

Aus dem Zentrum für Physiologie
Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Schrader

Die endotheliale NO-Synthase spielt bei der Inhibition
arterieller Thrombosen eine geringe Rolle

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Burcin Özüyaman
2003

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. A.-A. Weber

Abkürzungen:

α	Gegen
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD62P	P-Selektin
CCD	Natrium / Citrat-Puffer
cGK-I	cGMP-abhängige Proteinkinase-I
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cpm	Counts Per Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DG	Diacylglycerol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence Detection
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETU	Ethylisothioharnstoff
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FeCl ₃	Eisen-III-chlorid
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GPRP	Gly-Pro-Arg-Pro-Peptid
GP	Glykoproteinrezeptor
G _i	inhibitorisches G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
G _q	G-Protein
GSNO	S-Nitrosoglutathion
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Inositolphosphat

IP ₃	Inositoltriphosphat
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin
L-NMMA	N ^G -Methyl-L-Arginin
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
cNOS	konstitutive NO-Synthase (eNOS, nNOS)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS-/-	Defizienz beider Allele des eNOS-Genes
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PRP	Plättchenreiches Plasma
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RG	Reaktionsgefäß
RP	Resuspensionspuffer
RT	Raumtemperatur
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natriumnitroprussid
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TE	Tris / EDTA-Puffer
TTO	Time To Occlusion
TXA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor
VASP	Vasodilator-Stimuliertes Phosphoprotein
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	7
1.1 Thrombozytenglykoproteine und intrazelluläre Signaltransduktion	7
1.2 Plättchenstabilisierende Gefäßwandfaktoren und die Beeinflussung des Vasodilator-Stimulierten Phosphoproteins (VASP)	8
1.3 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Beeinflußbarkeit der Thrombozyten durch exogene NO-Quellen	10
1.4 <i>In vivo</i> Beeinflußbarkeit der Thrombozyten durch endogene NO-Quellen	11
1.5 Unterschiedliche intravaskuläre NO-Quellen	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Mäusezucht und Thrombozytenpräparation	15
2.1.1 Mäusezucht und Validierung des Genotyps mittels PCR	15
2.1.2 Gewinnung und Präparation von Thrombozyten und Plasma	16
2.1.3 Thrombozytenzählung und Blutbilderstellung	17
2.2 Thrombozytenaktivierung und -stabilisierung	17
2.2.1 Thrombozytenaggregation	17
2.2.2 Durchflusszytometrische CD62P (P-Selektin)-Bestimmung	18
2.2.3 Durchflusszytometrische VASP-Analyse bei SNP-Stimulation	19
2.2.4 Bestimmung der cGMP-Bildung in Thrombozyten unter SNP- und Kollagen-Stimulation	21
2.3 Expressionsanalysen und NOS-Enzymaktivität	22
2.3.1 VASP-Expressionsanalyse mit der Western-Blot-Methode	22
2.3.2 eNOS-Expressionsanalyse in Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten mit der Western-Blot-Methode	23
2.3.3 Messung der eNOS-Aktivität	24
2.4 <i>In vivo</i> Versuche	25
2.4.1 Blutungszeit	25
2.4.2 Induktion einer Thrombose durch Intimaläsion	25
2.4.2.1 Validierung der Gefäßläsion	26
2.4.3 Verschlusszeit - Time To Occlusion (TTO)	27
2.5 Statistik	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Analyse von isolierten Thrombozyten	28

3.1.1 Thrombozytenkonzentration	28
3.1.2 Thrombin induzierte Plättchenaktivierung	28
3.1.3 Kollagen induzierte Plättchenaggregation	30
3.1.4 SNP induzierte cGMP-Bildung	31
3.1.5 SNP induzierte VASP-Phosphorylierung	32
3.1.6 Kollagen induzierte VASP-Phosphorylierung und cGMP-Bildung	34
3.2 Expressionsanalyse und Aktivität der NOS	36
3.2.1 eNOS-Expressionsanalyse in Thrombozyten und Erythrozyten	36
3.2.2 NOS-Aktivität im Citrullin-Assay	37
3.3 Rolle der eNOS <i>in vivo</i> bei der arteriellen Thrombusentstehung	38
3.3.1 Arterielle Blutungszeit	39
3.3.2 Validierung der Intimaläsion der A. carotis	40
3.3.3 Arterielle Thrombusbildung	41
4. Diskussion	43
4.1 Rolle der eNOS für die Plättchenfunktion und arterielle Thrombusbildung	43
4.2 NO-Quellen für die Plättchenstabilisierung	47
4.3 Arterio- venöse Unterschiede bei der Plättchenstabilisierung durch NO	48
5. Zusammenfassung	51
6. Literatur	52
7. Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dieser Arbeit	59
8. Danksagung	60
9. Lebenslauf	61

1. Einleitung

1.1 Thrombozytenglykoproteine und intrazelluläre Signaltransduktion

Die wesentliche Aufgabe der Thrombozyten liegt in der Initiierung und Aufrechterhaltung der hämostatischen Kaskade (primäre Hämostase). Der dabei gebildete plättchenreiche Thrombus stillt vorübergehend die Blutung, ist jedoch fragil und wird im Rahmen der plasmatischen Gerinnung (sekundäre Hämostase) durch Fibrinvernetzungen verfestigt. Zu den initialen Reaktionen der Plättchen gehören die Adhäsion, die mit einer Veränderung der Thrombozytenform einhergeht, und darauf aufbauend die Aggregation und die Ausschüttung von plättchenendogenen Mediatoren. So kommt es bei Verletzungen der Gefäßwand und der damit verbundenen Zerstörung des Endothels zu einer Rekrutierung der Plättchen aus dem zirkulierenden Blut, um einen Verschlusspfropf zu bilden. Die Adhäsion an das subendotheliale Gewebe wird dabei durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, der einerseits mit dem Kollagentyp I und III interagiert und andererseits an die Plättchen (Glykoproteinkomplex Ib-V-IX) bindet und so zu einer Brückenbildung führt. Diese wird ergänzt durch die das Kollagen bindenden Glykoproteinrezeptoren Ia-IIa und VI. Beide Wege bewirken eine über Tyrosinkinasen vermittelte Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes und in der Folge eine Aktivierung des Glykoproteinrezeptors IIb-IIIa (29; 54). Der GPIIb-IIIa Komplex ist ein heterodimeres Fibrinogen bindendes Integrin. Durch thrombotische Stimuli wird die Affinität dieses Komplexes zum Fibrinogen und die Zahl der Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche gesteigert (61). Dabei besitzt jedes ruhende Plättchen circa 80.000 GPIIb-IIIa Kopien auf seiner Oberfläche und einen weiteren Pool in den α -Granula, die nach Aktivierung an die Zelloberfläche verlagert werden. Mit seiner hohen Affinität für Fibrinogen und der damit verbundenen Quervernetzung leitet der GPIIb-IIIa Rezeptor den Übergang von der Adhäsions- in die Aggregationsphase der Plättchen ein (61), so dass mit der Entwicklung von GPIIb-IIIa Rezeptorantagonisten auf der Basis von Antikörpern oder Peptiden ein wichtiger Erfolg bei der Behandlung akuter Koronarsyndrome erreicht werden konnte (15; 59).

Das P-Selektin oder CD62P ist ein weiteres Mitglied aus der Familie der Adhäsionsproteine. Es wird als integrales Membranprotein primär in den α -Granula

gespeichert und erscheint bei Aktivierung auf der Plättchenoberfläche (6; 68). Dort trägt es zu einer Adhäsion der Plättchen an das Endothel bei. P-Selektin ist ebenfalls in den Endothelzellen innerhalb der Weibel-Palade-Körperchen vorhanden. Insgesamt handelt es sich bei der Oberflächenexpression des P-Selektins um einen sensitiven Parameter, der über den Umfang an Externalisierung der α -Granula Aufschluss über das Ausmaß der Plättchenaktivierung gibt. Bei der Degranulation werden aus den intrazellulären Speichern unter anderem Fibrinogen, ADP, Serotonin, Thromboxan A_2 und Thrombin freigesetzt, die im Rahmen dieser Kaskade den Übergang von der Adhäsionsphase in die Aggregationsphase einleiten (63). Infolge der Aktivierung der ADP-, Thromboxan A_2 -, Thrombin- und Serotoninrezeptoren kommt es über heterotrimere G-Proteine zu einer Stimulation und Regulation spezifischer Effektorsysteme, die über die von der Phospholipase C (PLC) freigesetzten Mediatoren Diacylglycerol (DG) und (IP_3) zu einer Aktivierung des Glykoproteins IIb-IIIa führen (9).

1.2 Plättchenstabilisierende Gefäßwandfaktoren und die Beeinflussung des Vasodilator-Stimulierten Phosphoproteins (VASP)

Unter basalen Bedingungen schüttet das Gefäßsystem plättchenstabilisierende Faktoren aus. Hierzu zählen die endothelialen Autakoide Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI_2). In den Plättchen führt NO über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zu einer Zunahme des zyklischen GMP (cGMP), das über die cGMP-abhängige Proteinkinase-I (cGK-I) zu einer Phosphorylierung des Vasodilator-Stimulierten Phosphoproteins (VASP) führt (18). P-VASP interagiert mit dem GPIIb-IIIa, indem es diesen im niedrigaffinen Funktionszustand hält, was zu einer Verhinderung der Fibrinogenbindung führt (70). Ergänzend führt das Prostazyklin in den Plättchen über die membranständige Adenylatzyklase und vermittelt über heterotrimere G-Proteine zu einer Akkumulation von zyklischem AMP. Als Folge kommt es zu einer Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den Plättchen und zu einer Stabilisierung über eine vermehrte VASP-Phosphorylierung (49). Da die Ausschüttung des in den α -Granula vorhandenen P-Selektins ebenfalls verhindert wird, kommt es zu einer Hemmung der Plättchenadhäsion an das Endothel (45). Das bei der Plättchenaktivierung ausgeschüttete ADP und Thrombin stimuliert nicht nur die Plättchenaggregation, vielmehr steigern diese Mediatoren auch die endotheliale Produktion von NO und Prostazyklin. Diese Freisetzung plättchenspezifischer

Faktoren stellt eine negative Rückkopplung dar, durch die die Aggregation gehemmt werden kann (14; 39).

Neben der VASP-Phosphorylierung schwächt NO auch die aggregatorische Wirkung von Thromboxan A₂ (TXA₂) ab, indem es eine cGMP-abhängige Phosphorylierung des Thromboxan-Rezeptors induziert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Desensibilisierung des TXA₂-Rezeptors, so dass es zu einer Abschwächung der TXA₂-Wirkung kommt (71). Ferner hemmt NO konzentrationsabhängig die Thromboxan A₂-Synthase durch Interaktion mit der Häm-Gruppe dieses Enzyms (69).

Wie bereits oben erwähnt ist der Phosphorylierungsgrad des VASP maßgeblich an der intrazellulären Plättchenstabilisierung beteiligt. VASP ist ein 46 kDa großes membranassoziiertes Protein, das abhängig von cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen phosphoryliert wird. Auf dem VASP-Protein wurden drei Phosphorylierungsstellen (Serin₁₅₇, Serin₂₃₉ und Threonin₂₇₈) nachgewiesen, wobei das Serin₁₅₇ primär von der cAMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wird. Dies führt in der Gelelektrophorese zu einer Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit, so dass P-Serin₁₅₇-VASP bei 50 kDa migriert (30). Dem gegenüber wird das Serin₂₃₉ primär von der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), in den Plättchen von der cGK-I Isoform, phosphoryliert (66). Unter dem Einsatz spezifischer Antikörper gegen das P-Serin₂₃₉-VASP (16C2) kann über den Phosphorylierungsgrad des Serin₂₃₉ Aufschluss über die Aktivität des NO-cGMP-cGK-I-Weges gewonnen werden. Die Anwendung dieser Antikörper ist nicht auf Plättchen beschränkt, denn Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit sind ebenfalls in der Gefäßmuskulatur detektierbar. So zeigten Kaninchen mit einer Hyperlipidämie eine eingeschränkte VASP-Phosphorylierung in den glatten Gefäßmuskelzellen (50).

In VASP defizienten Mäusen wurde die Rolle des VASP bei der Plättchenstabilisierung eindrucksvoll bestätigt. Hauser et al. (31) zeigten einerseits, dass die Thrombin induzierte Membranexpression von P-Selektin und die Fibrinogenbindung an das GPIIb-IIIa im Vergleich zum WT erhöht sind. Andererseits beschreiben Aszodi und Kollegen (2), dass VASP defiziente Plättchen signifikant schneller nach Kollagen-Stimulation aggregieren als WT Plättchen und dass die

Hemmung der Plättchenaktivierung durch zyklische Nucleotide (cGMP / cAMP) signifikant schlechter ausgeprägt ist.

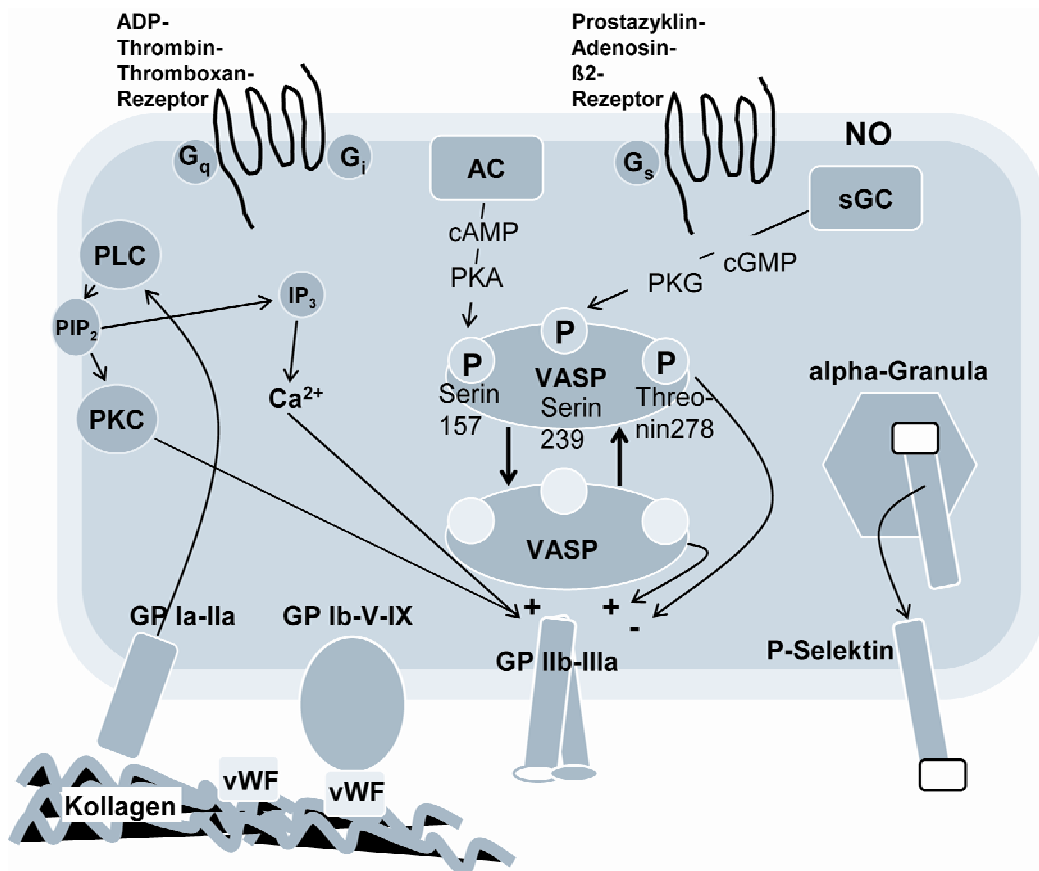


Abbildung 1: Signaltransduktionswege in Thrombozyten

Zu den Membranglykoproteinen gehören die Integrine GPIa-IIa und IIb-IIIa, die leuzinreichen Glykoproteine GPIb-V-IX und das Selektin P-Selektin, die einerseits die Adhäsion an das Endothel (P-Selektin), an den von-Willebrand-Faktor (GPIb-V-IX), an das Kollagen (GPIa-IIa) und an weitere Plättchen (GPIIb-IIIa) vermitteln. Intrazellulär kommt es über Tyrosinkinasen zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die darüber hinaus durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren moduliert wird. Dabei werden aktivierende Rezeptoren, wie der ADP-, Thrombin- und Thromboxan-Rezeptor (G_i ; G_q), von inhibierenden Rezeptoren, wie dem Adenosin- oder Prostazylinrezeptor (G_s) unterschieden. Nach Phospholipase C-Aktivierung kommt es zu einer Freisetzung der Second Messenger Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DG), die einerseits über eine cytosolische Ca^{2+} -Freisetzung oder über die Proteinkinase C (PKC) den GPIIb-IIIa aktivieren.

Das VASP-Protein wird abhängig von der cAMP- oder cGMP-abhängigen Proteinkinase entweder am Serin₁₅₇ (PKA bzw. cAK) oder am Serin₂₃₉ (PKG bzw. cGK-I) phosphoryliert, was den GPIIb-IIIa in für das Fibrinogen niedrigaffinen Funktionszustand hält.

