert, sondern auch in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Hirngeweben und hepatischen Kupfferzellen. L-Arginin wird in den Endothelzellen in L-Citrullin und NO durch die induzierbare, zytosolische NADPH-abhängige Monoxygenase (NO-Synthetase) umgewandelt. NO-Synthetase zeigt eine basale, katalytische Aktivität in Abwesenheit von Ca²⁺. L-Arginin wird in die Endothelzelle durch Aminosäure-Carrier oder -Transporter aufgenommen. Ein erhöhter Ca²⁺-Spiegel stimuliert die NADPH-Monoxygenase und resultiert in vermehrter NO-Synthese. Die synthetisierten NO-Moleküle diffundieren in alle Richtungen aus den Endothelzellen und in alle Zellkompartimente in der Endothelzelle. Eine dieser Zellkompartimente ist das Lysosom. Dort reagiert NO mit Cysteinresten und bildet S-Nitrosocysteine (NO-Cys). Die S-Nitrosocysteine sind weniger lipophil als NO und werden in den Lysosomen gespeichert und diffundieren langsam aus den Lysosomen in

das Zytosol. Gesteigerter Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol und somit eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran und die Exozytose deren Inhalts (die S-Nitrosocysteine). Acetylcholin, Bradykinin oder Mobilisation des Ca^{2+} -Depots aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum können zu einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel. S-Nitrosocysteine spalten sich spontan im Extrazellularraum in NO und Cystein.

NO diffundiert aus den Endothelzellen in die Thrombozyten. Durch Bindung von NO-Molekülen an den Hämrest (Fe^{2+}) der löslichen Guanylatzyklase wird das Enzym aktiviert. Mg^{2+} spielt außerdem eine große Rolle bei der Umwandlung von Guanostriphosphat (GTP) in zyklisches Guanostmonophosphat (cGMP) durch Guanylatzyklase (GC). Der Aktivierung von Guanylatzyklase durch NO-Moleküle und Mg^{2+} folgt die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels. cGMP phosphoryliert wiederum verschiedene Proteine wie z. B. VASP. cGMP stimuliert außerdem die intrazelluläre Bindung an freien Ca^{2+} -Ionen. Dadurch wird die Induktion übermäßiger NO-Synthese unterdrückt, und die basale NO-Produktion trotzdem gewährleistet (Ignarro, 1990).

4.3 Vergleich der Wirkung von SNP auf gesunde und an Diabetes Mellitus erkrankte Probanden anhand der Phosphorylierung von Serin 239

Bei diesem Versuch (**Kap. 3.7.1, Grafik 3.29**) wird Vollblut gesunder Probanden und Blut an Diabetes Mellitus erkrankter Probanden eingesetzt. In beiden Fällen wird SNP 10 Minuten lang inkubiert und die VASP-Phosphorylierungsrate an Serin 239 bei verschiedenen Konzentrationen von SNP ermittelt.

Bei gesunden Probanden liegt die Ratio bei gleicher Konzentration von SNP stets höher als bei erkrankten Probanden. Bei gesunden Probanden erhöht sich die experimentell ermittelte Ratio in Form einer konvexen Kurve. Bei einer Konzentration von 500 μM

wird der Höhepunkt erreicht (43,2 %) und bei einer Konzentration von 1000 μM nimmt sie erstmals leicht ab (38,9 %). Hier enden die Messdaten.

Bei Diabetikern steigt die Phosphorylierungsrate von Serin 239 leicht konkav. Während bei gesunden Probanden die höchste Phosphorylierungsrate von Serin 239 bei 500 μM SNP bei 43,2 % erreicht wird, ergibt sich das Maximum bei erkrankten Probanden erst unter Wirkung von 1000 μM SNP. Es beträgt 36,8 %.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass deutlich mehr SNP bei Diabetikern inkubiert werden muss, um die gleichgroße Ratio der Phosphorylierung wie bei gesunden Probanden zu erzielen.

4.4 Vergleich der Wirkung von Iloprost auf gesunde und an Diabetes Mellitus erkrankte Probanden anhand der Phosphorylierung von Serin 239

Auch hier wird Blut gesunder und an Diabetes Mellitus erkrankter Probanden verwendet (**Kap. 3.7.2, Grafik 3.30**). Wie im Versuch mit SNP zeigt sich auch hier, dass die Phosphorylierungsrate bei Diabetikern signifikant unter der von gesunden Probanden liegt. Die Kurvenverläufe verhalten sich relativ analog zueinander, bei Nichtberücksichtigung geringer experimenteller Ungenauigkeiten. Während bei gesunden Probanden die höchste Phosphorylierungsrate von Serin 239 bei 200 nM erreicht wird (48,3 %), liegt das Maximum (38,1 %) bei erkrankten Probanden erst unter Wirkung von 550 nM. Aus den Versuchen wurde jedoch deutlich, dass Diabetiker zum Erreichen derselben Phosphorylierungsrate eine deutlich höhere Menge an Iloprost benötigen.