1.3 In vivo und in vitro Beeinflussbarkeit der Thrombozyten durch exogene NO-

Quellen

In einer großen Anzahl von *in vitro* Studien wurde eindeutig gezeigt, dass exogene NO-Applikation, zum Beispiel in Form eines NO-Donors, zur Thrombozytenstabilisierung beiträgt, indem es die Oberflächenexpression der Membranglykoproteine IIb-IIIa und P-Selektin reduziert (45). Mit der Gabe von S-

Nitrosoglutathion (GSNO), einem NO-Donor, konnte konzentrationsabhängig die Aggregation von plättchenreichem Plasma (PRP) gehemmt werden (43). Um die Rolle der endothelialen NO-Freisetzung bei der Aggregation aufzuklären, wurden *in vitro* Plättchen mit Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen in Suspension gebracht. Dabei zeigte sich, dass die durch Thrombin induzierte Aggregation und die Serotoninausschüttung im Vergleich deutlich reduziert waren. Dieser Effekt war unter Zugabe von Hämoglobin reversibel (11).

Die NO-Freisetzung aus Polymeren wurde genutzt, um antithrombogene Oberflächen in Gefäßersatzmaterialien oder Gefäß-Stents zu erzeugen. Dabei zeigte sich, dass Plättchen aus Kaninchen bei extrakorporaler Zirkulation signifikant geringer an das Material adhärten, wenn NO freisetzende Polymere zum Einsatz kamen. Oberflächen von Glass-, Kollagen- und Metall-Stents zeigten nach Beschichtung mit S-Nitroso-Albumin eine signifikant geringere Plättchenadhäsion im Vergleich zu Stents, die nur mit BSA gekoppelt waren. Der Effekt ging mit einem erhöhten cGMP-Spiegel in den Plättchen einher, so dass neben der antiadhäsiven Eigenschaft von Albumin die Wirkung des NO zum Ausdruck kam (1; 40).

In einem Tiermodell mit akutem plättcheninduziertem Koronarverschluss konnte mit der exogenen Gabe von relevanten Dosen an Nitroglyzerin die Reduktion der plättchenabhängigen zyklischen Blutflussreduktion erreicht werden (20). In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktion der Plättchen auf inhaliertes NO-Gas getestet. Dabei zeigte sich bei den Plättchen *ex vivo* unter Stimulation mit ADP und Kollagen eine Abnahme der P-Selektin-Expression und eine Abnahme der Bindungsfähigkeit von Fibrinogen sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit akutem Lungenversagen (28).

1.4 In vivo Beeinflussbarkeit der Thrombozyten durch endogene NO-Quellen

Im Gegensatz zu den *in vitro* oder *in vivo* Studien mit exogener NO-Gabe gibt es nur wenige Studien, welche die Situation der Plättchen *in vivo* wiedergeben. So wird bei zwei Brüdern mit einer durch zerebrale arterielle Thrombosen gezeichneten Krankengeschichte ein Defekt der Bioverfügbarkeit von NO beschrieben. Der Grund hierfür scheint in einem Defekt der Glutathion-Peroxidase mit einer Zunahme von Wasserstoffperoxid und einer Abnahme von NO zu liegen, denn durch die Reaktion

von NO mit H₂O₂ steht weniger NO für die Plättchenstabilisierung zur Verfügung (23). Daneben wurde weiterhin vermutet, dass eine eingeschränkte plättchenendogene Stickstoffmonoxid-Konzentration akute Koronarsyndrome vorhersagen kann, denn mit ADP stimulierte Plättchen von Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Herzinfarkt zeigten eine erniedrigte NO-Freisetzung (25).

Mit dem Einsatz eNOS defizienter Mäuse analysierten Freedman et al. die Plättchenfunktion *in vitro*, reduzierten aber die *in vivo* Analysen auf die Beobachtung der venösen Blutungszeit, die bei eNOS^{-/-} Mäusen erniedrigt war (24). Die modulatorische Rolle der eNOS wurde so vor allen Dingen der Plättchen-NOS zugeschrieben, die den proaggregatorischen Signalen in der Rekrutierungsphase entgegenwirkt. Unter Zuhilfenahme von cGK-I^{-/-} Mäusen konnten Massberg et al. demonstrieren, dass unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der spontanen Adhäsion von WT und cGK-I^{-/-} Mäusen zu beobachten war (42). Als Antwort auf Ischämie und Reperfusion war jedoch die Adhäsion an Arteriolen, Kapillaren und Venolen bei cGK-I Knockout-Tieren erhöht, was zu dem Schluss führte, dass der NOS-cGMP-Weg die Plättchenadhäsion vor allen Dingen als Antwort auf pathologische Stimuli moduliert.

1.5 Unterschiedliche intravaskuläre NO-Quellen

Im Gefäß existieren verschiedene NO-Quellen, die einen Beitrag zur Stabilisierung der Plättchen leisten könnten. Unter diesen ist vor allem das Endothel zu nennen, denn schon frühe Berichte beschreiben, dass die Plättchenadhäsion an das Endothel unter Flussbedingungen durch NO inhibiert wurde (16). Weil dieser Effekt abhängig von einem intakten Endothel war, wurde postuliert, dass die parakrine Ausschüttung von NO eine wichtige Rolle bei der Plättchenstabilisierung spielt. Es gibt ferner Hinweise für eine Expression der eNOS bzw. iNOS in humanen Plättchen (12; 44) in Schweine Plättchen und in humanen Erythrozyten (5; 13; 56). Daneben wurde ein funktioneller Einfluss der murinen Plättchen-NOS auf die Plättchenstabilisierung postuliert, obwohl der strukturelle Nachweis nicht eindeutig gelang (24).

Bei den erwähnten Spezies könnte die endogene NOS-Aktivität in Plättchen autokrin weitere Plättchen stabilisieren oder die Aktivierung von ruhenden Plättchen während der Rekrutierungsphase reduzieren. Gestützt wird diese These durch eine

Entdeckung an humanen Thrombozyten, die zeigte, dass bei einer NOS-Hemmung mit L-NAME eine deutlich reduzierte NO-Produktion und eine etwas reduzierte Aggregationskurve nachweisbar ist. Darüber hinaus zeigte sich in markierten Plättchen, die zu aktivierten, NOS gehemmten Plättchen gegeben wurden, eine im Vergleich zu nicht gehemmten Plättchen sehr viel stärker ausgeprägte Aggregation und Serotoninausschüttung und eine Reduktion des intrazellulären cGMP-Gehaltes (22).

Andere mögliche NO-Quellen stellen im Plasma und Erythrozyten zirkulierende Nitrosothiole dar (52; 67). Interessant ist diese These aus dem Grund, weil das hochgradig labile NO-Radikal mit einer Halbwertszeit von 0,1 Sekunden (35) mit Hilfe eines Trägerproteins eine Halbwertszeit von mehreren Sekunden bis Minuten haben kann (34). Reduzierte Thiolgruppen können unter physiologischen Bedingungen in der Gegenwart von NO zu S-Nitrosothiolen reagieren und so zu einer Vasodilatation und Plättchenstabilisierung beitragen, die cGMP abhängig ist. In diesem Zusammenhang konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Versuchspersonen, die sich einer Katheterintervention unterziehen mussten, von einer S-Nitrosoglutathion (GSNO)-Gabe profitierten. Denn die durch die Intervention induzierte Oberflächenexpression von P-Selektin und dem GPIIb-IIIa konnte so signifikant gemindert werden (37).

Eine wichtige NO-Quelle in diesem Zusammenhang ist das S-Nitrosohämoglobin, welches die NO-Gruppe nach seiner Deoxygenierung vermehrt freigibt und so einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Plättchen hat als im oxygenierten Zustand (52). Dieser Mechanismus könnte auch erklären, weshalb es unter Zusatz von Erythrozyten zu einer Hemmung der Plättchenaggregation mit einer Abnahme der P-Selektin-Expression kommt.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Herausstellung der Rolle der eNOS bei der Plättchenaktivierung und Aggregation *in vitro* und bei der arteriellen Thrombosebildung *in vivo*. Hierbei kamen eNOS^{-/-} Mäuse, die im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie generiert wurden, zum Einsatz. Es konnte einerseits an isolierten Plättchen die Rolle des NO-Signaltransduktionsweges auf die

Plättchenaktivität aufgezeigt und andererseits die Funktion der eNOS bei der arteriellen Thrombosebildung geklärt werden

2. Material und Methoden

2.1 Mäusezucht und Thrombozytenpräparation

2.1.1 Mäusezucht und Validierung des Genotyps mittels PCR

Die Untersuchungen wurden an eNOS defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) durchgeführt, die im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität erzeugt worden waren (26). Die verwendeten Tiere waren für sieben Generationen in den Stamm C57Bl/6 zurückgekreuzt worden, so dass Mäuse dieses Stammes als Wildtyp-Kontrollen (WT) dienten. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität gezüchtet und stichprobenartig mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf den korrekten Genotyp hin untersucht.

DNA-Präparation: Ca. 0,5 cm der Schwanzspitze wurden in 700 µl Proteinase-K Puffer (SDS 1%, 50 mM TrisHCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 µg / ml Proteinase-K) gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 55° C wurden die Proteine mit 700 µl gepuffertem Phenol für 5 min extrahiert und anschließend für 10 min (13.000 rpm) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C). Der wässrige Überstand und ein Teil der Interphase wurde entnommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 700 µl Phenol / Chloroform (Mischungsverhältnis 1:1) erneut für 5 min extrahiert und anschließend zentrifugiert (s.o.). Die wässrige Phase wurde anschließend mit 700 µl Chloroform / Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 23:1) extrahiert und die DNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit einem Plastikspatel entnommen und in 500 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach Zentrifugation für 30 min (4° C, 13.000 rpm *Heraeus Biofuge fresco*) wurde der Alkohol abgenommen und die sedimentierte DNA für 30 min bei RT getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 µg RNase A, pH 7,5) gelöst und im Kühlschrank (4° C) aufgehoben.

Ansatz für die PCR Reaktion:

Volumen (µl)	Substanz	Konzentration
50	Taq-Puffer	10 ×
20	MgCl ₂	1,8 mM
1	dNTP	25 mM
2	Primer	1 µg / µl
2	Taq-Polymerase	5 U / µl
375	H ₂ O	
450	Gesamt	

Je 45 µl dieses Gemisches wurden vorgelegt und anschließend mit je 5 µl der Schwanz-DNA versetzt. Zur Detektion des WT Allels wurden folgende Primer verwendet:

eNOSwt-A: ACA AGT CCT CAC CGC CTT TTC

eNOSwt-B: ACA TCG CCG GCA GAC AAA CA

Fragmentgröße: 261 bp

Zur Detektion des eNOS-/- Allels wurden folgende Primer verwendet:

eNOSko-A: CCA ATG ACA AGA CGC TGG G

eNOSko-B: GCG CAA TGT GAG TCC GAA A

Fragmentgröße: 376 bp

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermo-Cycler (Firma *Perkin Elmer*) mit dem Programm 1 min 94° C, 2 min 55° C und 2 min 72° C für 40 Zyklen. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarosegel (1%) aufgetragen und die Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV Licht fotografiert.

2.1.2 Gewinnung und Präparation von Thrombozyten und Plasma

Zur Thrombozytenisolierung wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Gabe von Ketavet (80 mg / kg Körpergewicht; Wirkstoff Ketaminhydrochlorid; *Pharmacia&Upjohn* Erlangen) und Rompun (10 mg / Kg Körpergewicht; Wirkstoff Xylazinhydrochlorid; *BayerVital*, Leverkusen) anästhesiert, die Bauchhöhle eröffnet und die untere Hohlvene stumpf, mit Hilfe feiner Pinzetten, dargestellt. Nach Punktion der unteren Hohlvene im Retroperitoneum mit dem 21G-Venenpunktionsbesteck

„Butterfly“ (*Venisystem*, Abbot Ireland LTD, Sligo, Ireland) wurde das Blut unter leichter Aspiration entnommen.

2.1.3 Thrombozytenzählung und Blutbilderstellung

Um bei den Experimenten vergleichbare Thrombozytenkonzentrationen zu erhalten, wurden aus dem Vollblut der Mäuse und später aus den Thrombozytenpräparationen Blutbilder erstellt. Hierzu wurden die Proben (Gesamtansatz 150 μ l) immer 1:10 mit PBS verdünnt und als Doppelbestimmungen mit dem Zellzählgerät Sysmex K-4500 (*Toa Medical Electronics*, Kobe, Japan) ausgewertet.

2.2 Thrombozytenaktivierung und -stabilisierung

2.2.1 Thrombozytenaggregation

Die induzierte Thrombozytenaggregation wurde nach Born (7) durchgeführt. Vor der Blutentnahme wurde in das lange Schlauchsystem des 21G-„Butterfly“ 60 μ l ACD Puffer (85 mM Trinatriumzitraddihydrat, 65 mM Zitratsmonohydrat, 110 mM Glukose, pH 4,5) vorgegeben, so dass ein Verhältnis Blut:Antikoagulant von 10:1 eingestellt wurde. Sofort im Anschluß an die Blutentnahme wurde im Spritzenkolben, mit dem das Blut aspiriert wurde, das Vollblut in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS / 0,5% BSA versetzt. Der pH-Wert der erhaltenen Suspension war neutral. Insgesamt konnten so pro Maus ca. 500-800 μ l Vollblut gewonnen werden. Das Blut von drei Mäusen wurde in 4,5 ml Röhrchen vereinigt und zentrifugiert (290 \times g für 10 min bei RT). Das hierbei erhaltene Plättchenreiche Plasma (PRP) (ca. 1,5 bis 2 ml) wurde vorsichtig abpipettiert. Ein kleiner Rest des PRP wurde zurückgelassen, um ein Aufwirbeln der sedimentierten Erythrozyten und Leukozyten zu vermeiden. Das Sediment wurde anschließend zentrifugiert (2000 \times g für 10 min bei RT). Der Überstand wurde als Plättchenarmes Plasma (PPP) dazu verwendet, das PRP auf 250.000 Plättchen / μ l einzustellen.

Für die Aggregation wurden 250 μ l Plättchensuspension (250.000 Plättchen / μ l) in den Strahlengang eines Aggregometers (*Chronolog Corporation*, Haverton Ph. USA) gebracht und bei 37° C mit einem kleinen Rührmagneten (1.200 rpm) konstant gerührt. Als Referenz diente das PPP, das in den parallelen Strahlengang des

Aggregometers eingebracht wurde. Nach Temperieren bei 37° C für 3 min wurde die Aggregation mit Kollagen Typ I (aus Pferdesehnen, Firma *Chronolog Corporation*, Haverton Ph. USA) (0,36 – 10 µg / ml) ausgelöst.

In einigen Experimenten wurden Plättchen unmittelbar vor der Aggregation mit dem NO-Synthase Inhibitor L-NMMA (N^G-Methyl-L-Arginin; 100 µM Endkonzentration für 15 min bei 37° C im Rührschüttler) vorbehandelt.

Die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit (Transmission) der Küvettensuspension, bedingt durch Aggregatbildung und Ausfällung nach Stimulation der Thrombozytenaggregation, wurde mit dem Programm Aggro / Link (Firma *Chronolog Corporation*) über 15 min verfolgt und aufgezeichnet. Auswertparameter war die maximale Aggregation in % Transmissionszunahme.

2.2.2 Durchflusszytometrische CD62P (P-Selektin)-Bestimmung

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACSCalibur, *Becton Dickinson*, Heidelberg) kann man die Expression von Proteinen in Thrombozyten im Vollblut bestimmen. Dazu nutzt man einerseits, dass die Thrombozyten aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität eingestrahktes Licht anders streuen als Erythrozyten oder Leukozyten. Andererseits lässt sich die Expression von Proteinen durch Messung der Fluoreszenz Fluorochrom gekoppelter Antikörper ermitteln, die gegen das untersuchte Protein gerichtet sind. Vor dem Einsatz der spezifischen Antikörper wird, um ein Wirkungsoptimum zu erreichen, die Sättigungskonzentration für den einzelnen Antikörper bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung wird eine Isotypkontrolle durchgeführt, bei der anstelle des spezifischen ein Fluorochrom markierter unspezifischer IgG Antikörper desselben Isotyps verwendet wird.

Die durchflusszytometrische P-Selektin-Bestimmung wurde mit einem abgewandelten Protokoll nach Scharf et al. (58) durchgeführt. Dabei wurde das mit ACD-Puffer behandelte Vollblut mit PBS (10 × Phosphatgepufferte Saline: 2 g KCL, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl, 11,67 g Na₂HPO₄ auf einen Liter) so weit verdünnt, bis die Thrombozytenkonzentration 250.000 plts / µl betrug. Zur Stimulation wurde Thrombin

(Firma *Chronolog Corporation*) in einer Konzentration von 0,1 U; 0,5 U und 1 U eingesetzt. Um eine Aggregation zu verhindern wurden die Ansätze mit dem hemmenden Peptid GPRP (Endkonzentration 1,25 mM; *Calbiochem-Novabiochem*, San Diego, Californien USA) koinkubiert.

Die Expression des P-Selektins wurde mit Hilfe eines monoklonalen FITC gekoppelten IgG Antikörpers (Ratte- α -Maus, *Pharmingen international*) detektiert. Der Gesamtansatz betrug jeweils 50 μ l, in dem immer 5 μ l Vollblut und gleiche Volumina des unspezifischen (Maus-FITC-IgG₁-AK; *BD Biosciences*, San Jose, Californien, USA) oder des spezifischen Antikörpers enthalten waren. Je nach Thrombinkonzentration wurden unterschiedliche Mengen des Agonisten hinzugegeben. Die Menge an GPRP betrug bei Thrombin-Stimulation immer 5 μ l.

Nach 15 min Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 2 ml filtriertem PBS abgestoppt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer bei einer Flussrate von 500 Thrombozyten pro Sekunde gemessen (insgesamt wurden 10.000 Thrombozyten pro Ansatz gezählt). Die Auswertung erfolgte mit der CellQuest-Software (*Becton Dickinson*).

Die Geräteeinstellung war bei allen Messungen konstant:

Verstärkung Vorwärtsstreulicht = 10°

Vorwärtsstreulicht (FSC)-Trigger = 148

Photomultiplier in 4 Dekaden-Log-Einstellung;

Seitwärtsstreulicht (SSC) = 331 V

Fluoreszenzkanal I für FITC = 690 V

2.2.3 Durchflusszytometrische VASP-Analyse bei SNP-Stimulation

Als Grundlage für die durchflusszytometrische VASP-Bestimmung diente eine von Schwarz et al. beschriebene Methode (60). Danach wurde Blut mit CCD-Puffer (100 mM Natriumzitat, 7 mM Zitronensäure, 140 mM Glukose, 15 mM EGTA, pH 5,6) als Antikoagulanzen in einem Verhältnis von 5:1 (Blut:Antikoagulanzen) versetzt und 1:1 mit PBS verdünnt (Gesamtvolumen zwischen 1250 bis 2000 μ l / Maus) und in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (80 \times g, 10 min).

Das so gewonnene PRP wurde anschließend zentrifugiert ($500 \times g$ für 10 min) und das dabei erhaltene Thrombozytenpellet im Resuspensionspuffer (RP: 145 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM Glukose und 5 mM NaOH) aufgenommen. Um die Plättchen noch reiner zu bekommen wurden sie dann ein zweites Mal zentrifugiert (10 min bei $500 \times g$) und mit RP auf 500.000 Plättchen / μl eingestellt.

Je 50 μl dieser Plättchensuspension wurden mit jeweils 50 μl SNP (Sodiumnitroprusside, *Sigma*, St.Louis, MO) bei einer Endkonzentration von 0 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM SNP inkubiert. Nach 5 min wurden jeweils 50 μl Plättchensuspension entnommen und auf 50 μl eiskaltes Paraformaldehyd (Endkonzentration 3%) gegeben. Nach einer Fixierungszeit von 5 min wurden die Plättchen für 10 Sek. bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Das Pellet wurde anschließend in 100 μl PBS / 0,2% Triton X-100 aufgenommen und für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation der Plättchen ($3000 \times g$; 2 min bei RT) wurde das Pellet in 20 μl PBS mit 2,4 μg / ml 16C2 Antikörper (Antikörper 16C2, α -Phospho-VASP Ser₂₃₉, *Alexis Biochemicals*) aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Thrombozytensuspension zentrifugiert (2 min bei $3000 \times g$) und das Pellet in 100 μl PBS, mit dem sekundären Antikörper in einer Konzentration von 25 μg / ml (α -Maus-FITC-IgG Antikörper, Fc-Spezifisch, *Sigma*, St.Louis, MO) aufgenommen. Nach Inkubation für 20 min bei 4° C im Dunkeln wurden die Plättchen mit PBS gewaschen und der FACS-Analyse zugeführt.

Die Geräteeinstellung war bei allen Messungen konstant:

Verstärkung Vorwärtsstreulicht = 10°

Vorwärtsstreulicht (FSC)-Trigger = 148

Photomultiplier in 4 Dekaden-Log-Einstellung;

Seitwärtsstreulicht (SSC) = 331 V

Fluoreszenzkanal I für FITC = 751 V

2.2.4 Bestimmung der cGMP-Bildung in Thrombozyten unter SNP- und Kollagen-Stimulation

Die Messung der SNP- und Kollagen induzierten cGMP-Bildung in Plättchen erfolgte mittels dem „Biotrak cGMP enzymeimmunoassay“ Elisa der Firma *Amersham Pharmacia Biotech*. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde das Azetylierungsprotokoll angewendet, das einen größeren Sensitivitätsbereich abdeckt (2-512 fmol / well pro $1,25 \cdot 10^7$ Plättchen).

Die Blutentnahme erfolgte wie unter 2.1.6 beschrieben. Je 25 μ l Plättchensuspension wurden mit je 25 μ l Kollagen Typ I Lösung (0, 0,36 und 3 μ g / ml) bzw. mit 100 μ M SNP (jeweils gelöst in PBS und Endkonzentration) für 5 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Ethanol (99%, 0° C) gestoppt und die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (15 min, 4° C bei $2000 \times g$ (*Biofuge fresco, Heraeus Instruments*)). Der Überstand wurde entnommen, das Pellet in 100 μ l eiskaltem 65%igem Ethanol resuspendiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 4° C bei $2000 \times g$). Beide Überstände wurden vereinigt und über Nacht in der Vakuum-Zentrifuge (Speed vac concentrator, *Bachofen*) getrocknet.

In die über Nacht getrockneten Proben wurden 120 μ l Assay Puffer (0.05 M Natriumazetat in 0,02% BSA gelöst, pH 5,8) und 12 μ l Azetylierungspuffer (Azetanhydrid / Triethylamin) hinzugegeben. Hieraus wurden für jede Messung 50 μ l entnommen (Doppelbestimmungen) und auf mit 100 μ l Antiserum (Esel- α -Kaninchen) versetzte Wells gegeben. Die unspezifische Bindung wurde durch Einsatz von 150 μ l Assay Puffer ermittelt. Nach 2 h bei 4° C wurden die Ansätze mit 100 μ l Konjugat (sekundärer Antikörper, Kaninchen- α -cGMP), inkubiert und vier bis fünf mal gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation (30 min, RT) mit 200 μ l TMB Substrat (Tetramethylbenzidin / Wasserstoffperoxid, in 20%iger Dimethylformamidlösung) wurden die Ansätze mit 100 μ l 1M Schwefelsäure abgestoppt und die Lichtabsorption bei 450 nm im Elisa reader (*Packard, SpectraCount, Mikroplate Photometer, Illinois USA*) abgelesen. Die Auswertung erfolgte über eine Standardkurve unter der Verwendung der Plate Reader-Software (ebenfalls *Packard*).

2.3 Expressionsanalysen und NOS-Enzymaktivität

2.3.1 VASP-Expressionsanalyse mit der Western-Blot-Methode

Bei der VASP-Expressionsanalyse im Western-Blot wurde nach der Methode von Smolenski et al. verfahren (66). Die Blutentnahme, Antikoagulation und Thrombozytenpräparation erfolgte wie unter 2.1.6 beschrieben. Je 90 μ l der im RP aufgenommenen Plättchen (500.000 / μ l) wurden mit 5 μ l PBS (Kontrolle) oder 5 μ l Kollagen Typ I aus Pferdesehnen (3 μ g / ml Endkonzentration; gelöst in PBS) oder 100 μ M SNP (Endkonzentration) versetzt.

Da insgesamt $5 \cdot 10^8$ Plättchen ungefähr 1 mg Gesamtprotein enthalten, von denen wiederum 2,45 μ g dem VASP-Protein entsprechen enthielt jeder Ansatz etwa 2,2 μ g VASP-Protein.

Nach 5 min Inkubation mit Kollagen und SNP im Thermomixer (Fa. *Eppendorf*) bei 37° C wurde die Plättchensuspension mit 45 μ l vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer (2,5 ml 1M Tris, pH 6,8, 4 ml 20% SDS, 2 ml Glycerol, 1 mg Bromphenolblau, 1,5 ml H₂O, 50 mM DTT) lysiert und anschließend für 10 min bei 95° C aufgeköcht. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proteinextrakte (ca. 140 μ l Probenvolumen) mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einem Elektrotransfer vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Western-Blot-Verfahren). Dabei kam als Transferpuffer (20% Ethanol, 14,4 g Glyzin, 3,02 g Tris ad 1l H₂O für ca. 2-3 h bei 2-3 mA / cm² und 55 V) zum Einsatz.

Die Qualität des Transfers wurde durch Ponceau S-Färbung (0,1% Ponceau S Natrium-Salz in 5% Essigsäure) überprüft. Nachdem die Ponceau S-Färbung mit Leitungswasser von der Nitrozellulosemembran abgewaschen worden war, wurde die Nitrozellulose für 2 h in 4% Milchpulver gelöst in PBS, 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100 inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen auf der Membran mit Protein abzusättigen. Daraufhin folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS / 4% Milchpulver, 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100 über Nacht bei 4° C. Als primäre Antikörper wurden der polyklonale M4-Antikörper (Kaninchen- α -VASP; 1:1500-1:3000) und der monoklonale 16C2-Antikörper (Maus- α -P-VASP; 1:100-1:200, U. Walter, Würzburg) eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die

Nitrozellulose für 30 min in PBS / 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100 und zweimal für 10 min in PBS / 0,05% Tween 20 gewaschen. Zur Detektion der Antikörperbindung erfolgte anschließend eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege- α -Maus bzw. Esel- α -Kaninchen; 1:10.000 für 4 h in PBS / 4% Milchpulver, 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100), der mit Peroxidase aus Meerrettich (HRP) gekoppelt war. Die Membran wurde anschließend gewaschen (1 \times 30 min in PBS mit 0,05% Tween 20 und 0,3% Triton X-100, 2 \times 10 min in PBS mit 0,05% Tween 20) und mit Luminol-Wasserstoffperoxid Lösung (ECL-System, *Amersham*) inkubiert. Dabei wurde die HRP abhängige Lumineszenz (Emission bei 428 nm) mittels Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR, *Rochester*, New York USA) detektiert. Die Auswertung der Banden erfolgte densitometrisch (Personal Densitometer, *Molecular Dynamics*).

2.3.2 eNOS-Expressionsanalyse in Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten mit der Western-Blot-Methode

Die Blutentnahme, Antikoagulation und Thrombozytenpräparation erfolgten wie unter 2.1.6 beschrieben. Jeweils 50 μ l Protein A / G Sepharose Suspension (*Oncogene Research Products*, Boston) wurden mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit 5 μ l eNOS-Antikörper (Kaninchen- α -Maus-Antikörper, polyklonal, *Transduction Laboratories*, Lexington Kentucky) beladen. Das Thrombozytenpellet wurde dann in 1 ml Lyse-Puffer [TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8) Triton X-100 (0,5%) / PMSF (1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride) / Proteinaseinhibitor Cocktail (1:1000 verdünnt; 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF), trans-Epoxy succinyl-L-leuylclamido-(4-guanidino)butan (E-64), Bestatin, Leupeptin, Aprotinin und Natrium-EDTA; *Sigma*, Saint Louis, Missouri USA)] gelöst und zu der Sepharose gegeben. Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 4° C geschüttelt, herunterzentrifugiert und der Überstand erneut auf mit Antikörpern inkubierte Protein A / G Sepharose gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h bei 4° C wurde dieser Ansatz auf den ersten Sepharoseansatz gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit herunterzentrifugiert. Nachdem der Überstand entnommen war, wurde die Sepharose 5 \times mit 750 μ l Lyse-Puffer gewaschen, mit 50 μ l vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer (100 mM DTT) bei 95° C für 10 min aufgekocht und auf Eis gestellt.

Zusätzlich zu den Thrombozyten wurden auch Erythrozyten auf eine eNOS-Expression untersucht. Dazu wurde das nach der ersten Zentrifugation neben dem PRP gewonnene Erythrozytenkonzentrat $3 \times$ in RP gewaschen (10 min bei $500 \times g$ und RT). Aus dieser Zellsuspension wurden 200 μ l entnommen und mit 800 μ l Lyse-Puffer versetzt und wie oben beschrieben mit Protein A / G Sepharose inkubiert. Daneben wurden jeweils 100 μ l der Thrombozyten- und Erythrozytenüberstände nach Immunpräzipitation mit 40 μ l vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer (70 mM DTT) versetzt, aufgekocht und auf Eis gestellt. Danach wurden die kompletten Ansätze mit einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (7,5% Acrylamid-Gel). Als Positivkontrolle für die eNOS wurden Proteinextrakte aus WT Mäuseherzen verwendet. Der Proteintransfer und die Antikörperinkubation bzw. das Waschen der Membran erfolgten wie beschrieben. Zur eNOS-Detektion dienten α -eNOS Antikörper (1:1000 in PBS / 4% Milchpulver, 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100; polyklonal, Kaninchen, *Transduction Laboratories*, Lexington Kentucky) und HRP gekoppelte Ziege- α -Kaninchen Antikörper (1:10.000 in PBS / 4% Milchpulver, 0,05% Tween 20, 0,3% Triton X-100, *Calbiochem*, San Diego, Ca, USA). Der Nachweis erfolgte mittels ECL-System (*Amersham*).

2.3.3 Messung der eNOS-Aktivität

Der Citrullin-Assay wurde nach Vorgaben von Bredt und Schmidt (19) durchgeführt. Das Citratblut einer WT Maus (siehe 2.1.6) wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (10 min bei $80 \times g$, RT). Das dabei erhaltene PRP wurde entnommen, gepoolt und zentrifugiert (10 min bei $80 \times g$, RT). Das so gewonnene Pellet wurde in PBS aufgenommen, zentrifugiert (10 min bei $80 \times g$, RT) und auf Eis gelagert. Nach Solubilisierung des Pellets in 150 μ l Homogenisierungspuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 15 μ M Tetrahydrobiopterin und 0,5% Triton X-100), wurden je 50 μ l des Proteinextraktes auf 300 μ l Reaktions-Cocktail (50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM NADPH, 1 μ M FAD, 1 μ M Calmodulin, 1 mM CaCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, 10 μ M Tetrahydrobiopterin, 200 μ M L-Arginin, L-[^3H]L-Arginin ($8 \cdot 10^5$ cpm / Probe)) gegeben. In Reaktionsgefäß (RG) 1 wird die Gesamt NOS-Aktivität gemessen. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde in RG 2 der NO-Synthase Inhibitor Ethylisothioharnstoff (ETU) vorgelegt (Endkonzentration 100 μ M).

Zur Differenzierung von Ca^{2+} abhängiger cNOS (eNOS, nNOS) und Ca^{2+} unabhängiger iNOS-Aktivität wurde in einem weiteren Röhrchen EDTA (Endkonzentration 20 mM) vorgelegt.

Die Reaktion (37°C für 60 min) wurde mit 200 μl eiskaltem Stop-Puffer (50 mM HEPES, pH 5,5, 2 mM EDTA) abgestoppt, und der Gesamtansatz auf ein Reaktionsgefäß mit 500 μl Dowex-Austauscherharz (50X8-400, Sigma), das vorher mit Millipore-Wasser equilibriert wurde, gegeben. Da das während der Inkubation entstandene [^3H]Citrullin bei einem pH von 5,5 eine neutrale Ladung besitzt, wurde es nicht durch das Austauscherharz zurückgehalten. So konnte nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min bei RT der Überstand (500 μl) aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß entnommen und über Nacht im Szintillationszähler gemessen werden.

Die Gesamt-NOS-Aktivität errechnet sich wie folgt: $\text{cpm Gesamt} - \text{cpm ETU}$

Die iNOS-Aktivität ergibt sich aus: $\text{cpm EDTA} - \text{cpm ETU}$

Die cNOS-Aktivität ergibt sich aus: $\text{cpm Gesamt} - \text{cpm EDTA}$

2.4 In vivo Versuche

2.4.1 Blutungszeit

Zur Bestimmung der Blutungszeit wurden WT und eNOS-/- Mäuse mit einer intraperitonealen Gabe von 50 μl Avertin (10 g Tribromethanol auf 10 ml tertiären Amylalkohol 1:10 mit PBS verdünnt) anästhesiert. Danach wurde von der Schwanzspitze ein 1 cm langes Gewebestück abgetrennt und das blutende Schwanzende in ein mit 37°C warmer PBS-Lösung gefülltes Becherglas gehalten. Die Zeit bis zum primären Sistieren der Blutung wurde gemessen (64).

2.4.2 Induktion einer Thrombose durch Intimaläsion

Die Denudation der Intima der A. carotis communis wurde nach der Methode nach Kurz et al. (36) durch lokale Applikation von Eisen-III-chlorid (FeCl_3) erreicht. Nach einer intraperitonealen Anästhesie mit 50 μl Avertin wurden die Mäuse auf dem OP-Tisch fixiert. Unter dem Binokular wurde der Hals der Maus mit einem lateral

gelegenen Längsschnitt eröffnet und die hier gelegene Gefäß- Nervenstrasse (Ansa cervicales) stumpf, mit Hilfe von feinen Pinzetten, dargestellt. Wichtig dabei war eine Verletzung des N. vagus zu vermeiden. Daher wurde unter die freigelegte A. carotis communis ein 4 mm breites Stück Parafilm gelegt, um das umgebende Gewebe vor der folgenden Behandlung zu schützen. Daraufhin wurden 5 µl einer Eisen-III-chlorid-Lösung für 1 min auf den isolierten Gefäßabschnitt gegeben. Das Gefäßsegment wurde anschließend mit PBS gewaschen.