Einige Mechanismen sind für die reduzierte Sensibilität der Thrombozyten von Diabetikern gegenüber NO-Molekülen verantwortlich. Wirkschemata wurden von einigen Autoren wie folgt beschrieben:

A. Effekte auf die Endothelzellen

Gestörte Regulation von Calmodulin – wie schon unter Kapitel 1.2.3 erwähnt wurde:

Die Glykosylierung von Calmodulin (CaM) hemmt ihre Funktion als Aktivator für NO-Synthase. Eine reduzierte Aktivität der NO-Synthase bewirkt eine verminderte Synthese von NO-Molekülen und somit eine geringere Hemmung der Thrombozytenaktivität.

Die gesteigerte Bildung von Peroxynitriten (ONOO^-) durch Reaktion von NO-Molekülen mit Superoxidanionen trägt zur Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit bei den Diabetikern bei. Peroxynitrite (ONOO^-) sind als starker Oxidator bekannt. Diese begünstigen die Lipidperoxidation (Ox-LDL) und Modifikationsbildungen von Proteinen. Diese oxidierte LDL verringert die endotheliale Aufnahme von L-Arginin, was zur verminderten Aktivität der endothelialen NO-Synthase (NOS III) führt (Pollock *et al.*, 1986). Peroxynitrite (ONOO^-) oxidieren wiederum Tetrahydrobiopterin – den Cofaktor von NOS – zu Dihydrobiopterin. Diese indirekte Inaktivierung von NOS führt zur Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit bei Diabetikern (Francescutti *et al.*, 1996).

B. Effekte auf die Thrombozyten

Chronische Exposition von Thrombozyten gegenüber Hyperglykämie verursacht eine direkte Glykosylierung von NO-Synthase, und reduziert somit ihre Aktivität in Thrombozyten (nach Rabini *et al.*, 1998).

Francescutti *et al.*, 1996 haben beschrieben, dass Hyperglykämie eine direkte Wirkung auf die NO-Synthase hat. Während der Autooxidation von Glukose werden ROS (reactive oxygen species) wie Superoxide, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikalen gebildet (Baynes, 1991). NO-Moleküle werden durch Superoxidanionen (O_2^-) inaktiviert. Aufgrund dessen erhöhen die Superoxide (O_2^-) die NO-Clearance, welche zur reduzierten NO-Bioverfügbarkeit beiträgt.

Ein erhöhter Spiegel von Superoxidanionen bei Diabetikern führt zu gesteigerter Oxidation der löslichen Guanylatzyklase und zerstört dadurch die Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase. Demzufolge wird die Aktivierung dieses Enzyms durch die Bindung von NO-Molekülen an das Fe^{2+} des Hämproteins behindert. Diese Inhibition der NO/cGMP-Signalkaskade könnte als Ursache für die NO-Resistenz bei den Thrombozyten von Diabetikern gesehen werden (Rajendran *et al.*, 2008).

Fazit: Die Thrombozytenresistenz bei dem antiaggregatorischen Effekt von NO-Donoren (SNP und Iloprost) bei dem Diabetes-Versuch könnte durch zwei Mechanismen erklärt werden. Erstens durch die gesteigerte NO-Clearance aufgrund der Reaktion der NO-Moleküle mit O_2^- in Vollblut und zweitens durch die Inhibition löslicher Guanylatzyklase in den Thrombozyten bei chronischer Hyperglykämie.

5. Zusammenfassung

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente lässt sich feststellen, dass der VASP-POD-Assay eine sensitive Methode zur Erfassung der Aktivität humaner Thrombozyten ist. Mithilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion kann der hemmende Effekt zahlreicher Vasodilatoren auf Thrombozytenaktivität quantitativ *in vitro* erfasst werden.

VASP, das Zielantigen dieser Reaktion, spielt eine Schlüsselrolle. Der Phosphorylierungszustand dieses Proteins beeinflusst die Thrombozytenaktivierung bzw. Hemmung der Thrombozytenaktivität. Die Phosphorylierung von VASP wiederum bedingt sowohl eine intrazelluläre NO/cGMP- als auch PGI₂/cAMP-Signalkaskade. Die cAMP bzw. cGMP abhängigen Signalkaskaden können durch VASP-Phorylierung an Serin 157 und Serin 239 quantifiziert werden. Die Verwendung von mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörpern erlaubt eine quantitative Messung von Phospho-VASP Anteil am Gesamt-VASP. Diese markiert den phosphorylierten Serinrest des VASP. Ebengenanntes Verhältnis von Phospho-VASP zum Gesamt-VASP korreliert wiederum mit Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von vasodilatierenden Substanzen – wie z.B. NO und PGI₂ – kann durch die Messung der VASP-Phosphorylierung mithilfe VASP-POD-Assay quantifiziert werden. Diese Substanzen entfalten ihre Wirkung durch intrazelluläre Erhöhung von zyklischen Nukleotiden (cAMP und cGMP). Die thrombozytäre VASP-Phosphorylierung unter Wirkung von NO bzw. PGI₂ wurden *in vitro* in unterschiedlichen Bedingungen – sowohl in gewaschenen Thrombozyten als auch in Vollblut – ermittelt. Somit ist P-VASP als biochemischer Marker für das Monitoring der NO/cGMP- bzw. PGI₂/cAMP-Signalkaskade in humanen Thrombozyten geeignet.

Eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen kann außerdem mithilfe von VASP-POD-Assay ermittelt werden. In einem vereinfachten Modell des humanen, geschlossenen Kreislaufsystems wurden gewaschene Thrombozyten und Endothelzellen mit verschiedenen Substanzen, die endotheliale NO-Synthese stimulieren und somit die NO-Bioverfügbarkeit erhöhen, inkubiert. Die Erhöhung der extrazellulären NO-

Bioverfügbarkeit korreliert mit dem intrazellulären Anstieg des P-VASP Anteils am Gesamt-VASP in Thrombozyten. Durch die Messung der intrathrombozytären VASP-Phosphorylierung in VASP-POD-Assay kann man indirekt Rückschlüsse auf die Wirkung dieser Substanzen auf die Thrombozytenaktivität und die Interaktion zwischen humanen Thrombozyten und Endothelzellen ziehen. Zur Verifizierung der Empfindlichkeit dieser Analysenmethode wurde der VASP-Phosphorylierungsgrad von Thrombozyten gesunder Probanden mit der an Diabetes Mellitus erkrankten Probanden verglichen. Die gesteigerte Thrombozytenaktivität von erkrankten Probanden kann unter Verwendung dieses Verfahrens (VASP-POD-Assay) diagnostiziert und quantifiziert werden. VASP-Assay ermöglicht eine schnelle, leichte und reproduzierbare Quantifizierung der Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen.

Somit wird das gesetzte Ziel der Entwicklung dieser Messmethode erreicht, nämlich die Früherkennung gestörter Interaktion zwischen humanen Thrombozyten und Endothelzellen und folglich die pathologische Veränderung des Funktionszustandes humaner Thrombozyten bei Diabetes Mellitus in Frühstadium. Unter Berücksichtigung des thrombozytenaggregationshemmenden Effekts des P-VASP kann die Stimulation zur Phosphorylierung von VASP einerseits als protektive Maßnahme und andererseits als möglicher Angriffspunkt der zukünftigen Medikation betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

- Alhenc-Gelas, F., Tsai, S. J., Callahan, K. S., Campbell W. B., Johnson, A. R., Stimulation of prostaglandin formation by vasoactive mediators in cultured human endothelial cells, *Prostaglandins*, Vol. 24, No. 5, **1982**, 723-742
- Alonso-Garcia, M., Sun, C. W., Falck, J. R., Harder, D., Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries, *AJP-Renal Physiology*, Vol. 275, No. 3, **1998**, 370-378
- Amezcuca, J. L., Palmer, R. M., de Souza, B. M., Moncada, S., Nitric Oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 97, No. 4, **1989**, 1119-1124
- Andrews, R. K., Berndt, M. C., Platelet physiology and thrombosis, *Thrombosis Research*, Vol. 114, **2004**, 447-453
- Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., Andersson, K. E., Kehrel, B., 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, *The European Molecular Biology Organization Journal*, Vol. 18, No.1, **1999**, 37-48
- Augustin, H. G., Kozian, D. H., Johnson, R. C., Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cells phenotypes, *BioEssays*, Vol. 16, No. 2, **1994**, 901-906
- Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U., Reinhard, M., The EVH2 Domain of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Mediates tetramerization, F-actin Binding and Actin Bundle Formation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 33, **1999**, 23549-23557
- Barzik, M., Kotova, T. I., Higgs, H. N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F., Schafer, D., Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 31, **2005**, 28653-28662
- Baynes, J. W., Role of oxidative stress in development of complications in diabetes, *Diabetes*, Vol. 40, No. 4, **1991**, 405-412
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J., Antagonism between Ena/VASP Proteins and Actin Filament Capping Regulates Fibroblast Motility, *Cell*, Vol. 109, No. 4, **2002**, 509-521
- Bergh, C. H., Hjalmarson, A., Holm, G., Angwald, E., Jacobsson, B., Studies on calcium exchange in platelets in human diabetes, *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. 18, No. 1, **1988**, 92-97
- Blindt, R., Stellbrink, K., Taeye, A., Müller, R., Kiefer, P., Yagmur, E., The significance of vasodilator-stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis, *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 98, **2007**, 1329-1334

- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J., Pagano, P., Cohen, R., Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature*, Vol. 368, **1994**, 850-853
- Bosia, A., Spangenberg, P., Arese, P., Till, U., The Role of the GSH-disulfide status in the reversible and irreversible aggregation of human platelets, *Thrombosis Research*, Vol. 30, No. 2, **1983**, 137-142
- Broillet, M. C., S-Nitrosylation of proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 55, **1999**, 1036-1042
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, J., Walter, U., cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No.20, **1994**, 14509-14517
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., Walter, U., cAMP- and cGMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites of the Focal Adhesion Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) in Vitro and in Intact Human Platelets, *The Journal of biological Chemistry*, Vol. 269, **1994**, 14509-14517
- Caughey, G. E., Cleland, L. G., Penglis, P. S., Gamble, J. P., Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2, *The Journal of Immunology*, Vol. 167, **2001**, 2831-2838
- Chen, L., Daum, G., Chitale, K., Coats, S. A., Bowen-Pope, D. F., Vasodilator-Stimulated Phosphorylation and Growth Inhibition by Nitric Oxide in vascular Smooth Muscle Cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 24, **2004**, 1403-1408
- Chereau, D., Dominguez, R., Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly, *Journal of Structural Biology*, Vol. 155, No. 2, 2006, 195-201
- Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J., Jothianandan, D., Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin, *Nature*, Vol. 79, **1982**, 2106-2110
- Chirkov, Y., Holmes, A. S., Willoughby, S. R., Stewart, S., Stable Angina and Acute Coronary Syndromes Are Associated With Nitric Oxide Resistance in Platelets, *Journal of the American college of Cardiology*, Vol. 37, No.7, **2001**, 1851-1857
- Chirkov, Y., Horowitz, J. D., Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: A new therapeutic frontier?, *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 116, **2007**, 287-305
- Chitale, K., Chen, L., Galler, A., Walter, U., Daum, G., Clowes, W., Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C, *FEBS Letters*, Vol. 556, No. 1-3, **2004**, 211-215
- Chu, A., Sumbilla, C., Inesi, G., Specific Association of Calmodulin-Dependent Protein Kinase and Related Substrates with the Junctional Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle, *Biochemistry*, Vol. 29, **1990**, 5899-5905
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmermann, G. A., Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders, *The*

- Journal of The American Society of Hematology*, Vol. 91, No. 10, **1998**, 3527-3561
- Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., Innere Medizin, Kap. 5: Krankheiten des Herzens und des Kreislaufs, 5. Auflage, Urban und Fischer, 2004, 205-382
- Comerford, K., Lawrence, D., Synnestvedt, K., Levi, B. P., Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability, *The FASEB Journal*, Vol. 16, **2002**, 583-585
- Cook, A. M., Haynes, J. M., Phosphorylation of the PKG substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), in human cultured prostatic stromal cells, *Nitric Oxide*, Vol. 16, No. 1, **2007**, 10-17
- Cooke, J. P., Dzau, V., Nitric Oxide Synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease, *Annual Reviews of Medicine*, Vol. 48, **1997**, 489-509
- Da Silva-Santos, J., Assreuy, J., Long-Lasting Changes of Rat Blood Pressure to Vasoconstrictors and Vasodilators Induced by Nitric Oxide Donor Infusion: Involvement of Potassium Channels, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 290, No. 1, **1999**, 380-387, defense and inflammation, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, Vol. 133, **2008**, 1130-1135
- Eigenthaler, M., Nolte, C., Halbrügge, M., Walter, U., Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one or their major substrates in human platelets, *The European Journal of Biochemistry*, vol. 205, **1992**, 471-481
- Eigenthaler, M., Ullrich, H., Geiger, J., Horstrup, K., Hönig-Liedl, P., Wiebecke, D., Walter, U., Defective Nitrovasodilator-stimulated Protein Phosphorylation and Calcium Regulation in cGMP-dependent Protein Kinase-deficient Human Platelets of chronic Myelocytic Leukemia, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 18, **1993**, 13526-13531
- Farkas, J., Menzel, J., Proteins lose their nitric oxide stabilizing function after advanced glycosylation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Vol. 1245, No. 3, **1995**, 305-310
- Francescutti, D., Baldwin, Lee, L., Mutus, B., Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modelling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site, *Protein Engineering*, Vol. 9, No. 2, **1996**, 189-194
- Fukuda, Y., Teragawa, H., Matsuda, K., Yamagata, T., Matsuura, H., Chayama, K., Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia, *Heart*, Vol. 87, **2002**, 264-269
- Furie, B., Furie, B. C., Mechanisms of Thrombus Formation, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 359, **2008**, 938-949
- Gambaryan, S., Geiger, J., Schwarz, U. R., Butt, E., Begonja, A., Obergfell, A., Walter, U., Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase, *Blood Journal*, Vol. 103, **2004**, 2593-2600
- Geiger, J., Holub, I., Sheppach, W., Tjahjadi, B., Walter, U., Stimulated VASP phosphorylation as a potential indicator for platelet responsiveness to endothelial factors, **2008**

- Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S., Walter, U., role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 89, **1992**, 1031-1035
- Gewaltig, M. T., Kojda, G., Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential, *Cardiovascular Research*, Vol. 55, **2002**, 250-260
- Grant, P. J., Diabetes mellitus as a prothrombotic condition, the *Journal of Internal Medicine*, Vol. 262, 2007, 157-172
- Gryglewski, R. J., Moncada, S., Palmer, R. M. J., Bioassay of Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 87, **1986**, 685-694
- Halbrügge, M., Walter, U., Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 185, No. 1, **1989**, 41-50
- Hansen, W. R., Keelan, J. A., Skinner, S. J., Mitchell, M., Key Enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, Vol. 57, No. 4, **1999**, 243-257
- Haouari, M. E., Rosado, J. A., Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus, *Blood, Cells, Molecules and Diseases*, Vol. 41, **2008**, 119-123
- Harrison, D. G., Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 100, **1997**, 2153-2157
- Hauser, W., Knobloch, K. P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Geiger, J., Walter, U., Zimmer, M., Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 96, No. 14, **1999**, 8120-8125
- Hermann, M., Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol. 47, **2006**, 21-25
- Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R., Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus, *Circulation Research*, Vol. 88, **2001**, 14-22
- Ibarra-Alvarado, C., Galle, J., Melichar, V. O., Mameghani, A., Phosphorylation of Blood Vessel Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Serine 239 as a Functional Biochemical Marker of Endothelial Nitric Oxide/Cyclic GMP Signalling, *Molecular Pharmacology*, Vol. 61. No. 2, **2002**, 312-319
- Ignarro, L. J., Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 30, **1990**, 535-560
- Ignarro, L. J., Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication, *Hypertension*, Vol. 16, **1990**, 477-483
- Jang, E., Azzam, J., Dickinson, N., Davidson, M., Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside, *British Journal of Haematology*, Vol. 117, No.3, **2002**, 664-675
- Jurk, K., Kehrel, B. E., The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J., Gertler, F., ENA/VASP PROTEINS: Regulators of the Actin Cytoskeleton and Cell Migration, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 19, **2003**, 541-561