2.4.2.1 Validierung der Gefäßläsion

Zur Validierung der Gefäßläsion wurde in Vorversuchen nach FeCl₃-Exposition der Parafilm entfernt, die A. carotis communis in die anatomisch korrekte Lage gelegt und die Wunden der Mäuse mit einer Hautnaht versorgt. In diesen Ansätzen wurde 7,5% Eisen-III-chlorid (FeCl₃) eingesetzt. Da diese Konzentration keine adäquate arterielle Thrombose induzieren konnte, wurde in den Ansätzen zur Bestimmung der Verschlusszeit eine 12,5%ige Eisen-III-chlorid (FeCl₃) Lösung verwendet.

Zwei, drei, fünf und sechs Tage nach dem operativen Eingriff wurden die Mäuse zur Auswertung ebenfalls mit 50 µl Avertin anästhesiert und mit einer 150 µM Evans-Blau Lösung, die kollagene Fasern aber kein Endothel anfärbt, perfundiert. Hierzu wurde der Brustkorb mit einer Schere eröffnet und das Herz aufgesucht. Nachdem das Perikard eröffnet war, wurde eine 21G-„Butterfly“ (siehe oben) im linken Herzventrikel der Maus platziert und mit einer Klemme fixiert. Nachdem dann der rechte Vorhof eröffnet war, wurde mit einem Perfusionsdruck von 80 mmH₂O Wassersäule der gesamte Kreislauf und so auch die A. carotis communis mit der Evans-Blau-Lösung perfundiert. Nach 5 min wurde das Gewebe mit Paraformaldehyd-Lösung (4%) für 5 min bei 80 mmH₂O Perfusionsdruck fixiert. Daraufhin wurde vom eröffneten Brustkorb aus der Hals stumpf freipräpariert, bis beide Karotiden zum Vorschein kamen, wobei die rechte Seite als Negativkontrolle diente. Danach konnte mit Hilfe eines Stechzirkels (jede Messung wurde dreifach wiederholt und dann gemittelt) das Ausmaß der Intimaläsion zu den einzelnen Zeitpunkten bestimmt werden.

2.4.3 Verschlusszeit - Time To Occlusion (TTO)

In Abwandlung des Protokolls von Kurz et al. (36) erfolgte die Bestimmung des Gefäßverschlusses über eine Messung des Blutflusses durch die A. carotis communis.

Nach der FeCl₃ (12%) induzierten Intimaläsion wurde um die behandelte A. carotis communis ein Flusskopf (Flow Probe der Firma *Transonic Systems Inc.*, Ithaca, NY USA) platziert. Ein Sistieren des Blutflusses wurde als vollständiger Gefäßverschluss infolge eines thrombotischen Verschlusses gewertet.

2.5 Statistik

Deskriptive statistische Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde auf Normalverteilung geprüft. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Im konsekutiven Post-Hoc Test (Bonferroni) erfolgte der Einzelgruppenvergleich. Bei direktem Gruppenvergleich (Blutungszeit, Time To Occlusion) wurde der t-Test nach Student durchgeführt. Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSSPaketes (Statistical package for analysis in social sciences, release 11, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse von isolierten Thrombozyten

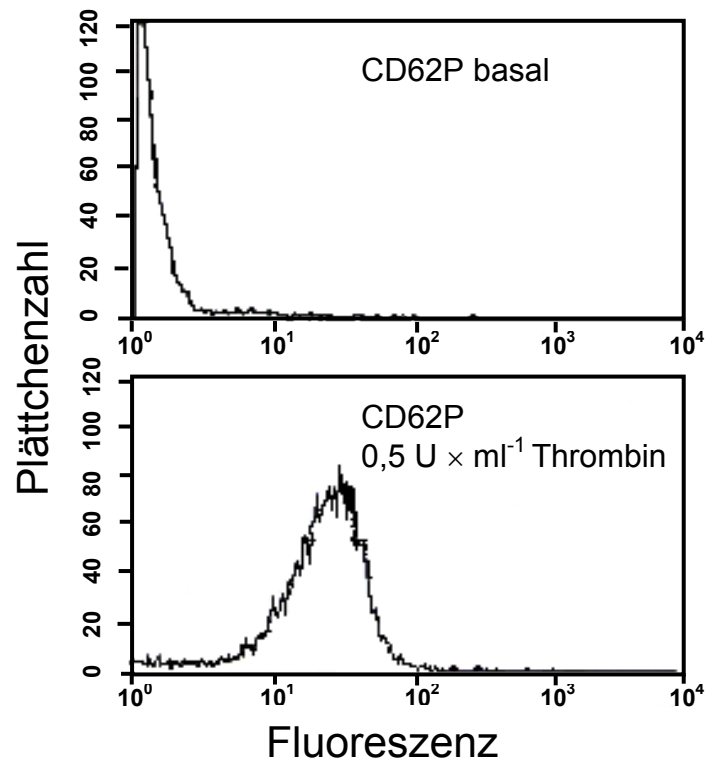
3.1.1 Thrombozytenkonzentration

Das Blutbild aus WT und eNOS^{-/-} Mäusen war nicht unterschiedlich hinsichtlich der Thrombozytenkonzentration im Vollblut (WT: $8,0 \pm 0,5 \times 10^5 / \mu\text{l}$; $8,7 \pm 1,3 \times 10^5 / \mu\text{l}$) bei jeweils n=10 Blutproben.

3.1.2 Thrombin induzierte Plättchenaktivierung

Die Funktion der eNOS und des nachgeschalteten Signaltransduktionsweges (lösliche Guanylatzyklase (sGC), cGMP-abhängige Proteinkinase-I (cGK-I)) bei der Plättchenaktivierung und -aggregation wurde aus Vollblut und plättchenreichem Plasma (PRP) aus Wildtyp (WT) und eNOS defizienten (eNOS^{-/-}) Mäusen untersucht. Als Indikator für die Aktivierung der Thrombozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) die Thrombin induzierte Oberflächenexpression des aus den α -Granula stammenden P-Selektins (CD62P) untersucht. Abbildung 1A zeigt repräsentative Registrierungen für die CD62P-Expression unter basalen Bedingungen bzw. nach Stimulation mit $0,5 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$ Thrombin. Es ist eine ca. 10-fache Zunahme der Fluoreszenz nach Thrombin-Stimulation erkennbar. Die quantitative Auswertung der konzentrationsabhängigen Plättchenaktivierung durch Thrombin ($0,1 - 1 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$) von n=6 Experimenten ist in Abbildung 1B dargestellt. Thrombin steigerte bei WT Mäusen konzentrationsabhängig die CD62P-Expression ca. 10-fach. Bei den eNOS^{-/-} Plättchen war die basale CD62P-Expression genauso stark ausgeprägt wie bei den WT Tieren. Die Gabe von Thrombin führte bei eNOS^{-/-} Plättchen zu einem gleichen Maximalwert an CD62P-Expression. Bei keiner der verwendeten Thrombinkonzentrationen war ein signifikanter Unterschied zwischen WT und eNOS^{-/-} Mäusen nachweisbar.

A



B

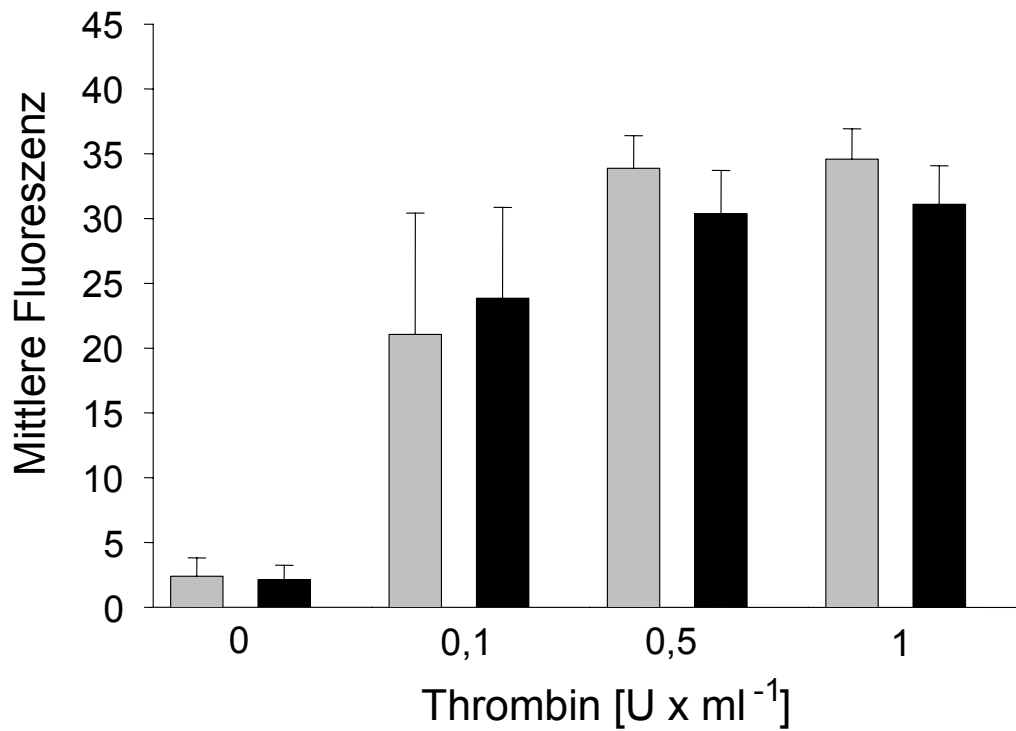


Abbildung 1: Thrombin induzierte Plättchenaktivierung.

A: Fluoreszenz-Histogramm. Darstellung der CD62P-Expression unter basalen Bedingungen (oben) und nach Stimulation mit 0,5 U × ml⁻¹ Thrombin (unten). B: Quantitative Daten für die konzentrationsabhängige Zunahme der CD62P-Expression nach Stimulation mit Thrombin (0,1 - 1 U × ml⁻¹). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von n=6 unabhängig voneinander durchgeführter Experimente mit Plättchen aus WT (grauer Balken) und eNOS^{-/-} (schwarzer Balken) Mäusen.

3.1.3 Kollagen induzierte Plättchenaggregation

Um die Rolle der eNOS bei der Plättchenaggregation als Antwort auf Kollagen ($0,36 - 10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) zu untersuchen, wurden Aggregations-Studien nach Born durchgeführt (7). Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Thrombozytenaggregation von WT und eNOS^{-/-} Plättchen nach Stimulation mit Kollagen ($10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$). Sowohl die Kinetik als auch das maximale Ausmaß der Aggregation sind bei WT und eNOS^{-/-} Plättchen gleich. Abbildung 3 fasst die Ergebnisse für die konzentrationsabhängige Aggregation durch Kollagen ($0,36 - 10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) zusammen. Bei den eingesetzten Konzentrationen von $0,36 \mu\text{g} - 10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ gibt es keine Unterschiede zwischen WT und eNOS^{-/-} Plättchen.

Um zu klären, ob der Verlust der eNOS-Funktion in einer kompensatorischen Hochregulation einer anderen NOS-Isoform (nNOS, iNOS) resultierte, wurden weitere Aggregationen mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA ($100 \mu\text{M}$) durchgeführt. Dabei führte die NOS-Hemmung weder in WT noch in eNOS^{-/-} Plättchen zu einer Veränderung der Kollagen vermittelten Aggregation bei den eingesetzten Kollagenkonzentrationen von 1 bzw. $3,3 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

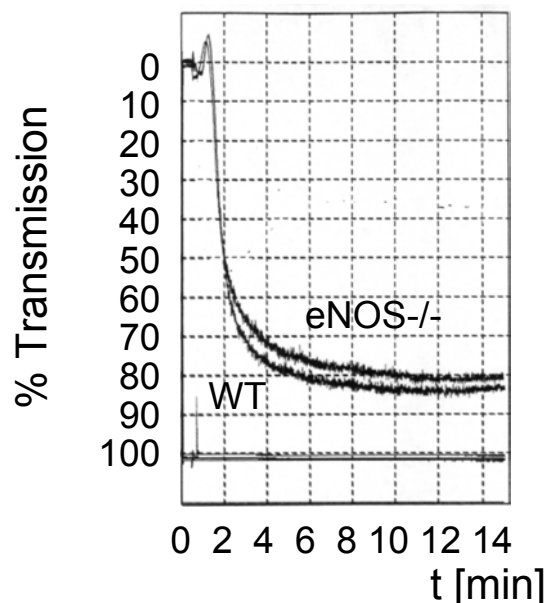


Abbildung 2: Kollagen induzierte Aggregation von WT und eNOS^{-/-} Plättchen. Repräsentative Darstellung der Plättchenaggregation *in vitro* von WT und eNOS^{-/-} Plättchen nach Gabe von $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Kollagen.

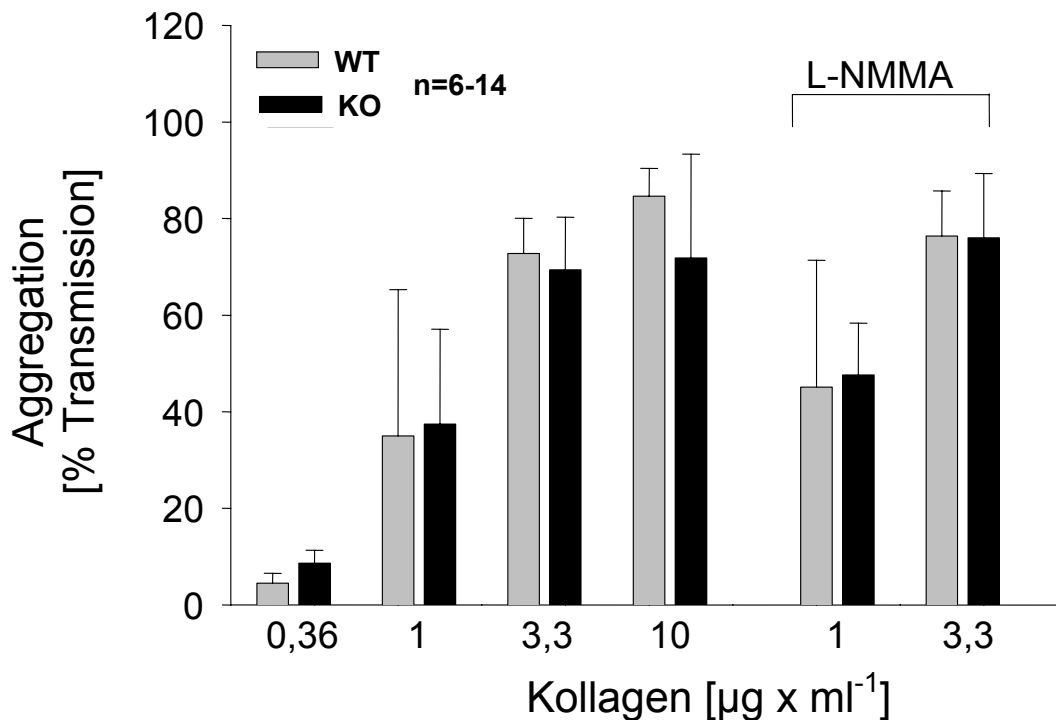


Abbildung 3: Kollagen induzierte Aggregation von WT und eNOS^{-/-} Plättchen. Quantitative Daten für den konzentrationsabhängigen Effekt von Kollagen (0,36 – 10 µg × ml⁻¹) bei WT (graue Balken) und eNOS^{-/-} (schwarze Balken) Plättchen. Dabei repräsentieren die Balken die Mittelwerte ± Standardabweichungen von n=6-14 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. L-NMMA: Die Plättchen wurden für 15 min mit 100 µM des NOS Inhibitors L-NMMA vorinkubiert.

3.1.4 SNP induzierte cGMP-Bildung

In weiteren Experimenten wurde der dem NO nachgeschaltete Signaltransduktionsweg (gelöste Guanylatzyklase (sGC) bzw. cGMP-abhängige Proteinkinase-I (cGK-I)) in WT und eNOS^{-/-} Plättchen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Plättchen mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP) inkubiert und die Aktivität der Guanylatzyklase durch Messung des gebildeten cGMP bestimmt. Abbildung 4 zeigt, dass SNP (100 µM) zu einer deutlichen Steigerung der cGMP-Bildung über das Basalniveau hinaus führte. Die Aktivität der sGC stieg dann bei 300 µM SNP etwa 30-fach über das Basalniveau an. In eNOS^{-/-} Plättchen war sowohl das Ausmaß der basalen als auch der SNP induzierten cGMP-Bildung nicht signifikant unterschiedlich zu den WT Mäusen.

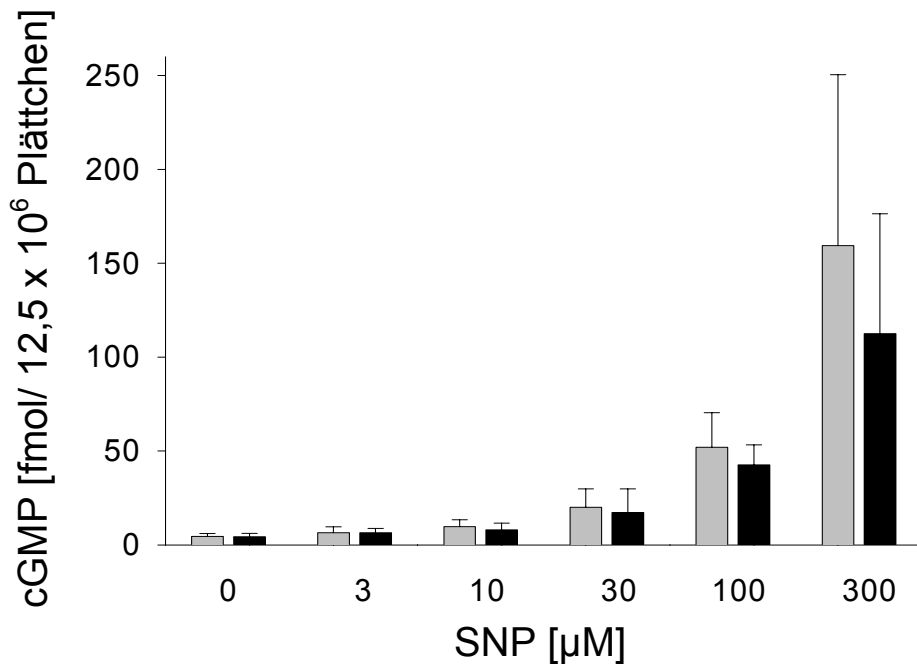


Abbildung 4: Analyse des cGMP-Signaltransduktionsweges in WT und eNOS^{-/-} Plättchen.

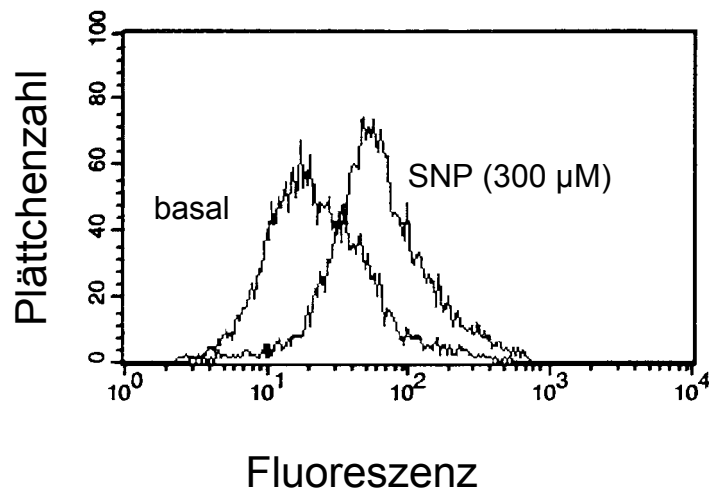
A: Analyse der SNP induzierten cGMP-Bildung durch ELISA bei WT (graue Balken) und eNOS^{-/-} (schwarze Balken) Plättchen. Aufgetragen sind die verschiedenen SNP-Konzentrationen (0, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM und 300 μM) gegen die Produktion von cGMP in fmol pro $1,25 \cdot 10^7$ Plättchen. Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte \pm Standardabweichungen von n=7 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht signifikant.

3.1.5 SNP induzierte VASP-Phosphorylierung

Die Aktivität der cGK-I wurde durchflusszytometrisch anhand der Phosphorylierung des Serin₂₃₉ des VASP-Proteins unter Verwendung des P-Serin₂₃₉-VASP spezifischen 16C2 Antikörpers bestimmt. Wie auf Abbildung 5B zu erkennen ist, induzierte SNP sowohl in den WT als auch in den eNOS^{-/-} Plättchen eine konzentrationsabhängige, weitgehend parallel verlaufende Zunahme der VASP-Phosphorylierung. Ab 30 μM SNP kam es bei beiden Mäusestämmen zu einer im Vergleich zum Basalwert deutlichen Steigerung der VASP-Phosphorylierung. Seine Maximalwerte erreichte das P-VASP bei 100 μM SNP. Bei 300 μM SNP fiel der Phosphorylierungsgrad des VASP wieder ab.

Abbildung 5A zeigt exemplarisch die Zunahme der VASP-Phosphorylierung nach Gabe von SNP (300 μM). Die etwa 5-fache Steigerung des Fluoreszenzsignals zeigt eine Zunahme der Phosphorylierung durch die Zunahme der cGK-I Aktivität an.

A



B

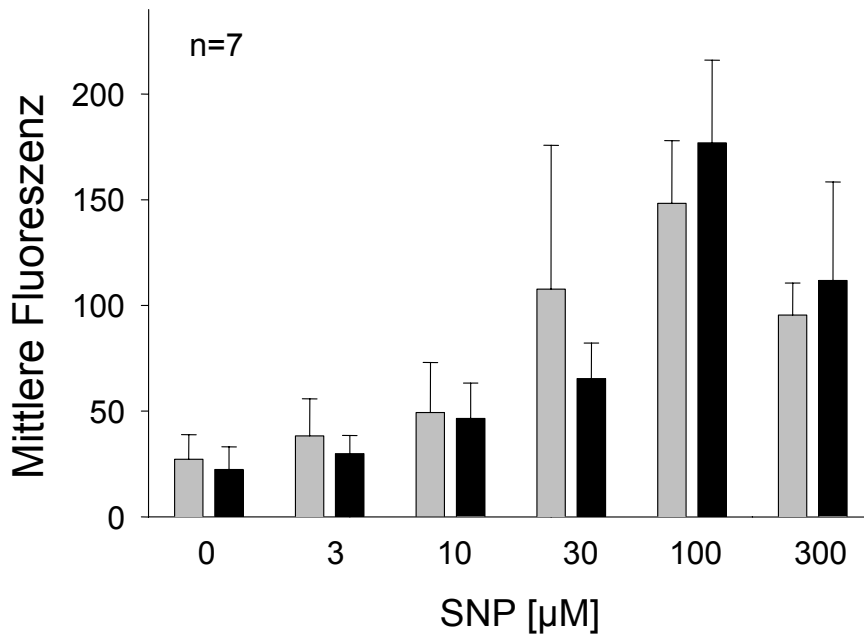


Abbildung 5: Analyse des cGK-I-Signaltransduktionsweges in WT und eNOS^{-/-} Plättchen.

A: Das Histogramm zeigt Plättchen unter basalen und mit SNP (300 µM) stimulierten Bedingungen. Zu erkennen ist eine Rechtsverschiebung der Kurve unter der SNP-Stimulation. B: Die SNP induzierte VASP-Phosphorylierung wurde in permeabilisierten Plättchen mit Hilfe des P-VASP spezifischen Antikörpers 16C2 detektiert, der primär die von der cGK-I phosphorylierte Stelle erkennt (Serin₂₃₉). Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte ± Standardabweichungen von n=7 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Plättchen aus WT (graue Balken) und eNOS^{-/-} (schwarze Balken) Mäusen. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht signifikant.

3.1.6 Kollagen induzierte VASP-Phosphorylierung und cGMP-Bildung

Es wurde weiterhin untersucht, inwieweit eine Kollagen-Stimulation von Plättchen zu einer Aktivierung des NO-cGMP-Weges führt. Als Indikator diente wie bei den Experimenten mit SNP die cGK-I abhängige Phosphorylierung des VASP. Um das Gesamtausmaß der VASP-Expression in Plättchen aus WT und eNOS^{-/-} Mäusen zu untersuchen, wurde das VASP mit dem polyklonalen M4-Antikörper auf Western-Blots nachgewiesen. Der Antikörper erkennt das VASP sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand. Da die Phosphorylierung am Serin₁₅₇ (PKA abhängig) zu einer geringeren Laufgeschwindigkeit des VASP im Gel führt, so dass das VASP-P-Serin₁₅₇ bei ca. 50 kDa im Gel wandert, kann mit diesem Antikörper nicht nur das VASP-Expressionsniveau, sondern auch der Anteil des am Serin₁₅₇ phosphorylierten VASP bestimmt werden. Wie Abbildung 6A zeigt, wanderte der größte Teil des VASP bei einer Größe von 46 kDa. Nur eine kleine Fraktion wanderte infolge der Phosphorylierung des Serin₁₅₇ bei einem MW von 50 kDa. Die densitometrische Auswertung der Signale ergab, dass es keine Unterschiede im Gesamtgehalt an VASP zwischen WT und eNOS^{-/-} Plättchen gab (n=4). Wie man auf Abbildung 6B erkennen kann, ist der relative Anteil der 50 kDa-Isoform des VASP zwischen WT und eNOS^{-/-} Mäusen nicht unterschiedlich. Auch eine Stimulation mit $3 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Kollagen führte nicht zu einer Steigerung des Anteils der 50 kDa Isoform. Um direkt den Gehalt der Serin₂₃₉-Phosphorylierung zu analysieren, welches das bevorzugte Substrat für die cGK-I darstellt, wurden weitere Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen 16C2-Antikörper durchgeführt. Dabei waren weder unter basalen noch unter Kollagen stimulierten Bedingungen spezifische Banden zu erkennen (Abb. 6A).

Parallel zu den Messungen der VASP-Phosphorylierung wurde das Ausmaß der cGK-I-Stimulation durch Messung des gebildeten cGMP untersucht. Dazu wurden cGMP-Messungen unter basalen Bedingungen, sowie bei Stimulation der Plättchen mit $0,36$ und $3 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Kollagen durchgeführt. Wie auf Abbildung 7 zu erkennen ist, führte die Kollagen-Stimulation zu einer leichten Zunahme der cGMP-Synthese in den WT Plättchen, ohne jedoch signifikant zu werden. Inhaltlich zeigte sich das gleiche Ergebnis in den Messungen der Plättchen aus den eNOS^{-/-} Mäusen. Die beobachteten Veränderungen lagen jedoch weit unter den mit SNP ($100 \mu\text{M}$)

erreichten cGMP-Werten, so dass Kollagen allenfalls zu einer minimalen Induktion der Guanylatzyklase führt.

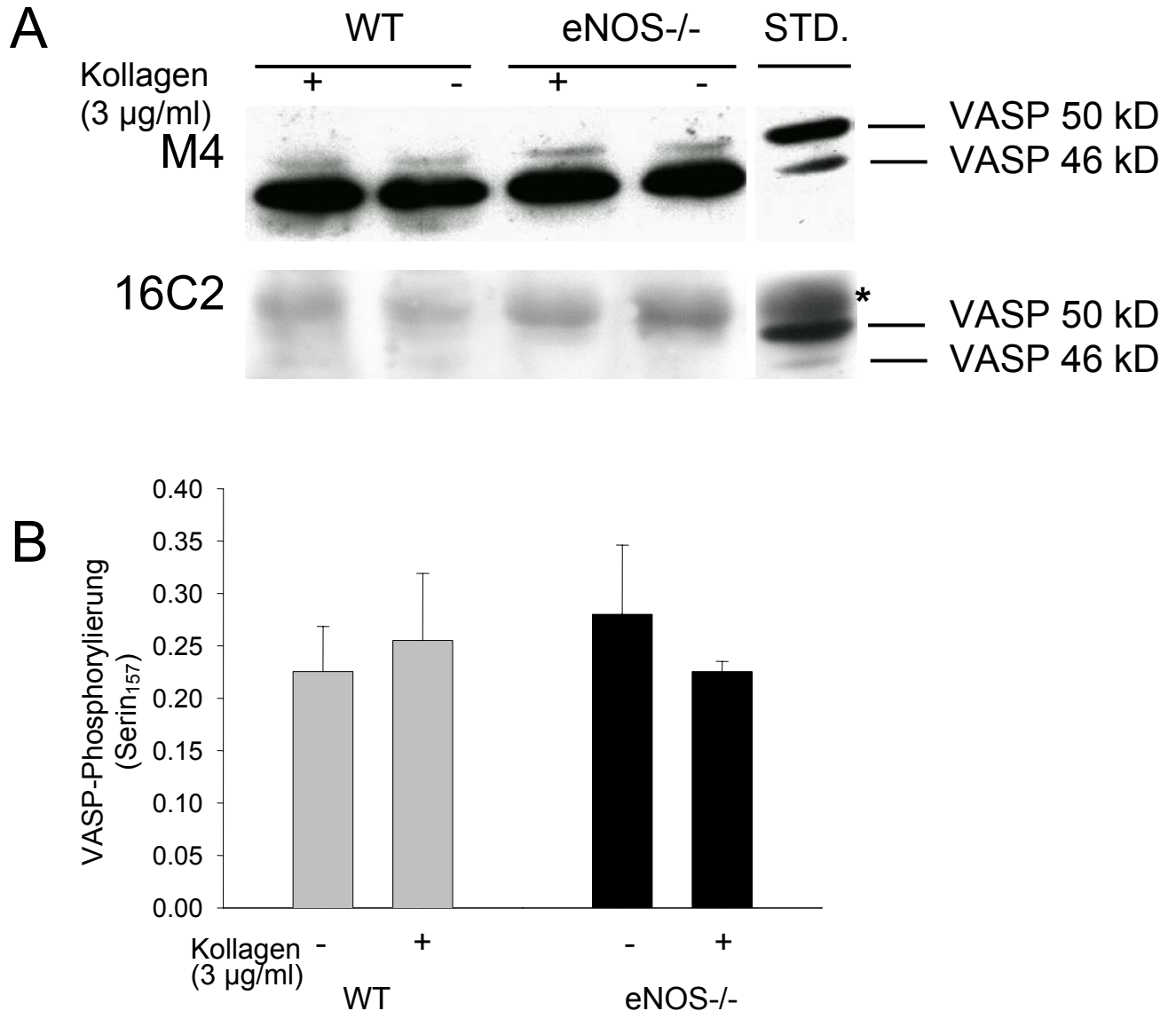


Abbildung 6: Effekt von Kollagen auf den sGC / cGK-I-Signaltransduktionsweg in WT und eNOS^{-/-} Plättchen. A: Western-Analyse der VASP-Phosphorylierung in Antwort auf eine Kollagenstimulation. Nachweis der 46 und 50 kDa P-Serin₁₅₇-VASP-Isoform unter Zuhilfenahme des M4-Antikörpers und des P-VASP-Serin₂₃₉ mit Hilfe des 16C2-Antikörpers. STD: Der Standard für beide Isoformen wurde erhalten durch Stimulation der Plättchen mit 100 µM SNP für 5 min. Aufgrund der starken Induktion der sGC / cGK-I ist die 50 kDa Form überrepräsentiert. Die mit * markierte Bande, die in allen Extrakten vorhanden war, stellt die schwere Kette von IgG aus Mäusen dar. B: Densitometrische Analyse der VASP-Serin₁₅₇-Phosphorylierung in WT (graue Balken) und eNOS^{-/-} Plättchen. Die Balken repräsentieren die Durchschnittswerte ± Standardabweichungen der Quotienten aus den P-VASP / VASP-Banden, wie sie in Abb. 6A zu sehen sind (n=4).

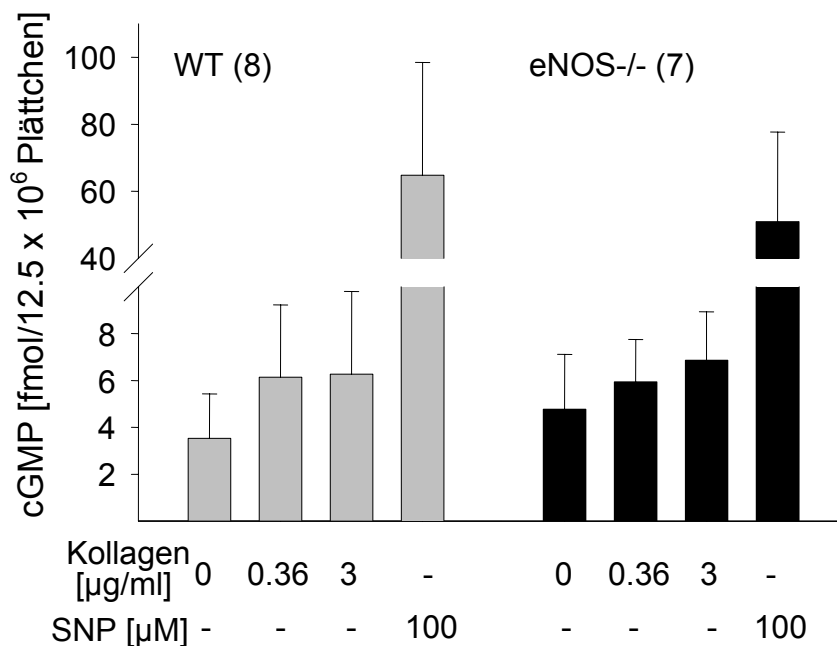


Abbildung 7: Effekt von Kollagen auf die cGMP-Bildung. Die Plättchen wurden für 5 min mit Kollagen stimuliert und das cGMP gemessen. Zum Vergleich wurde eine Probe parallel mit 100 µM SNP inkubiert. Die Balken repräsentieren Durchschnittswerte ± Standardabweichung von n=8 WT (graue Balken) und n=7 eNOS^{-/-} (schwarze Balken) Proben.

3.2 Expressionsanalyse und Aktivität der NOS

Da die funktionellen Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Beteiligung der eNOS bei der Modulation der Thrombozytenfunktion in der Maus zeigten, wurde eine Western-Blot-Analyse nach Immunpräzitation der eNOS durchgeführt. Parallel wurden Erythrozyten untersucht. Als Positivkontrolle für die Reaktionsbedingungen wurden Gesamtproteinextrakte aus WT Mäuseherzen bzw. als Negativkontrolle aus eNOS^{-/-} Herzen parallel behandelt.

3.2.1 eNOS-Expressionsanalyse in Thrombozyten und Erythrozyten

Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten. Während die Positivkontrolle (WT Herz) eine starke Anreicherung der eNOS durch Immunpräzitation (IP) im Vergleich zum Überstand (SN) aufweist, bleibt eine entsprechende Reaktion bei der Negativkontrolle (Herz KO) aus. Selbst bei einer

Langzeitexpression der Membran (dunkelgraue Farbe) ist ein eNOS spezifisches Signal weder in Thrombozyten noch in Erythrozyten nachweisbar.