- Kroll, M. H., Hellums, J. D., McIntire, L. V., Schafer, A., Moake, J., Platelets and shear stress, *Blood Journal*, Vol. 88, **1996**, 1525-1541
- Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Role of Proteins of the Ena/VASP Family in Actin-based Motility of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Cell Biology*, Vol. 144, No. 6, 1999, 1245-1258
- Li, Z., Ajdic, J., Eigenthaler, M., Du, X., A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans, *Blood Journal*, Vol. 101, No. 11, **2003**, 4423-4429
- Lidbury, P. S., Antunes, E., Nucci, G., Vane, J. R., Interactions of Iloprost and sodium nitroprusside on vascular smooth muscle and platelet aggregation, *The British Journal of Pharmacology*, Vol. 98, **1989**, 1275-1280
- Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., Hebbel, R. P., Origins of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Outgrowth from Blood, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 105, **2000**, 71-77
- Lohmann, S. M., Walter, U., Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases, *Frontiers in Bioscience*, Vol. 10, **2005**, 1313-1328
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., Guanylyl Cyclases and Signalling by Cyclic GMP, *Pharmacological Reviews*, Vol. 52, No. 3, **2000**, 375-414
- Lüllmann-Rauch, R., Taschenlehrbuch Histologie, Kap.12: Blut und Blutbildung, 2.Auflage, Georg Thieme Verlag, 2006, 260-273
- Majerus, P. W., Arachidonate Metabolism in Vascular Disorders, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 72, **1983**, 1521-1525
- Manganello, J. M., Djellas, Y., Borg, C., Antonakis, K., Le Breton, G. C., Cyclic AMP-dependent Phosphorylation of Thromboxane A₂ Receptor-associated G_{α13}, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 239, **1999**, 28003-28010
- Massberg, S., Grüner, S., Konrad, I., Arguinzonis, M. G., Eigenthaler, M., Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice, *Blood Journal*, Vol. 103, **2004**, 136-142
- Maurice, D. H., Haslam, R. J., Molecular Basis of the Synergistic Inhibition of Platelet Function by Nitrovasodilators and Activators of Adenylate Cyclase: Inhibition of Cyclic AMP Breakdown by Cyclic GMP, *Molecular Pharmacology*, Vol. 37, **1990**, 671-681
- Mazzanti, L., Mutus, B., Diabetes-Induced Alterations in Platelet Metabolism, *Clinical Biochemistry*, Vol. 30, **1997**, 509-515
- Michelson, A. D., Barnard, M. R., Hechtman, H. B., MacGregor, H., Connolly, R. J., Loscalzo, J., In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 93, No. 21, **1996**, 11877-11882
- Moncada, S., Higgs, A., The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 27, **1993**, 2002-2012
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A., Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacological Reviews*, Vol. 43, No. 2, **1991**, 109-114

- Morgan, E. T., Ullrich, V., Daiber, A., Schmidt, P., Takaya, N., Shoun, H., Cytochromes P450 and Flavin Monooxygenases-Targets and Sources of Nitric Oxide, *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 29, No. 11, **2001**, 1366-1376
- Münzel, T., Feil, R., Mülsch, A., Lohmann, S., Hoffmann, F., Walter, U., Physiology and Pathophysiology by Cyclic Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase, *Circulation*, Vol. 108, **2003**, 2172-2183
- Muruganandam, A., Romsa, G. J., Thibert, R. J., Cheung, R. M., Draisey, T. F., Glycated calmodulin from platelets as an index of glycemic control, *Clinical Chemistry*, Vol. 39, **1993**, 815-819
- Muruganandam, A., Tannous, M., Mutus, B., ELISA for in vivo assessment of nonenzymatically glycated platelet glutathione peroxidase, *Clinical Biochemistry*, Vol. 27, No. 4, **1994**, 293-298
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., Arzneimittelwirkungen, Kap. 3: Mediatoren (Autakoide, parakrine Hormone), 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 469-485
- Nieswandt, B., Watson, S. P., Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?, *Blood Journal*, Vol. 102, **2003**, 449-461
- Nolte, C., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P., Endothelial Cell-dependent Phosphorylation of a Platelet Protein Mediated by cAMP- and cGMP-elevating Factors, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 22, **1991**, 14808-14812
- Nozik-Grayck, E., McMahon, T. J., Huang, Y. C., Dieterle, C., Stamler, J., Pulmonary vasoconstriction by serotonin is inhibited by S-nitrosoglutathione, *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 282, No. 5, **2002**, 1057-1062
- Oelze, M., Mollnau, H., Hoffmann, N., Warnholtz, A., Bodenschatz, M., Smolenski, A., Walter, U., Vasodilator Stimulated Phosphoprotein Serine 239 Phosphorylation as a Sensitive Monitor of Defective Nitric Oxide/ cGMP Signalling and Endothelial Dysfunction, *Circulation Research*, Vol. 87, **2000**, 999-1005
- Offermanns, S., G-Proteins as transducers in transmembrane signalling, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 83, **2003**, 101-130
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S., Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*, Vol. 333, **1988**, 664-666
- Pannirselvam, M., Verma, S., Anderson, T. J., Triggle, C. R., Cellular Basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 136, No. 2, **2002**, 255-263
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H., Nakane, M., Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 88, No. 23, **1991**, 10480-10484