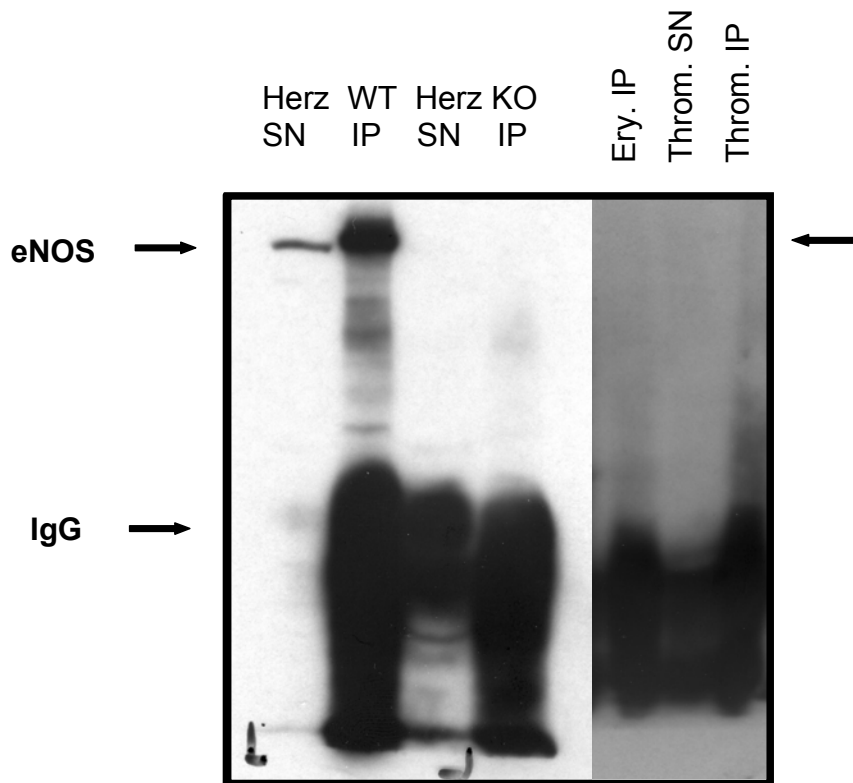


Abbildung 8: eNOS-Expressionsanalyse in Thrombozyten und Erythrozyten.

Aufgetragen sind die Überstände (Sn) und Immunpräzipitate (IP) aus WT und eNOS^{-/-} Herzen als Positiv- und Negativkontrolle, sowie entsprechende Proben aus WT Thrombozyten und Erythrozyten. Der eingesetzte eNOS / NOSIII-Antikörper (Kaninchen, *Transduction Laboratories*) detektiert eine positive Bande auf Höhe der eNOS (140 kDa) bei der Positivkontrolle, mit entsprechender Anreicherung durch IP. Auf der Höhe von ca. 55 kDa erkennt man besonders in den IP-Banden eine starke Schwärzung des Filmes, die durch die bei der IP eingesetzten IgG-Antikörper zu erklären ist.

3.2.2 NOS-Aktivität im Citrullin-Assay

Zusätzlich zum Nachweis der eNOS auf Proteinebene wurde versucht, eine NOS-Aktivität in Plättchen mit Hilfe des Citrullin-Assays zu detektieren. Dabei wurde zwischen den konstitutiven Isoformen (eNOS, nNOS) und der induzierbaren NO Synthase (iNOS) aufgrund ihrer unterschiedlichen Ca²⁺-Abhängigkeit unterschieden.

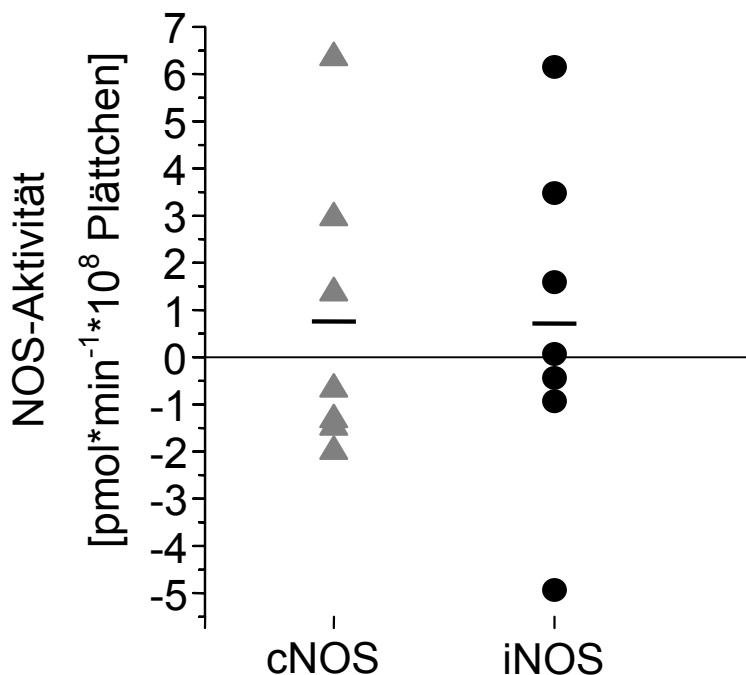


Abbildung 9: NOS-Aktivität in murinen Plättchen.

Auf der Ordinate sind Einzel- und Mittelwerte für die NOS-Aktivität aufgetragen (normiert auf $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ für $1 \cdot 10^8$ Plättchen; entspricht $400 \mu\text{l}$ einer Plättchensuspension mit $250.000 \text{ plts} / \mu\text{l}$). Gezeigt sind jeweils $n=7$ unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Auf der Abszisse wird zwischen der cNOS (eNOS, nNOS) (graue Dreiecke) und iNOS (schwarze Kreise) unterschieden. Aufgrund der hohen Streuung mit dem Auftreten von negativen Werten kann von keiner spezifischen Aktivität der beiden NOS-Formen ausgegangen werden.

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Messungen. Sowohl für die cNOS ($0,76 \pm 2,8 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^8$ Plättchen) als auch die iNOS ($0,71 \pm 3,3 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^8$ Plättchen) ergibt sich scheinbar eine Aktivität. Die starke Streuung der Einzelmessung um die 0-Linie mit zum Teil negativen Werten belegt jedoch, dass es sich um Mittelwerte handelt, die im Bereich des Hintergrundrauschens der Messung liegen. Auch auf Aktivitätsebene war daher keine NOS-Aktivität in Thrombozyten nachweisbar.

3.3 Rolle der eNOS in vivo bei der arteriellen Thrombusentstehung

Zusätzlich zu den Untersuchungen an isolierten Thrombozyten, in denen nur der Einfluss einer plättchenendogenen eNOS zum Tragen kommen kann, wurden *in vivo* Experimente zur Gerinnung in WT und eNOS^{-/-} Mäusen durchgeführt. In diesen

Experimenten kann somit auch die Rolle exogener eNOS abhängiger NO-Quellen untersucht werden, die im Rahmen der Gerinnungsreaktion die Hämostase modulieren.

3.3.1 Arterielle Blutungszeit

In einer ersten *in vivo* Untersuchung wurde die Blutungszeit nach Resektion der Schwanzspitze bis zum primären Sistieren des Blutflusses gemessen (Abb. 10). In WT Mäusen betrug die Blutungszeit 103 ± 26 s. Die Blutungszeit in eNOS^{-/-} Tieren war nicht verschieden zu den WT Werten (100 ± 37 s).

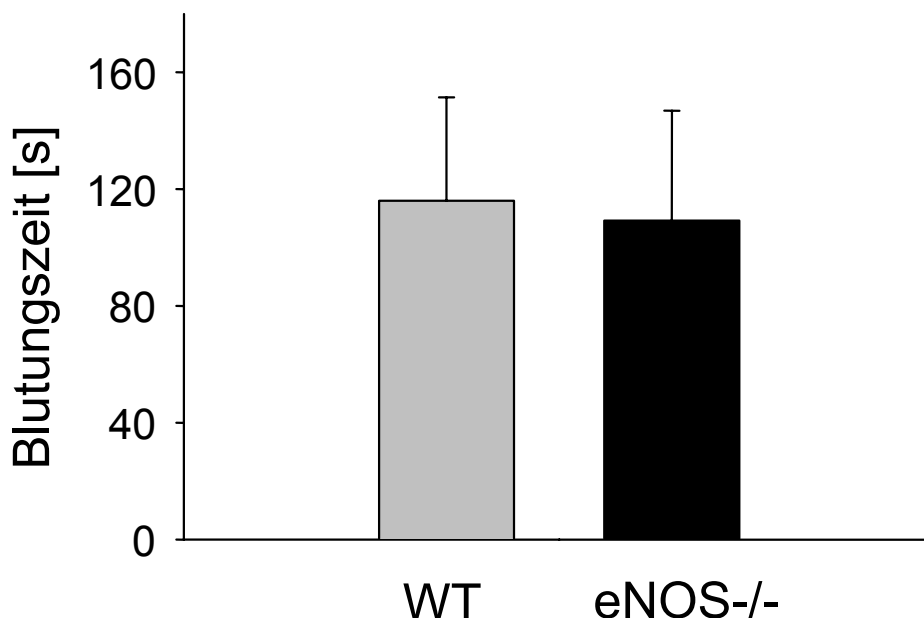


Abbildung 10: Analyse der arteriellen Blutungszeit

Blutungszeit nach Resektion der Schwanzspitze. Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung von n=8 WT (grauer Balken) und n=9 eNOS^{-/-} (schwarzer Balken) Mäusen.

Zur weiteren Untersuchung der eNOS-Funktion bei der Thrombusbildung *in vivo* wurde das Modell von Kurz et al. eingesetzt (36). Durch eine lokale Behandlung der freiliegenden Arteria carotis mit einer FeCl₃-Lösung wird eine räumlich definierte Gefäßläsion gesetzt, wodurch es zur Zerstörung der intimalen Endothelschicht kommt. Die somit freigelegten subendothelialen Strukturen induzieren eine Thrombusbildung *in vivo*.

3.3.2 Validierung der Intimaläsion der A. carotis

Um das Thrombose Modell der A. carotis zu validieren wurde in Vorversuchen das Ausmaß der Gefäßläsion durch eine Behandlung mit 7,5% FeCl₃-Lösung für 1 min bestimmt. Die Färbung der Gefäßsegmente mit Evans-Blau war dabei ein Indikator für freie kollagene Oberflächen in der Gefäßwand.

Untersuchungen der Gefäßläsion nach zwei Tagen ergaben, dass es in keinem Fall zu einem thrombotischen Verschluss der A. carotis gekommen war. Die Vermessung der Läsion (Abb. 11) ergab, dass das Ausmaß in WT und eNOS^{-/-} Tieren gleich groß war. Nach drei bzw. fünf Tagen kam es zu einer schnellen Abnahme der Läsionsgröße bis schließlich am Tag sechs keine Anfärbung der Gefäßwände mit Evans-Blau mehr erfolgte, vermutlich infolge vollständiger Reendothelialisierung. Hinsichtlich der Kinetik der Reendothelialisierung bestand kein Unterschied zwischen WT und eNOS^{-/-} Mäusen.

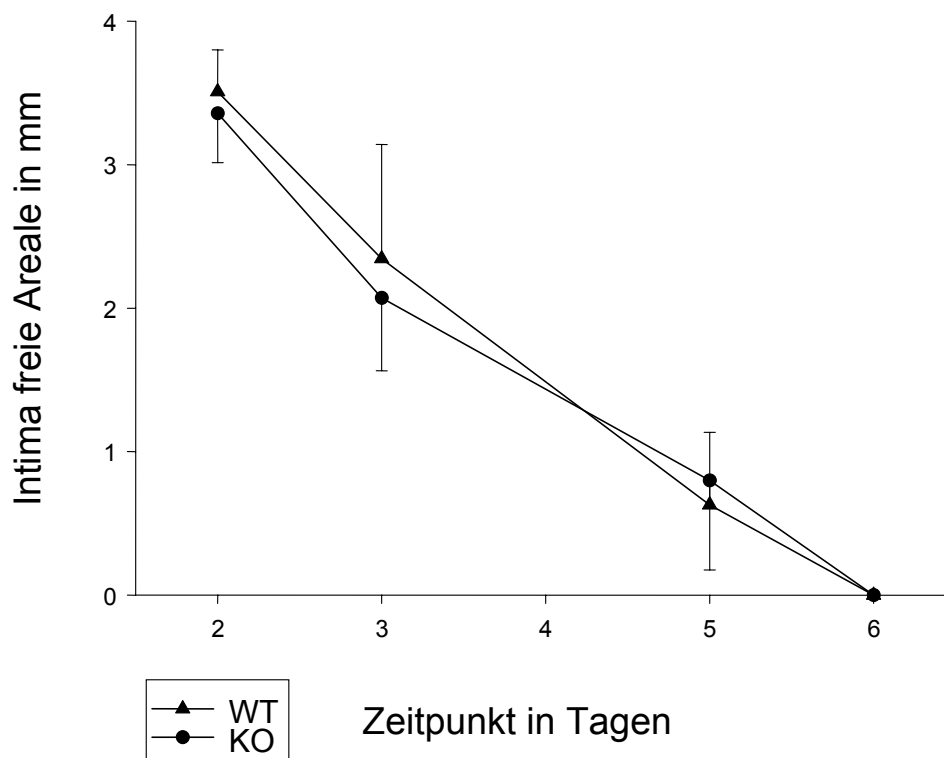


Abbildung 11: Ausmaß der Intimaläsion der A. carotis nach einer Inkubation mit 7,5% FeCl₃ für eine Minute. Ausmaß der Evans-Blau Färbung. Die Gefäße wurden zwei, drei, fünf und sechs Tage nach der FeCl₃-Behandlung entnommen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von n=6-9 WT (Dreiecke) und n=6-8 eNOS^{-/-} (Kreise) Mäusen. Nach sechs Tagen war bei beiden Mäusestämmen keine Blaufärbung mehr zu erkennen. Die Reendothelialisierungskinetik war in beiden Mäusestämmen gleich ausgeprägt.

3.3.3 Arterielle Thrombusbildung

Da eine FeCl_3 -Konzentration von 7,5% nicht ausreichend war, um einen thrombotischen Verschluss der A. carotis zu induzieren, wurden die weiteren Untersuchungen bei einer FeCl_3 -Konzentration von 12,5% durchgeführt, die akut bei allen Tieren zu einem Gefäßverschluss führte.

Mit der Ultraschallfluss-Sonde wurde der Fluss durch die A. carotis gemessen. Die Zeit nach Auslösen der Läsion bis zum vollständigen thrombotischen Verschluss (Time To Occlusion (TTO; Fluß = 0 ml / min) wurde registriert. Abbildung 12 zeigt repräsentativ den Verlauf eines Experiments: Durch die FeCl_3 -Behandlung kam es zu einer graduellen Abnahme des Blutflusses durch die A. carotis bis die Arterie komplett verschlossen war und der Fluss abbrach. Der Vergleich der quantitativen Daten für WT und eNOS^{-/-} Mäusen ist in Abb. 13 dargestellt: Die TTO gemessen in WT Tieren lag bei 501 ± 76 s. In eNOS^{-/-} Mäuse war dieser Wert durchschnittlich um 10% niedriger (457 ± 95 s), die Differenz erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau.

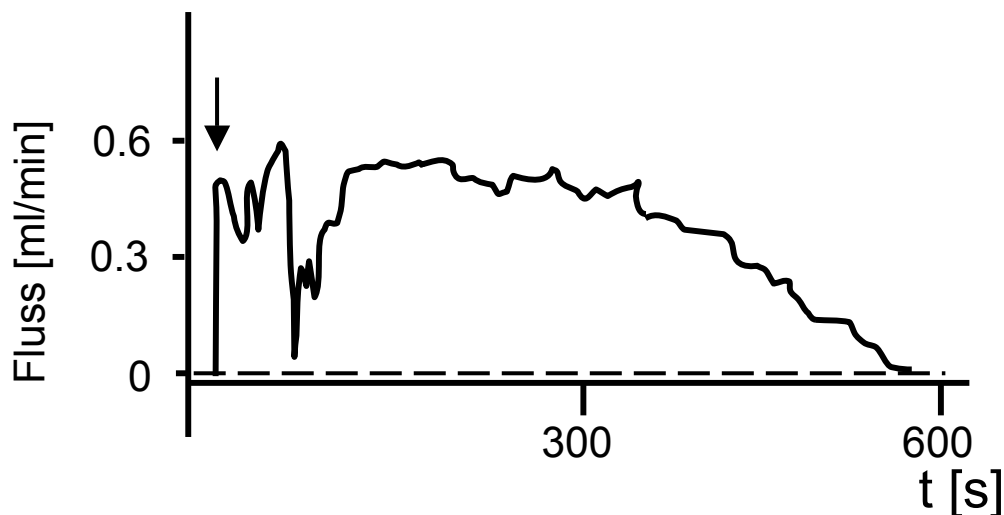


Abbildung 12: Analyse der arteriellen Thrombusbildung *in vivo*.

Repräsentative Aufzeichnung des Blutflusses durch die A. carotis nach der Induktion einer fokalkulären Läsion. Nach der Inkubation mit 12,5% FeCl_3 für 1 min wurde der Fluss mit Hilfe einer Ultraschallfluss-Sonde gemessen. Zu erkennen ist eine Abnahme des Blutflusses bis zur kompletten vaskulären Okklusion.