- Pollock, W. K., Rink, T. J., Thrombin and ionomycin can raise platelet cytosolic calcium to micromolar levels by discharge of internal calcium stores: studies using fura-2, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 139, **1986**, 308-314
- Porstmann, T., Kiessig, S. T., Enzyme immunoassay techniques, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 150, **1992**, 5-21
- Profirovic, J., Gorovoy, M., Niu, J., Pavlovic, S., A Novel Mechanism of G Protein-dependent Phosphorylation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 38, **2005**, 32866-32876
- Pucovsky, V., Gordienko, D. V., Bolton, T. B., Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on calcium release sites and global intracellular calcium in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries, *The Journal of Physiology*, Vol. 539, **2002**, 25-39
- Pula, G., Krause, M., Role of Ena/VASP Proteins in Homeostasis and Disease, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 186, **2008**, 39-65
- Rabini, R. A., Staffolani, R., Fumelli, P., Mutus, B., Curatola, G., Mazzanti, L., Decreased Nitric Oxide Synthase Activity in Platelets from IDDM and NIDDM Patients, *Diabetologia*, Vol. 41, **1998**, 101-104
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., Moncada, S., Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase, in vascular endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 87, **1990**, 10043-10047
- Rajendran, S., Chirkov, Y., Platelet Hyperaggregability: Impaired Responsiveness to Nitric Oxide ("Platelet NO Resistance") as a Therapeutic Target, *Cardiovascular Drugs Therapy*, Vol. 22, **2008**, 193-203
- Rauchfuss, S., Geiger, J., Walter, U., Renne, T., Gambaryan, S., Insulin inhibition of platelet-endothelial interaction is mediated by insulin effects on endothelial cells without direct effects on platelets, *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 6, **2008**, 856-864
- Russo, I., Doronzo, G., Mese, P. D., Salve, A. D., Secchi, M., Trovati, M., Platelet Resistance to the Antiaggregatory Cyclic Nucleotides in Central Obesity Involves Reduced Phosphorylation of Vasodilator Stimulated Protein, *Clinical Chemistry*, Vol. 53, No. 6, **2007**, 1053-1060
- Salvemini, D., Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 53, **1997**, 576-582
- Salzman, E. W., Levine, L., Cyclic 3', 5'- Adenosine Monophosphate in Human Blood Platelets, *The journal of clinical investigation*, Vol. 50, **1971**, 131-141
- Schäfer, A., Alp, N. J., Cai, S., Lygate, C. A., Neubauer, S., Eigenthaler, M., Bauersachs, J., Reduced Vascular NO Bioavailability in Diabetes Increases Platelet Activation In Vivo, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 24, **2004**, 1720-1726
- Schäfer, A., Alp, N. J., Cai, S., Lygate, C. A., Neubauer, S., Eigenthaler, M., Bauersachs, J., Reduced Vascular NO Bioavailability in Diabetes Increases Platelet Activation In Vivo, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 24, **2004**, 1720-1726

- Schäfer, A., Flierl, U., Kobsar, A., Eigenthaler, M., Ertl, G., Bauersachs, J., Soluble Guanylyl Cyclase Activation With HMR1766 Attenuates Platelet Activation in Diabetic Rats, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 26, **2006**, 2813-2818
- Scherrer, U., Randin, D., Vollenweider, P., Vollenweider, L., Nicod, P., Nitric Oxide Release Accounts for Insulin's Vascular Effects in Humans, *Journal of clinical Investigation*, Vol. 94, **1994**, 2511-2515
- Schwarz, U., Walter, U., Eigenthaler, M., Taming platelets with cyclic nucleotides, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 62, **2001**, 1153-1161
- Shattil S. J., Ginsberg, M. H., Brugge, J. S., Adhesive signalling in platelets, *Current Opinion in cell Biology*, Vol. 6, No. 5, 1994, 695-704
- Shaul P. W., North, A. J., Wu, L. C., Wells, L. B., Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Cultured Human Bronchiolar Epithelium, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 94, **1994**, 2231-2236
- Smith, W. L., Prostaglandin Biosynthesis and Its Compartmentation in Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells, *Annual Reviews Physiology*, Vol. 48, **1986**, 251-262
- Smolenski, B., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Walter, U., Analysis and regulation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Serine 239 Phosphorylation in vitro and in Intact Cells Using a Phosphospecific Monoclonal Antibody, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 32, **1998**, 20029-20035
- Sobol, A. B., Watala, C., The Role of Platelets in Diabetes-Related Vascular Complications, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vol. 50, **2000**, 1-16
- Stevens, T., Garcia, J. N., Shasby, M., Bhattacharya, J., Malik, A., Mechanisms regulating endothelial cell barrier function, *The American Journal of Molecular Physiology*, Vol. 279, **2000**, 419-422
- Stone, J. R., Marletta, M. A., Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States, *Biochemistry*, Vol. 33, **1994**, 5636-5640
- Stone, J. R., Marletta, M. A., Spectral and Kinetic Studies on the Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Nitric Oxide, *Biochemistry*, Vol. 35, **1996**, 1093-1099
- Sun, C. W., Alonso-Garcia, M., Taheri, M. R., Falck, J. R., Nitric Oxide-20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Interaction in the Regulation of Kalium Channel Activity and Vascular Tone in Renal Arterioles, *Circulation Research*, Vol. 83, **1998**, 1069-1079
- Sun, D., Liu, H., Yan, C., Jacobson, A., Ojaimi, C., Huang, A., Kaley, G., COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice, *AJP-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 291, **2006**, 600-608
- Tjahjadi, B., Geiger, J., Walter, U., Quantification of endothelial factor effects on human platelets, **2008**
- Topper, J. N., Cai, J., Falb, D., Gimbrone, M. A., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase and endothelial cell nitric oxide synthase are

- selectively up-regulated by steady laminar shear stress, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 93, No. 19, **1996**, 10417-10422
- Torfgard, K., Ahlner, J., Axelsson, K., Relaxation of Bovine Mesenteric Arteries by Glyceryl Trinitrate and Other Nitro-Compounds: Evidence for Partly Different Mechanisms of Action, *Pharmacology and Toxicology*, Vol. 67, **1990**, 216-221
- Trepakova, E. S., Cohen, R., Bolotina, V. M., Nitric Oxide Inhibits Capacitative Cation Influx in Human Platelets by Promoting Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase-Dependent Refilling of Calcium Stores, *Circulation Research*, Vol. 84, **1998**, 201-209
- Venema, R. C., Sayegh, H. S., Arnal, J. F., Harrison D. G., Role of the Enzyme Calmodulin-binding Domain in Membrane Association and Phospholipid Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 24, **1995**, 14705-14711
- Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Nolan, R., Platelet Dysfunction in Type 2 Diabetes, *Diabetes Care*, Vol. 24, **2001**, 1476-1485
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S., Hinssen, H., Jockusch, B. M., The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin, *FEBS Letters*, Vol. 529, **2002**, 275-280
- Wang, G. R., Zhu, Y., Halushka, P., Lincoln, T., Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Vol. 85, **1998**, 4888-4893
- Wanstall, J. C., Homer, K. L., Doggrell, S. A., Evidence for, and importance of, cGMP-Independent Mechanisms with NO and NO Donors on Blood Vessels and Platelets, *Current Vascular Pharmacology*, Vol. 3, **2005**, 41-53
- Wardell, M. R., Reynolds, C. C., Berndt, M. C., Wallace, R. W., Fox, J. E., Platelet glycoprotein Ib_β is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 264, No. 26, **1989**, 15656-15661
- Weksler, B. B., Marcus, A. J., Jaffe, E. A., Synthesis of Prostaglandin I₂ by Cultured Human and Bovine Endothelial Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 74, No. 9, **1977**, 3922-3926
- Wentworth, J., Pula, G., Poole, A., Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser 157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets, *Biochemical Journal*, Vol., 393, **2006**, 555-564
- Willoughby, S. R., Stewart, S., Holmes, A., Platelet Nitric Oxide Responsiveness: A Novel Prognostic Marker in Acute Coronary Syndromes, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 25, **2005**, 2661-2666
- Wilson, D. B., Neufeld, E. J., Majerus, P. W., Phosphoinositide interconversion in thrombin-stimulated human platelets, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260, No. 2, **1985**, 1046-1051
- Xiang, Y. Z., Kang, L. Y., Gao, X. M., Strategies for antiplatelet targets and agents, *Thrombosis Research*, Vol. 123, **2008**, 35-49

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells, *Nature*, Vol. 332, **1988**, 411-415
- Yazbek, N., Bapat, A., Kleiman, N., Platelet abnormalities in diabetes mellitus, *Coronary Artery disease*, Vol. 14, **2003**, 365-371
- Yoshida, K., Kasama, K., Kitabake, M., Okuda, M., Imai, M., Metabolic fate of Nitric Oxide, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Vol. 46, No. 1, **1980**, 71-77
- Zeng, G. Y., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Roles for Insulin Receptor, PI3-Kinase, and Akt in Insulin-Signaling Pathways related to Production of Nitric Oxide in human Vascular Endothelial Cells, *Circulation Research*, Vol. 101, **2000**, 1539-1545

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
BIM I	Bisindolylmaleimide I
BSA	Albumin bovine serum
cAK	cAMP-abhängige Kinase
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGK	cGMP-abhängige Kinase
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothel cells
EDRF	Endothel Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal responsive kinase
ET	Endothelin
EVH	Ena/VASP Homology
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GC	Guanylylcyclase
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion
HETE	Hydroxyeicostatetraenoidsäure
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IP ₃	Inositoltriphosphat
LDL	Low Density Lipoprotein
NADP ⁺	Nicotinsäureamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NO	Nitrogen (Mono) Oxide bzw. Stickstoffmonoxid

Abkürzungsverzeichnis

NOC-9	1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-6-aminohexyl)-3-methyl-1-triazene
NOS	Nitric Oxide Synthase
OONO ⁻	Peroxynitrite
PAF	Platelet Activating Factor
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG E ₁	Prostaglandin E ₁
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Phosphokinase C
PKG	Proteinkinase G
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP	Polyprolin
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma
RES	Retikuloendotheliales System
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	Ca ²⁺ -ATP-ase des sarkoendoplasmatischen Retikulums
sGC	Soluble Guanylylcyclase
SNP	Sodium Nitroprusside
SR	Sarkoendoplasmatisches Retikulum
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VB	Vollblut
vWF	von Willebrand Factor
WP	Washed platelets

Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand am Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Walter.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Walter für die Möglichkeit bedanken, in seinem Institut diese Doktorarbeit anzufertigen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Geiger, der mich während meiner Doktorarbeit betreut und umfangreich unterstützt hat. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung während der gesamten Arbeit, für die hervorragende Betreuung und die unermüdliche Hilfe und Geduld.

Zudem möchte ich auch Frau Petra Hönig-Liedl für ihre sehr große Hilfe während meiner Laborzeit herzlich danken.

Diese Doktorarbeit möchte ich meinen Eltern widmen, da sie nicht nur mein Studium finanziert haben, sondern auch moralisch sehr unterstützt haben und mich motiviert haben, ohne sie wären dieses Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei meiner kleinen Schwester, Rita Tjahyawati, Valeria Kinzel, Marina Ekkart und Eva Hamm bedanken, denn ohne ihre moralische Unterstützung wäre ich niemals fertig geworden. Auch bei Christian Kraemer und David Fronczek möchte ich mich für die vielen Stunden des Korrekturlesens bedanken.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

5. Jahrestagung der DGKL Mannheim 2008.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 46:A186.
A144: Quantification of endothelial factor effects on human platelets.
B. Tjahyadi, P.-H. Liedl, R. Schinzel, U. Walter, J. Geiger

52nd GTH Congress Wiesbaden 2008.
Analysis of Platelet Nitric Oxide Responsiveness as novel prognostic marker in coronary syndromes and Type 2 diabetes.
Geiger J, Holub I, Scheppach W, Tjahyadi B, Walter U

1st French-UK Platelet meeting Toulouse, France, 2009.
Thrombotic risk factors are associated with reduced platelet responsivity to cyclic nucleotide elevating agents.
Geiger J; Tjahyadi B; Hoenig-Liedl P; Holub I; Scheppach W; Walter U

A protein phosphorylation based assay for screening and monitoring of drugs modulating cyclic nucleotide pathways.
Anal. Biochem. 2010
Geiger J, Brandmann T, Hubertus K, Tjahyadi B, Schinzel R, Walter U

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Budy Tjahyadi
Geburtsdatum 31.08.1984
Geburtsort Jakarta, Indonesien
Familienstand Ledig

Berufserfahrung und Praktika

Praktisches Jahr

02.2009 - 06.2009 Prof. Koebe, Abteilung für Chirurgie,
Missionärztliches Klinik Würzburg
06.2009 - 10.2009 Prof. Toyka, Abteilung für Neurologie,
Universitätsklinikum Würzburg
10.2009 - 01.2010 Prof. Kanzler, Abteilung Innere Medizin,
Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt

Famulaturen

09.2006 Dr. Schramm, Nephrologisches Zentrum
Praxisgemeinschaft Würzburg
08.2007 Prof. Koebe, Abteilung für Chirurgie,
Missionärztliches Klinik Würzburg
03.2008 Dr. Sidharta Widjaja, Abteilung Ophtalmologie
Husada Hospital, Jakarta - Indonesien
09.2008 Dr. Maria Ingrid, Abteilung Neurologie
Husada Hospital, Jakarta - Indonesien

Promotion

Seit 01.2008
Thema: Etablierung und Anwendung eines
Proteinphosphorylierungs-Assays zur Quantifizierung
Der Wirkung von Endothelfaktoren auf Thrombozyten,
Abteilung für Klinische Pathobiochemie,
Universitätsklinikum Würzburg.

Zusätzliche berufliche Erfahrungen

2004-2006 Krankenpflegepraktikum, Abteilung Neurologie,
Juliuspital Würzburg

Hochschulausbildung

2004-2010 Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
10.2010 Stipendiat des Studiumabschlussstipendiums der
Universität Würzburg
06.2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppo),
Gesamtnote „befriedigend“ (3,0)
08.2006 Stipendiat des Sprachkursstipendiums der Université
de Caen, Caen - Frankreich
04.2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppo),
Gesamtnote „gut“ (2,0)

Schulbildung

2003-2004

Studienkolleg bei den Universitäten des Freistaates Bayern
MünchenAbschluss: Feststellungsprüfung für ausländische
Studienbewerber zum Nachweis der Eignung für ein Studium
An den Universitäten in der Bundesrepublik Deutschland
Abschlussnote: 1,2**Besondere Kenntnisse**

Sprachen

Englisch in Wort und Schrift

Indonesisch (Muttersprache)

Französisch (Basiskenntnisse)

Word, Excel

EDV

Sonstige Interessen

Kochen, Badminton, Wandern

Würzburg, 08. Juni 2010

Budy Tjahjadi