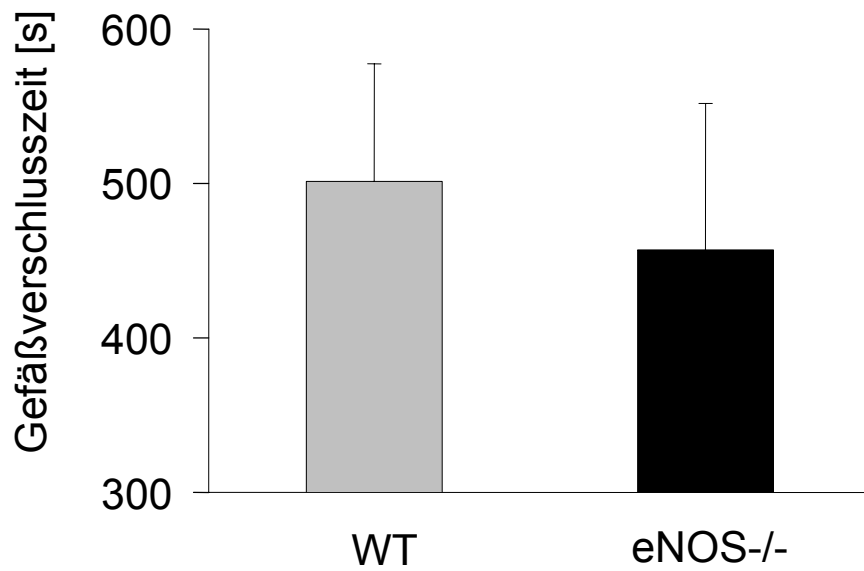


Abbildung 13: Analyse der arteriellen Thrombusbildung *in vivo*.

Quantitative Analyse der Gefäßverschlusszeit (TTO) in n=6 WT (grauer Balken) und n=8 eNOS^{-/-} (schwarzer Balken) Mäusen. Die Balken repräsentieren die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung.

4. Diskussion

4.1 Rolle der eNOS für die Plättchenfunktion und arterielle Thrombusbildung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der eNOS für die Plättchenfunktion *in vitro* und die arterielle Thrombusbildung *in vivo* mit Hilfe von eNOS-/- Mäusen analysiert. Entgegen der Annahmen in der Literatur konnte durch *in vitro* Untersuchungen demonstriert werden, dass die Plättchenaktivierung und -aggregation durch die eNOS-Defizienz entweder nicht oder nur geringfügig betroffen waren. Weiterhin bestanden keine funktionellen Unterschiede in der Signaltransduktionskaskade für NO (lösliche Guanylatzyklase, cGMP-abhängige Proteinkinase-I). Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Modelle konnte gezeigt werden, dass die arterielle Thrombusbildung *in vivo* bei eNOS defizienten Mäusen nicht verändert ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die eNOS eine geringe Rolle bei der Modulation der arteriellen Thrombusformation *in vivo* spielt.

Stickstoffmonoxid moduliert die drei Phasen der hämostatischen Kaskade, die Aktivierung, Rekrutierung und Aggregation (38), jedoch bleibt unklar, welches die Hauptquelle für das gebildete NO *in vivo* darstellt. So wurde postuliert, dass NO aus dem Endothel (16), aus Erythrozyten (52), aus den Plättchen selbst, aber auch aus zirkulierenden Nitrosothiolen (57) die Plättchen *in vivo* stabilisiert. Da alle in diesem Zusammenhang diskutierten NO-Quellen zu einem großen Teil von der endothelialen NO-Synthase abhängen, wurde die Plättchenfunktion in der vorliegenden Arbeit an eNOS-/- Mäusen untersucht.

Unter Verwendung der genetisch und funktionell gut charakterisierten eNOS defizienten Mäuse konnte kein Unterschied in der Plättchenaktivierung zwischen WT und eNOS-/- Mäusen nachgewiesen werden, denn die Thrombin induzierte Oberflächenexpression von P-Selektin war in eNOS-/- Mäusen nicht verändert. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Freedman et al. überein, die ebenfalls keine Unterschiede in der CD62P-Expression bei einem unabhängig erzeugten Stamm von eNOS-/- Mäusen nachweisen konnten (24). Gegensätzliche Befunde zeigten Untersuchungen an humanen Plättchen, die eine erhöhte P-Selektin-Expression in Antwort auf eine Thrombin- oder PKC-Stimulation zeigten, wenn diese

mit einem NOS-Inhibitor vorinkubiert worden waren (48). Andererseits war die P-Selektin-Expression erniedrigt, wenn die Plättchen mit exogenem NO vorbehandelt wurden (28).

Entsprechend den Ergebnissen bei der Plättchenaktivierung war kein Unterschied zwischen WT und eNOS^{-/-} Plättchen in der Kollagen induzierten Plättchenaggregation nachweisbar. Die unveränderte Aggregation der eNOS^{-/-} Plättchen bei höheren Kollagenkonzentrationen war nicht das Resultat einer kompensatorischen Induktion einer anderen NOS-Isoform, da eine akute NOS Hemmung in WT und eNOS^{-/-} Plättchen nicht zu einem unterschiedlichen Aggregationsverhalten führte. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass eine endogene eNOS in murinen Plättchen keinen wesentlichen Einfluss auf die Kollagen induzierte Plättchenaggregation hat. Diese Vermutung wurde durch die Untersuchung des NO abhängigen Signaltransduktionsweges in Plättchen unterstützt (lösliche Guanylatzyklase, cGMP-abhängige Proteinkinase-I). Sowohl die cGMP-Bildung als auch die VASP-Phosphorylierung als Indikator der sGC- und cGK-Aktivität zeigten nach einer Plättchen-Aktivierung mit Kollagen keine Veränderung, so dass Kollagen allenfalls eine minimale Aktivierung des NO abhängigen Signaltransduktionsweges induzierte. Verglichen mit einer pharmakologischen Stimulation der sGC durch den NO-Donor SNP erreichten die Kollagen induzierten cGMP-Konzentrationen nur 4% der maximal möglichen Konzentration. In Übereinstimmung mit der geringen Aktivität des NO-cGMP-Weges zeigten Western-Analysen zur Plättchen-eNOS-Expression und Aktivitätsmessungen mittels Citrullin-Assay, dass eine eNOS-Expression in Plättchen, wenn überhaupt vorhanden, unterhalb der Nachweisgrenze beider Tests lag.

Die Untersuchung der sGC- und cGK-Aktivität unter Stimulation mit SNP ergab, dass *ex vivo* keine Unterschiede hinsichtlich der Ansprechbarkeit der löslichen Guanylatzyklase von Plättchen aus WT bzw. eNOS^{-/-} Mäusen bestand. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Untersuchungen an isolierten Gefäßsegmenten aus Tieren, in denen die NOS chronisch gehemmt worden war (46), oder aus eNOS^{-/-} Mäusen. In beiden Fällen wurde eine höhere Sensitivität der sGC gegenüber NO-Donatoren nachgewiesen (8) und als Folge des fehlenden tonisch-inhibierenden NO-Einflusses auf die sGC (4) gewertet. Im Zusammenhang mit den anderen hier

erhobenen Werten spricht dieser Befund dafür, dass der NO-Einfluss auf die Thrombozyten als gering anzusehen ist.

Smith et al. fanden bei humanen Plättchen, dass niedrige Konzentrationen von Kollagen, die keine Aggregation auslösten, bereits zu einer maximalen NO-Ausschüttung führten (65). Bei der Applikation von höheren Kollagenkonzentrationen fand diese Gruppe eine Plättchenaggregation, die unabhängig von der NOS-Inhibition war. Zusammenfassend zogen die Autoren den Schluss, dass eine endogene NO-Bildung die Plättchen unter basalen Bedingungen stabilisieren könne, wenn nur geringe Mengen von Kollagen vorhanden sind, dass aber unter Bedingungen einer massiven Stimulation, z.B. einer Gefäßverletzung, dieser stabilisierende Effekt nicht weiter gesteigert werden kann.

Ein geringer Effekt einer NOS-Hemmung auf die Plättchenaggregation wurde ebenfalls von Freedman et al. durch simultane Messung der NO-Freisetzung und Aggregation an humanen Plättchen nachgewiesen (22). Die Kinetik der Aggregation und der NO-Ausschüttung waren klar unterschiedlich, denn die NO-Freisetzung erreichte ihren Höhepunkt, nachdem die maximale Aggregation erreicht war. Folglich war bei NOS-Hemmung die maximale Aggregation nur um 15% reduziert. Daher wurde postuliert, dass das plättcheneigene NO eine modulierende Rolle in der Rekrutierungsphase des wachsenden Thrombus spielt.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen an der Maus wurde für Thrombozyten anderer Spezies eine endogene NO-Synthase Aktivität beschrieben, doch besteht Unklarheit über die NOS-Isoformen, die die wesentlichen biologischen Effekte vermittelt. So fanden Chen und Mehta in humanen Thrombozyten (12) neben der eNOS eine iNOS-Expression, deren Intensität nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation zunahm. Darüber hinaus gelang es ihnen (13) in einer weiteren Arbeit mit Lysaten aus humanen Erythrozyten eine Aktivität im Citrullin-Assay nachzuweisen, die durch NO-Synthase-Inhibitoren gehemmt werden konnte. In der Western-Analyse zeigte sich ein zytosolisches Protein, das mit eNOS-Antikörpern zur Darstellung kam. Bei einer Ko-Inkubation von Blutplättchen mit roten Blutzellen ergab sich eine reduzierte Plättchenaggregation, welche die Autoren primär auf eine NO-Produktion der Erythrozyten zurückführten. Berkels et al. (5)

gelang der Nachweis einer NOS in Schweineplättchen, die in Ruhe nicht aktiv war, aber während der Aktivierung und Aggregation stimuliert wurde, was als negativer Feedback-Mechanismus gewertet wurde. Auf Expressionsebene wurde die iNOS und eNOS gezeigt.

Der Nachweis einer NO-Synthase in Thrombozyten der Maus konnte ebenfalls in anderen Arbeiten nicht glaubhaft gezeigt werden (24). Freedman et al. wiesen mittels RT-PCR ein eNOS spezifisches mRNA Signal in Knochenmarkspunktaten nach, das in Präparationen aus eNOS^{-/-} Mäusen fehlte. Die Aussage, dass dieses Signal aus den Megakaryozyten stamme und daher als Beleg für die eNOS-Expression in Thrombozyten gewertet werden müsse, ist allerdings angesichts der heterogenen Zellpopulation, die untersucht wurde, nicht haltbar.

Die unklare Datenlage wird weiterhin durch eine Arbeit von Queen et al. (55) an humanen Thrombozyten unterstrichen. Diesem Ansatz zufolge soll nach Stimulation von β_2 -Adrenorezeptoren eine plättchenendogene NOS aktiviert werden, die die Plättchenadhäsion an Endothelzellen nach Thrombin-Stimulation reduzieren sollen. Die NOS-Aktivität hatte aber keinen inhibierenden Effekt auf die durch U46619, einem stabilen Thromboxan-Analogen, induzierte Aggregation. Die selektive Stimulation der β_2 -Adrenorezeptoren führte zu einem Anstieg des intrazellulären Gehaltes an cAMP, aber nicht zu einem Anstieg des intrazellulären Gehaltes an Ca^{2+} , was zu der Vermutung führte, dass die plättchenendogene NOS keinen Ca^{2+} -Influx mit einer konsekutiven Aktivierung von Calmodulin benötigt. Die Autoren führten den Effekt auf die Ca^{2+} unabhängige iNOS zurück oder vermuteten eine Serin₁₁₇₇-Phosphorylierung der eNOS, die über eine gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität zu einer Aktivierung der eNOS führt (17). Letztendlich konnte aber keine der drei NOS-Isoformen auf mRNA oder Proteinebene nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie konnte die Gruppe um Freedman (25), mit der unspezifischen NO-Elektrode gemessen, eine negative Korrelation zwischen Patienten mit akuten Koronarsyndromen und der NO-Konzentration zeigen, so dass sie postulierten, dass eine niedrige plättchenendogene NO-Konzentration akute Koronarsyndrome vorhersagen könne. Eine Verminderung der NO-Produktion jedoch konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, da in dem Messverfahren

ebenfalls NO-Addukte erfasst werden, die zum größten Teil unabhängig von einer plättchenendogenen NO-Produktion zu sein scheinen. Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO könnte einerseits durch eine Zunahme des oxidativen Stresses in den Plättchen erklärt sein, die mit einer Veränderung des Redox-Status (41) einhergehend zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies, wie dem Superoxid, führt. Andererseits könnte das Ergebnis die Folge einer Inhibition antioxidaktiver Enzyme, wie der Glutathion-Peroxidase sein, die zu einer verminderten Elimination von reaktiven Spezies führt (21), die wiederum mit einer hohen Kapazität NO abbauen und so die NO vermittelten Funktionen verhindern können (3).

4.2 NO-Quellen für die Plättchenstabilisierung

Während die oben genannten Untersuchungen der autokrinen NO-Wirkung bei der Plättchenfunktion eine wesentliche Rolle zuschreiben, belegt eine Vielzahl von Experimenten, dass NO eher parakrin die Thrombozytenfunktion moduliert. Dabei stellen das Gefäßendothel, die Erythrozyten und zirkulierende Nitrosothiole die wesentlichen NO-Quellen dar, die die Thrombozytenadhäsion und -aggregation modulieren sollen (16; 52; 57).

Besonders bei der NO-Freisetzung aus Endothelzellen wurde eine effiziente Hemmung der Plättchenaggregation gezeigt. Zum Beispiel haben Broekman et al. gezeigt, dass 81% des gespeicherten Serotonins in den Überstand abgegeben wurden, nachdem die Plättchen mit Thrombin stimuliert wurden. Dieser Wert konnte in NO abhängiger Weise auf 5% reduziert werden, wenn Endothelzellen in den Ansatz mit einbezogen wurden (11). Dies lässt vermuten, dass die plättcheneigene NO-Produktion weniger effektiv in der Inhibition der Aggregation ist, als das durch die Endothelzellen produzierte NO. De Graaf et al. unterstrichen die Rolle des endothelial produzierten NO unter Flussbedingungen und fanden heraus, dass die Inhibition der Plättchenadhäsion an das Endothel abhängig von intakten Endothelzellen war (16), was die Bedeutung des exogenen NO bei der Modulation der Plättchenfunktion unterstreicht.

Ein Synergismus für die stabilisierende Funktion der endothelialen Faktoren NO und Prostaglandin I₂ (PGI₂) konnte in einem weiteren Ansatz nachgewiesen werden.

Denn nach nur einer Koronarpassage führte die durch Azetylcholin induzierte Ausschüttung endothelialer Faktoren wie dem NO und PGI₂ zu einer VASP-Phosphorylierung innerhalb der Plättchen, die über die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP vermittelt wurde (53).

S-Nitrosothiole die nach einer Reaktion von NO mit Thiolgruppen aus Plasmaproteinen (Albumin, Gluthathion und Zystein) oder mit der Thiolgruppe der β -Kette des Hämoglobin (Zystein₉₃) entstehen, dienen als aktive Speicher für das NO und können dessen Funktion für eine längere Zeit aufrechterhalten (34). Das S-Nitrosohämoglobin gibt seine NO-Gruppe während der Deoxygenierung in der Mikrozirkulation frei, um den arteriellen Blutdruck und den Blutfluss zu regulieren und die Plättchenaggregation zu inhibieren (27). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die intravaskuläre Inhibition der Plättchenaktivierung durch NO nach Zusatz von Erythrozyten aufgehoben wurde. In dem dabei eingesetzten Modell wurden Femoralarterien aus Kaninchen mit verschiedenen Erythrozytenkonzentraten und Plättchen perfundiert und zeigten abhängig vom Hämatokrit eine Plättcheninhibition (32). Darüber hinaus scheinen Erythrozyten eine konstitutive und induzierbare Form der NO-Synthase zu besitzen, denn die Hemmung der Plättchenaggregation durch Erythrozyten konnte mit einer NOS-Blockade aufgehoben werden (13).

4.3 Arterio- venöse Unterschiede bei der Plättchenstabilisierung durch NO

Trotz einer großen Anzahl von Publikationen, die sich mit der Rolle des NO-cGMP-Weges bei der Plättchenfunktion *in vitro* beschäftigt, sind nur wenige Studien der Rolle von NO *in vivo* nachgegangen. Die Analyse einzelner Komponenten des NO-cGMP-Weges *in vivo* wurde mit der Erzeugung von Knockout-Mäusen für verschiedene NOS Isoformen oder den in der Signaltransduktion nachgeschalteten Zielen, wie der cGK-I, realisierbar: Unter der Verwendung eNOS defizienter Mäuse befasst sich die hier vorliegende Arbeit erstmalig mit der Rolle der eNOS bei der arteriellen Thrombusbildung *in vivo*. Dabei wird anhand von zwei verschiedenen *in vivo* Modellen gezeigt, dass die eNOS bei der Modulation der Gerinnselbildung in Arterien keine wesentliche Rolle spielt.

Diese Schlussfolgerung basiert einerseits auf der Beobachtung, dass die Blutungszeiten nach einer Schwanzspitzenresektion bei WT und eNOS^{-/-} Mäusen nicht signifikant verschieden waren. Andererseits fanden sich bei lokaler Läsion der A. carotis *in vivo* ebenfalls nur minimale Unterschiede. In diesem Modell, das eher die Entwicklung von arteriellen thromb-embolischen Zuständen widerspiegelt, schien die Zeit bis zum Verschluss der Arteria carotis nach der Induktion einer fokalen Gefäßverletzung bei den eNOS^{-/-} Mäusen reduziert zu sein, aber diese Unterschiede erreichten keine Signifikanz. Jedoch könnte diese kleine Differenz eine veränderte Plättchenrekrutierung widerspiegeln, was mit einer Plättchen-NOS zusammenhängen könnte (22).

Obwohl die hier gezeigten Resultate die Schlussfolgerung nahe legen, dass die eNOS bei der arteriellen Thrombusbildung eine geringe Rolle spielt, könnte sie eine wichtigere Rolle in der Modulation von venösen Thrombosen spielen (24), denn die Blutungszeit nach spezifischer Verletzung der Schwanzvene war in einem unabhängig erzeugten Stamm von eNOS^{-/-} Mäusen signifikant reduziert (33). Der Grund für diese funktionelle Differenz bleibt bisher unklar, es ist jedoch möglich, dass bei der arteriellen Plättchenstabilisierung andere endotheliale Autakoide eine wichtigere Rolle spielen könnten, als NO. Es ist beispielsweise gut dokumentiert, dass das arterielle Endothel höhere Freisetzungsraten für den antiaggregatorischen Agonisten Prostazyklin aufweist, als das venöse Endothel (10). So könnte Prostazyklin im arteriellen Gefäßbett einen höheren Einfluss als NO auf die Plättchenfunktion ausüben. Auf der venösen Seite hingegen könnte die Bedeutung des plättchenendogen synthetisierten NO an Bedeutung bei der Plättchenstabilisierung zunehmen. Diese Vermutung wird unterstützt durch Befunde, wonach Mäuse mit einer homozygoten Deletion des IP-Rezeptors eine massiv gegenüber WT Kontrollen gesteigerte arterielle Thrombusbildung aufweisen (47) und damit die Wichtigkeit anderer plättchenstabilisierender Faktoren als NO im arteriellen Gefäßbett zum Ausdruck bringt.

Während die arterielle Gerinnung nur in geringem Umfang unter der Kontrolle von NO zu stehen scheint, gibt es pathologische Zustände, die, mit einer erhöhten vaskulären NO-Produktion einhergehend, durch eine größere Bedeutung des NO-cGMP-Weges bei der Modulation der Plättchenfunktion gekennzeichnet sind. Unter

dem Einsatz von cGK-I Knockout-Mäusen konnten Massberg et al. demonstrieren, dass die Adhäsion von Plättchen an die Gefäßwand zwischen WT und cGK-I/- Mäusen *in vivo* nicht unterschiedlich war, was zu der Vermutung führte, dass unter basalen Bedingungen der NO-cGMP-Weg von geringer Bedeutung bei der Plättchenstabilisierung ist (42). Demgegenüber ergab eine Reperfusion nach 60 Minuten Ischämie des mesenterialen Gefäßbettes bei cGK-I/- Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl von Plättchen, die an die Arteriolen, Kapillaren und Venolen adhärten. Da bekannt ist, dass es während der Reperfusion nach Ischämie zu einer massiven Ausschüttung von NO kommt (72), sprechen diese Ergebnisse für eine NO abhängige Modulation der Plättchenfunktion. Die Notwendigkeit einer hohen NO-Freisetzung *in vivo* zur Modulation der Thrombusbildung wird weiterhin durch Untersuchungen von Shulz und Raji unterstützt, die gezeigt haben, dass die durch Endotoxin induzierte glomeruläre Thrombosierung durch endogen synthetisiertes NO blockiert werden kann (62). Als Quelle für die massive NO-Produktion ist in diesen Untersuchungen jedoch die iNOS zu nennen, die im Rahmen der Endotoxinbehandlung hochreguliert wird. Die im glomerulären Endothel exprimierte eNOS war für diesen Effekt vermutlich nicht verantwortlich.

Es stellt sich abschließend die Frage, warum NO, das die Plättchen *in vitro* effizient stabilisiert, unter *in vivo* Bedingungen nur wenig wirksam ist. Wahrscheinlich liegt die Antwort auf diese Frage in einem quantitativen Problem, denn eine Mehrheit des endothelial produzierten NO wird wahrscheinlich durch das Hämoglobin der Erythrozyten abgefangen. Diese Sicht wird unterstützt durch *in vitro* Studien, die wiederholt gezeigt haben, dass sowohl intakte Erythrozyten als auch freies Hämoglobin NO abfangen und dadurch den plättchenstabilisierenden Effekt von NO abschwächen können (11; 32; 51). Diese Annahme würde auch die Notwendigkeit hoher NO-Freisetzungsraten zur Plättchenstabilisierung erklären, um unter den genannten pathologischen Bedingungen die NO-Inaktivierung durch die Erythrozyten zu übersteigen.

5. Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Studien belegt, dass NO Thrombozyten stabilisiert und somit aggregationshemmend wirkt. Daher geht man vor allem davon aus, dass die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die in vaskulären Endothelzellen und in einem sehr viel geringeren Ausmaß in Thrombozyten exprimiert wird, zur Plättchenstabilisierung *in vivo* beiträgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der eNOS bei der Plättchenaggregation *in vitro* und *in vivo* an Wildtyp (WT) und eNOS^{-/-} Mäusen untersucht. Die Kollagen induzierte Plättchenaggregation *in vitro* zeigte in dem eingesetzten Konzentrationsbereich von $0,36 - 10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ keine Unterschiede zwischen WT und eNOS^{-/-} Plättchen. In Übereinstimmung mit diesen Daten führte Kollagen zu keiner signifikanten Zunahme der cGMP-Bildung und des Phosphorylierungsgrades des VASP (Vasodilator-Stimuliertes Phosphoprotein), einem Substrat der cGMP-abhängigen Proteinkinase. Die Thrombin induzierte Oberflächenexpression von P-Selektin als Maß für die Plättchenaktivierung war in den eNOS^{-/-} Plättchen ebenfalls unverändert. Die Rolle der eNOS bei der Plättchenstabilisierung wurde *in vivo* in zwei Modellen für eine arterielle Thrombenbildung untersucht. Die Blutungszeit nach Schwanzspitzenresektion bei den eNOS^{-/-} Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede (WT: 116 ± 35 s; eNOS^{-/-} 109 ± 37 s, n.s.). Ferner zeigte sich nach Induktion einer fokalen Thrombose in der A. carotis allenfalls eine Tendenz zu einem beschleunigten Gefäßverschluß bei eNOS^{-/-} Mäusen (WT: 501 ± 76 s; eNOS^{-/-} 457 ± 95 s (n.s.)).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass entgegen der Annahme in der Literatur die endotheliale NO-Synthase unter basalen Bedingungen weder über eine endogene NO-Freisetzung in Plättchen noch über eine parakrine NO-Freisetzung aus dem Endothel eine wesentliche Modulation der Plättchenfunktion *in vitro* bzw. der arteriellen Thromboseentwicklung *in vivo* bewirkt.

6. Literatur

1. **Annich GM, Meinhardt JP, Mowery KA, Ashton BA, Merz SI, Hirschl RB, Meyerhoff ME and Bartlett RH.** Reduced platelet activation and thrombosis in extracorporeal circuits coated with nitric oxide release polymers. *Crit Care Med* 28: 915-920, 2000.
2. **Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S and Fassler R.** The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 18: 37-48, 1999.
3. **Beckman JS and Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
4. **Bellamy TC, Wood J, Goodwin DA and Garthwaite J.** Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2928-2933, 2000.
5. **Berkels R, Bertsch A, Zuther T, Dhein S, Stockklauser K, Rosen P and Rosen R.** Evidence for a NO synthase in porcine platelets which is stimulated during activation/aggregation. *Eur J Haematol* 58: 307-313, 1997.
6. **Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH and Furie B.** A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest* 78: 130-137, 1986.
7. **Born, G. V. and Cross, M. J.** The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168, 178-195. 1963. London.
8. **Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Godecke A, Mulsch A and Busse R.** Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35: 231-236, 2000.
9. **Brass LF, Manning DR, Cichowski K and Abrams CS.** Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost* 78: 581-589, 1997.

10. **Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS and Egbrink MG.** Endogenous nitric oxide and prostaglandins synergistically counteract thromboembolism in arterioles but not in venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 163-169, 2001.
11. **Broekman MJ, Eiroa AM and Marcus AJ.** Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 78: 1033-1040, 1991.
12. **Chen LY and Mehta JL.** Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 154-158, 1996.
13. **Chen LY and Mehta JL.** Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 57-61, 1998.
14. **Cohen RA, Shepherd JT and Vanhoutte PM.** Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221: 273, 1983.
15. **Coller BS.** Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 92: 2373-2380, 1995.
16. **de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG and Sixma JJ.** Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85: 2284-2290, 1992.
17. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
18. **Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U and Pilz RB.** Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 173-209, 1999.
19. **Feelisch M and Stamler J.** *Methods in nitric oxide research*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1996.
20. **Folts JD, Stamler J and Loscalzo J.** Intravenous nitroglycerin infusion inhibits cyclic blood flow responses caused by periodic platelet thrombus

formation in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 83: 2122-2127, 1991.

21. **Freedman JE, Frei B, Welch GN and Loscalzo J.** Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J Clin Invest* 96: 394-400, 1995.
22. **Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF and Michelson AD.** Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 100: 350-356, 1997.
23. **Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR and Michelson AD.** Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest* 97: 979-987, 1996.
24. **Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL and Loscalzo J.** Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84: 1416-1421, 1999.
25. **Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF, Jr. and Vita JA.** Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 98: 1481-1486, 1998.
26. **Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S and Schrader J.** Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 82: 186-194, 1998.
27. **Gow AJ and Stamler JS.** Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391: 169-173, 1998.
28. **Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Bohrer H, Motsch J and Martin E.** Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* 97: 1481-1487, 1998.
29. **Haimovich B, Lipfert L, Brugge JS and Shattil SJ.** Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J Biol Chem* 268: 15868-15877, 1993.
30. **Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P and Walter U.** Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 265: 3088-3093, 1990.

31. **Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U and Zimmer M.** Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8120-8125, 1999.
32. **Houston DS, Robinson P and Gerrard JM.** Inhibition of intravascular platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor: reversal by red blood cells. *Blood* 76: 953-958, 1990.
33. **Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA and Fishman MC.** Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242, 1995.
34. **Kelm M.** Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411: 273-289, 1999.
35. **Kelm M and Schrader J.** Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 66: 1561-1575, 1990.
36. **Kurz KD, Main BW and Sandusky GE.** Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 60: 269-280, 1990.
37. **Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith RE, Radomski MW, Martin JF and Moncada S.** Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 344: 1458-1460, 1994.
38. **Loscalzo J.** Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88: 756-762, 2001.
39. **Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von SL, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E and Bühler FR.** Difference between endothelium dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 319: 462, 1988.
40. **Maalej N, Albrecht R, Loscalzo J and Folts JD.** The potent platelet inhibitory effects of S-nitrosated albumin coating of artificial surfaces. *J Am Coll Cardiol* 33: 1408-1414, 1999.
41. **Marcus AJ, Silk ST, Safier LB and Ullman HL.** Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 59: 149-158, 1977.

42. **Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F and Hofmann F.** Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 189: 1255-1264, 1999.

43. **Megson IL, Sogo N, Mazzei FA, Butler AR, Walton JC and Webb DJ.** Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol* 131: 1391-1398, 2000.

44. **Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P and Turner P.** Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125: 370-377, 1995.

45. **Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR and Loscalzo J.** Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 270: H1640-H1648, 1996.

46. **Moncada S, Rees DD, Schulz R and Palmer RM.** Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2166-2170, 1991.

47. **Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S and Narumiya S.** Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388: 678-682, 1997.

48. **Murohara T, Parkinson SJ, Waldman SA and Lefler AM.** Inhibition of nitric oxide biosynthesis promotes P-selectin expression in platelets. Role of protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2068-2075, 1995.

49. **Nolte C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P and Walter U.** Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J Biol Chem* 266: 14808-14812, 1991.

50. **Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T and Munzel T.** Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* 87: 999-1005, 2000.

51. **Ohno M, Kishimoto T, Jidoi J and Tada M.** Assessment of production of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) by cultured human vascular

endothelial cells based on its anti- aggregatory effect on human platelets. *Hum Cell* 7: 68-71, 1994.

52. **Pawloski JR, Swaminathan RV and Stamler JS.** Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation* 97: 263-267, 1998.
53. **Pohl U, Nolte C, Bunse A, Eigenthaler M and Walter U.** Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage. *Am J Physiol* 266: H606-H612, 1994.
54. **Poole AW and Watson SP.** Regulation of cytosolic calcium by collagen in single human platelets. *Br J Pharmacol* 115: 101-106, 1995.
55. **Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I and Ferro A.** beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res* 87: 39-44, 2000.
56. **Radomski MW, Palmer RM and Moncada S.** An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5193-5197, 1990.
57. **Radomski MW, Rees DD, Dutra A and Moncada S.** S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 107: 745-749, 1992.
58. **Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM and Harker LA.** Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb* 12: 1475-1487, 1992.
59. **Schorr K.** Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 50: 7-28, 1995.
60. **Schwarz UR, Geiger J, Walter U and Eigenthaler M.** Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 82: 1145-1152, 1999.
61. **Shattil SJ, Kashiwagi H and Pampori N.** Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91: 2645-2657, 1998.
62. **Shultz PJ and Raij L.** Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 90: 1718-1725, 1992.

63. **Siess W.** Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69: 58-178, 1989.
64. **Simon DI, Stamler JS, Loh E, Loscalzo J, Francis SA and Creager MA.** Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 339-342, 1995.
65. **Smith CC, Stanyer L, Cooper MB and Betteridge DJ.** Platelet aggregation may not be a prerequisite for collagen-stimulated platelet generation of nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 1473: 286-292, 1999.
66. **Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H and Walter U.** Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 273: 20029-20035, 1998.
67. **Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ and Loscalzo J.** S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 444-448, 1992.
68. **Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV and Bainton DF.** A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 101: 880-886, 1985.
69. **Wade ML and Fitzpatrick FA.** Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins prostaglandin I₂ synthase and thromboxane A₂ synthase. *Arch Biochem Biophys* 347: 174-180, 1997.
70. **Walter U, Geiger J, Haffner C, Markert T, Nehls C, Silber RE and Schanzenbacher P.** Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors. *Agents Actions Suppl* 45: 255-268, 1995.
71. **Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM and Mendelsohn ME.** Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4888-4893, 1998.
72. **Zweier JL, Wang P and Kuppusamy P.** Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 270: 304-307, 1995.

7. Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

- 1.) Gödecke A, **Özüyaman B**, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J. Endothelial NO synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Circulation* 2001; 104(Supp II)II-245
- 1.) Gödecke A, **Özüyaman B**, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J. Endothelial NO synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *European Journal of Physiology* 2001, 441 No. 6 (Supp)R 215
- 2.) Gödecke A, **Özüyaman B**, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J. Endothelial NO synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Manuskript eingereicht*

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Schrader danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen und dafür, dass er hierfür die ideellen und materiellen Grundlagen zur Verfügung gestellt hat, so dass ich mich auf das Experimentieren konzentrieren konnte.

Herrn Prof. Dr. R.E. Scharf danke ich für die Möglichkeit am Institut für Transfusionsmedizin verschiedene Assays zur Thrombozytenphänotypisierung nutzen zu können. Die Aggregations- und FACS-Analysen sind eine wesentliche Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Walter (Medizinische Universitätsklinik Würzburg, Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie) danke ich für die Überlassung des M4 und 16C2 Antikörpers.

Herrn PD Dr. Axel Gödecke danke ich ganz besonders für seine unermüdliche und hochmotivierte Betreuung bei der Planung und Durchführung von Experimenten. Die hervorragenden wissenschaftlichen Diskussionen waren prägend. Wissenschaftliche Vorträge und Texte zu verfassen habe ich durch ihn gelernt. Seine menschliche und fachliche Kompetenz werden mir immer ein Vorbild sein.

Herrn Dr. Ulrich Flögel danke ich für seine Unterstützung in der Datenerfassung und Verarbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Susanne Küsters und Frau Elisabeth Kirchhoff die mich in die praktische Laborarbeit eingeführt und mich bei meinen Versuchen in hervorragender Art und Weise unterstützt haben.

Meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester danke ich für ihre liebevolle Unterstützung jeglicher Art und das Interesse an meiner Arbeit.

Susann, her sey'den çok teşekkürler.

9. Lebenslauf

Name: Özüyaman
Vorname: Burcin
Adresse: Burghofstraße 90
40223 Düsseldorf
Geburtsdatum: 05.10.1974
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Nihat Özüyaman
Nihal Özüyaman

Schulbildung: 1981-85 Gemeinschaftsgrundschule Bruchstraße,
Mülheim an der Ruhr
1985-94 Gustav-Heinemann Gesamtschule,
Mülheim an der Ruhr
1994 Abitur

Wehrdienst: Oktober 1995 – Juli 1996 im Sanitätsdienst

Hochschulausbildung: 1995-2002 Vorklinisches und klinisches Studium
der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-
Universität, Düsseldorf
Mai 2002 3.Staatsexamen

Beruflicher Werdegang: ab Juli 2002 Arzt im Praktikum, Klinik für
Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf