

**Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die
Thrombozytenfunktion von Guanylyl-Cyclase-
defizienten Mäusen.**



Dissertation

zur Erlangung
des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der
Fakultät für Biologie an der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Oliver Dangel
aus Herne

angefertigt am Lehrstuhl
für Pharmakologie und Toxikologie
der Fakultät für Medizin,
Prof. Dr. D. Koesling

Bochum, 2007

meinen Eltern und meiner Großmutter

1. Referent: Prof. Dr. med. Doris Koesling
2. Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. med. habil. Hanns Hatt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Zellkommunikation und Signaltransduktion.....	1
1.2. Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg.....	1
1.2.1. Stickstoffmonoxid (NO).....	3
1.2.2. NO-Bildung durch NO-Synthasen (NOS).....	3
1.2.3. Der sekundäre Botenstoff cGMP.....	4
1.3. Bildung von cGMP durch Guanylyl-Cyclasen.....	5
1.3.1. Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen.....	5
1.3.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC).....	5
1.3.2.1. Struktur der NO-GC.....	6
1.3.2.2. Isoformen der NO-GC.....	6
1.3.2.3. Aktivierungsmechanismus der NO-GC.....	7
1.4. Pharmakologische Beeinflussung der NO-GC.....	7
1.4.1. NO-freisetzende Substanzen.....	7
1.4.2. NO-unabhängige NO-GC-Aktivatoren.....	10
1.4.3. Hemmung der NO-GC.....	10
1.5. cGMP-Effektorproteine.....	11
1.5.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG).....	11
1.5.2. Phosphodiesterasen.....	12
1.5.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle.....	13
1.6. Transgene Mausmodelle.....	14
1.6.1. KO-Mausmodelle der NOS.....	14
1.6.1.1. nNOS-defiziente Mäuse.....	14
1.6.1.2. iNOS-defiziente Mäuse.....	15
1.6.1.3. eNOS-defiziente Mäuse.....	15
1.6.1.4. nNOS/eNOS/iNOS-defiziente Mäuse.....	16
1.6.2. KO-Mausmodelle für die PKG.....	16
1.6.2.1. PKGI-defiziente Mäuse.....	16
1.6.2.2. PKGII-defiziente Mäuse.....	17
1.6.3. KO-Mausmodelle für die NO-GC.....	17
1.6.3.1. α -defiziente Mäuse.....	17
1.6.3.2. β_1 -defiziente Mäuse.....	18
1.7. Thrombozyten als zelluläres Modellsystem zur Untersuchung des NO/cGMP-	

Signaltransduktionsweges.....	18
1.7.1. Hämostase	19
1.7.2. Interaktion zwischen Blutgefäß und Thrombozyten durch Adhäsion	19
1.7.3. Thrombozytenaktivierung	21
1.7.4. Thrombozytenaggregation.....	21
1.7.5. Hemmung der Thrombozytenfunktion.....	23
1.7.5.1. NO/cGMP-vermittelte Mechanismen.....	23
1.7.5.2. cGMP-unabhängige Mechanismen von NO	25
2. Problemstellung und Zielsetzung	27
3. Material und Methoden	28
3.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	28
3.2. Verwendete Mauslinien	28
3.3. Bakterienstamm	29
3.4. Plasmid und verwendete Oligonukleotide (Primer)	29
3.5. Anzucht von Bakterien.....	30
3.6. Molekularbiologische Methoden	31
3.6.1. Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	31
3.6.2. Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	31
3.6.3. Methoden zur DNS-Präparation.....	32
3.6.3.1. Präparation von Plasmid-DNS	32
3.6.3.2. Lyse tierischen Gewebes zur Isolierung von genomischer DNS	32
3.6.4. Methoden zur Extraktion von DNS.....	32
3.6.4.1. Extraktion von DNS durch Phenol-Chloroform	32
3.6.4.2. Extraktion von DNS mittels Isopropanol.....	33
3.6.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	33
3.6.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung	33
3.6.5.2. Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	33
3.6.6. Amplifikation spezifischer DNS-Fragmente mittels der Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	34
3.6.7. Restriktionsverdau der genomischen DNS	34
3.6.8. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von doppelsträngiger DNS	35
3.6.9. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen und DNS-Lösungen	36
3.6.10. Southern-Blot.....	36
3.6.10.1. Transfer von DNS-Fragmenten auf Nylonmembranen	36
3.6.10.2. Herstellung radioaktiv markierter DNS-Sonden.....	37
3.6.10.3. Überprüfung der radioaktiven Markierung	37
3.6.10.4. Hybridisierung.....	38
3.6.10.5. Nachweis der markierten DNS.....	38

3.7. Proteinbiochemische Methoden	39
3.7.1. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	39
3.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von murinen Proteinen	39
3.7.3. Coomassie-Färbung von Proteinen	39
3.7.4. Immunologische Methoden.....	40
3.7.4.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	40
3.7.4.2. Ponceau-Färbung und Absättigung der Nitrozellulosemembran	40
3.7.4.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen	41
3.7.5. Quantitative Bestimmung von cAMP und cGMP mittels Radioimmunoassay .	41
3.7.5.1. Herstellung von radioaktiv markiertem cAMP und cGMP (Tracer).....	41
3.7.5.2. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)	42
3.8. Isolierung von Organen sowie Thrombozyten aus der Maus	43
3.8.1. Präparation von Mäusen zur Gewinnung von Gewebe-spezifischen Protein-	
Proben.....	43
3.8.2. Isolierung von Thrombozyten-reichem Plasma (PRP).....	43
3.8.3. Isolierung und Reinigung von Thrombozyten ('washed platelets'; WP)	44
3.9. <i>In vitro</i> -Untersuchungen muriner Thrombozyten.....	44
3.9.1. Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten.....	44
3.9.2. Untersuchung der Adhäsion von murinen Thrombozyten	45
3.9.3. Bestimmung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung.....	45
3.9.4. Bestimmung der NO-induzierten cGMP-Akkumulation in intakten	
Thrombozyten	46
3.9.5. Bestimmung der NO-induzierten cAMP-Akkumulation in intakten	
Thrombozyten	47
3.9.6. Phosphorylierung von VASP und PDE5	47
3.10. Bestimmung der Schwanzblutungszeit GC-defizienter Mäuse <i>in vivo</i>	48
3.11. Bestimmung der NO-GC-Aktivität in Hirn- und Lungen-Homogenaten.....	48
4. Ergebnisse.....	50
4.1. Die Signaltransduktion in β_1 -defizienten Mäusen.....	50
4.2. <i>In vitro</i> -Untersuchung NO-GC-defizienter Thrombozyten	52
4.2.1. Fehlen der NO-GC in β_1 -defizienten Thrombozyten.....	52
4.2.2. Fehlen der NO-induzierten Hemmung der Aggregation von NO-GC-defizienten	
Thrombozyten	56
4.2.3. Die Signaltransduktion in α_1 - und α_2 -defizienten Thrombozyten.....	60
4.2.4. Die Adhäsion von NO-GC-defizienten Thrombozyten ist durch NO nicht	
hemmbar	63
4.2.5. NO führt nicht zur Hemmung der Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung in	
β_1 -defizienten Thrombozyten.....	65

4.2.6. Die Signaltransduktion über cAMP ist in β_1 -defizienten Thrombozyten intakt.	68
4.3. Verkürzte Blutungszeit in NO-GC-defizienten Mäusen	68
5. Diskussion	73
5.1. KO-Mäuse innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade	73
5.2. Die NO/cGMP-Kaskade in murinen Thrombozyten.....	75
5.3. Thrombozyten in anderen KO-Modellen der NO/cGMP-Kasade	80
6. Zusammenfassung	82
7. Literaturverzeichnis	84
8. Eigene Publikationen	101
8.1. Originalarbeiten	101
8.2. Kongressbeiträge	101
9. Danksagung	102
10. Lebenslauf	103
11. Erklärung	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die NO/cGMP-Signaltransduktion.....	2
Abb. 2: Chemische Struktur und Einteilung der verwendeten NO-Donatoren.....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion und -aktivierung.	20
Abb. 4: Schematische Darstellung der Regulation der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation.....	22
Abb. 5: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation.	24
Abb. 6: Gen-Inaktivierung der β_1 -Untereinheit der NO-GC in Mäusen.	51
Abb. 7: Expression und Aktivität der NO-GC in Thrombozyten aus WT und GC-KO Mäusen.	53
Abb. 8: VASP- und PDE5-Phosphorylierung in Thrombozyten aus WT und GC-KO- Mäusen.	55
Abb. 9: Prolin-NO hemmt nicht die Collagen-induzierte Thrombozytenaggregation in GC- KO-Thrombozyten.	57
Abb. 10: NO führt nicht zur Hemmung der Collagen-induzierten Aggregation in Thrombozyten von GC-KO-Mäusen.	58
Abb. 11: Statistische Auswertung der Untersuchung der NO-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaggregation.....	59
Abb. 12: Die NO/cGMP-Kaskade ist in GC-KO-Thrombozyten intakt.	61
Abb. 13: Untersuchung α_1 -defizienter Thrombozyten.	62
Abb. 14: Untersuchung α_2 -defizienter Thrombozyten.	64
Abb. 15: NO führt nicht zur Hemmung der ADP-induzierten Adhäsion von GC-defizienten Thrombozyten.	66
Abb. 16: NO führt nicht zur Hemmung der Thrombin-induzierten Calcium-Freisetzung in GC-KO-defizienten Thrombozyten.....	67
Abb. 17: Der cAMP/PKA-vermittelte Signaltransduktionsweg ist in GC-defizienten Thrombozyten intakt.	69
Abb. 18: PGE ₁ führt zur Hemmung einer Collagen-induzierten Aggregation von WT- und GC-defizienten Thrombozyten <i>in vitro</i>	70
Abb. 19: Bestimmung der Blutungszeit am kupierten Schwanz.	72

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Angeli's Salz	Dinatrium-Diazen-1-ium-1,2,2-triolat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	'bicinghoninic acid'
BSA	Rinderserumalbumin (' <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin')
Bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	'cystic fibrosis transmembrane conductance regulator'
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNG-Kanal	durch cyclische Nukleotide regulierter Ionenkanal
cpm	Zählrate radioaktiver Strahlung (' <u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute')
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEA-NO	Diethylamin-NONOate (1-Diethyl-2-Hydroxy-2-Nitroso-Hydrazin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	D,L-Dithiothreitol
EDRF	'endothelium-derived relaxing factor'
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	embryonale Stammzellen
GAF-Domäne	'Domäne aus cGMP-Phosphodiesterasen, Adenylyl-Cyclasen und FhIA (<i>E.coli</i> formate hydrogen lyase transcriptional activator)'
GC	Guanylyl-Cyclase
GC-KO	Guanylyl-Cyclase Knock-out
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyloxy)ethansulfonsäure
IC ₅₀	halbmaximale inhibierende Konzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRAG	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziierte-PKG-Substrat
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LTP	Langzeitpotenzierung
MLCP	Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	nicht-adrenerg-nicht-cholinerg
nNOS	neuronale NO-Synthase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO-GC	NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]-quinoxalin-1-one
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	'polymerase chain reaction'
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ('phosphat buffer saline')
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Prolin-NO	Prolin-NO
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma
PPP	Thrombozyten-freies Plasma
PSD95	'postsynaptic density-95'
RIA	Radioimmunoassay
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat ('sodium dodecyl sulfate')
SERCA	'sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases'
SIN-1	3-Morpholinonydronomin
SNP	Natriumnitroprussid ('sodium nitroprusside')
SNVP	S-Nitroso-N-valerylpenicillamin
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
WP	'washed platelets'
WT	Wildtyp
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzyl-Indazol
% (v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
% (v/v/v)	Volumenprozent (volume/volume/volume)
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)

1. Einleitung

1.1. Zellkommunikation und Signaltransduktion

Vielzellige Organismen beziehen ihre Strukturvielfalt und ihr großes Leistungsvermögen aus der Fähigkeit, die Funktion der verschiedenen Zellen des Gesamtorganismus aufeinander abzustimmen. Träger der interzellulären Kommunikation sind Hormone und Neurotransmitter. Diese Botenstoffe ermöglichen einer Zelle auf andere Zellen in einer spezifischen Art und Weise Einfluss zu nehmen.

Unter dem Begriff der Signaltransduktion oder der Signalübertragung werden Prozesse zusammengefasst, mit deren Hilfe einzelne Zellen Signale (primärer Botenstoff; 'first messenger') aufnehmen und in andere Stimuli umwandeln können. An der intrazellulären Signalleitung sind Proteine und niedermolekulare Botenstoffe (sekundäre Botenstoffe; 'second messenger') beteiligt. Die sekundären Botenstoffe beeinflussen die Aktivität nachgeschalteter Proteine (Effektorproteine). Da die sekundären Botenstoffe lokal gebildet oder freigesetzt werden können, ist es der Zelle möglich, zeitlich und örtlich begrenzte Signale zu erzeugen. Letztlich wird in der Zelle ein spezifischer zellulärer Effekt ausgelöst. Hierzu gehören Prozesse wie z.B. das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Koordination der Zelle bei Veränderung ihrer Gestalt und Bewegung. Insgesamt ermöglicht die Signaltransduktion die Anpassung der Zelle an die aktuellen Bedürfnisse und Bedingungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade untersucht werden. Daher soll im Folgenden zunächst dieser Signalweg sowie seine einzelnen Komponenten vorgestellt werden.

1.2. Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen im Säugetierorganismus. Eine besonders wichtige Rolle nimmt diese Signalkaskade im kardiovaskulären System ein; NO/cGMP-vermittelt kommt es hier zu einer Gefäßrelaxation (Axelsson et al., 1979) und zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Böhme et al., 1974; Haslam et al., 1978; Mellion et al., 1981; Walter und Gambaryan, 2004). Im neuronalen System vermittelt NO/cGMP die Modulation der synaptischen Transmission (Shibuki und Okada, 1991; Lev-Ram et al., 1997). Die NO/cGMP-Signalkaskade und ihre einzelnen Komponenten sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

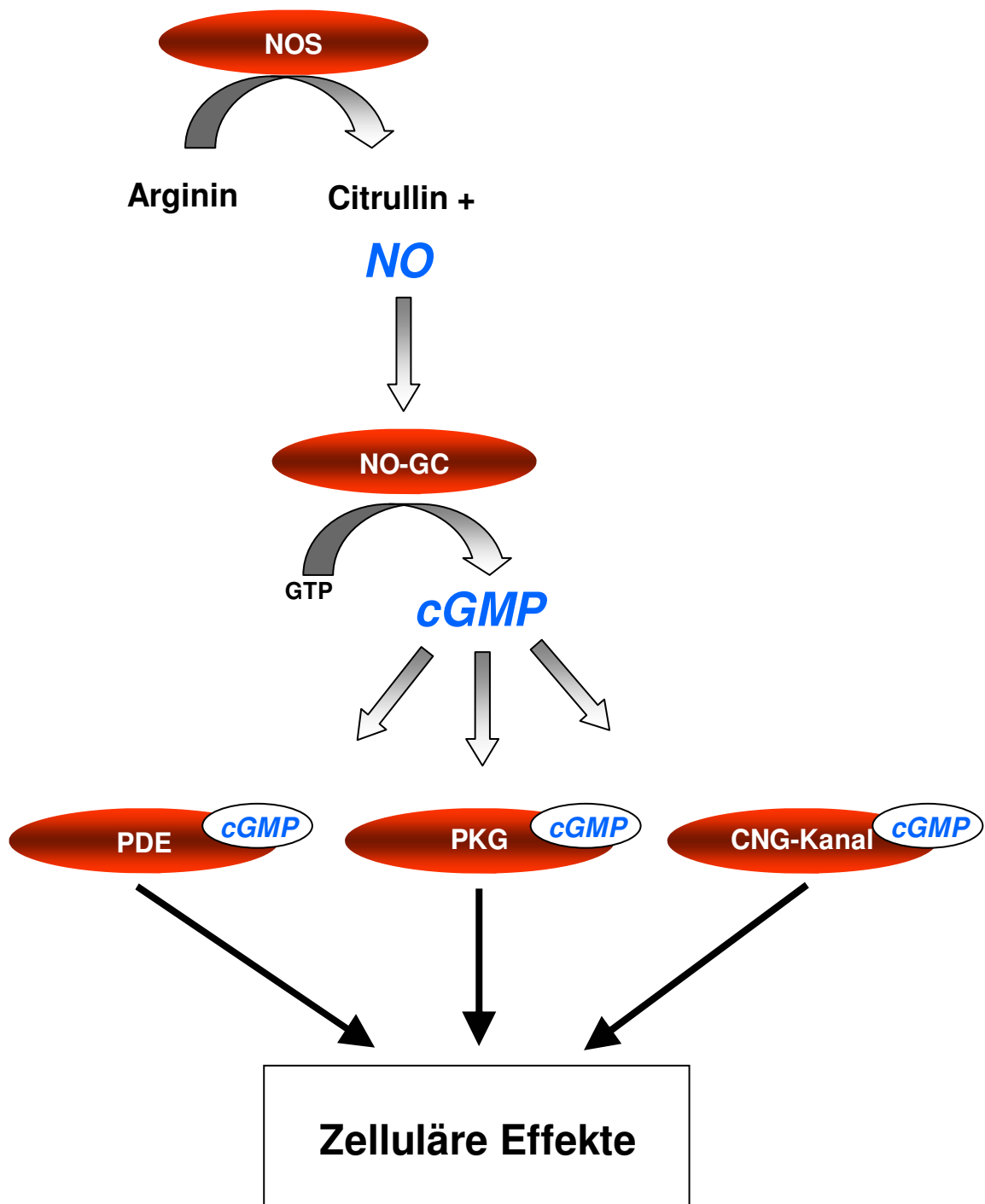


Abb. 1: Die NO/cGMP-Signaltransduktion.

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Die NO-induzierte Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) führt zur gesteigerten cGMP-Synthese. cGMP als sekundärer Botenstoff bewirkt die nachfolgende Aktivierung der cGMP-Effektorproteine (cGMP-abhängige Proteinkinasen, PKG; cGMP-regulierte Phosphodiesterasen, PDE; cGMP-regulierte Ionenkanäle, CNG-Kanäle). Die Aktivierung der cGMP-Effektorproteine führt zu einem spezifischen Effekt in der jeweiligen Zelle. Der Abbau des cGMP-Signals wird in vielen Geweben durch PDEs katalysiert (nicht gezeigt).

1.2.1. Stickstoffmonoxid (NO)

Das Gas Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, welches sowohl in Pflanzen als auch in Säugetieren vorkommt und dort eine Rolle als Signalmolekül einnimmt (Wendehenne et al., 2001). NO wird in den Zellen enzymatisch hergestellt (Nathan und Xie, 1994). Aufgrund der Lipophilie und geringen Größe ist NO in der Lage, nahezu ungehindert durch cytosolische und membranöse Kompartimente zu diffundieren und so in angrenzende Zellen zu gelangen. Damit kann NO sowohl als intra- wie auch als interzelluläres Signalmolekül fungieren. In biologischen Systemen weist NO eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden auf, wodurch die NO-Effekte lokal limitiert sind.

Furchgott und Zawadzki haben 1980 demonstriert, dass der vasodilatierende Effekt von Acetylcholin von einem intakten Endothel und einem labilen, endothelial-abhängigen Faktor (EDRF; 'endothelium-derived relaxing factor') abhängig ist. 1987 konnte gezeigt werden, dass NO für die biologische Aktivität des EDRF verantwortlich ist (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Für die Entdeckung, dass es sich bei EDRF um NO handelt, und EDRF bzw. NO durch die Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) die Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP vermittelt, erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin.

Mittlerweile ist die wichtige physiologische Bedeutung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären, neuronalen und gastrointestinalen System generell akzeptiert (Gibaldi, 1993; Garthwaite und Boulton, 1995; Murad, 1996; Ignarro et al., 1999).

1.2.2. NO-Bildung durch NO-Synthasen (NOS)

Die Bildung von NO in der Zelle wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert und wurde in verschiedenen Zelltypen und Geweben gezeigt (Knowles et al., 1989; Schmidt und Murad, 1991; Wei et al., 1995). Drei Isoformen der NOS sind derzeit bekannt, die alle als Homodimere vorliegen: eine neuronale NOS (nNOS), eine induzierbare NOS (iNOS) und eine endotheliale NOS (eNOS), die historisch auch als NOS I (nNOS), NOS II (iNOS) und NOS III (eNOS) bezeichnet wurden (Förstermann et al., 1994).

Die nNOS ist ein lösliches Enzym von etwa 160 kDa, das hauptsächlich im Gehirn und neuronalen Geweben vorkommt (Mayer et al., 1990; Bredt et al., 1991). Die eNOS ist insbesondere in Endothelzellen lokalisiert (Gyurko et al., 2000) und besitzt eine molekulare Masse von 135 kDa. Die ebenfalls lösliche iNOS (130 kDa) wurde in Makrophagen beschrieben (Hevel et al. 1991; Stuehr et al. 1991; Yui et al. 1991).

Es gilt mittlerweile für jede der NOS als gesichert, dass sie in anderen Zellsystemen als denen, aus welchen sie zuerst isoliert werden konnten, vorhanden sind. So ist die nNOS auch in epithelialen Zellen (Schmidt und Walter, 1994) sowie in glatten Muskelzellen (Loesch und Burnstock, 1995) und die eNOS in Nervenzellen (Kantor et al., 1996) beschrieben worden. Von der iNOS nimmt man an, dass sie in fast allen Zellen des Körpers induziert werden kann (Nathan und Hibbs, 1991; Schmidt und Walter, 1994; Loscalzo, 2001).

Zwischen den NOS-Isoformen besteht eine hohe Sequenzhomologie, sie besitzen nahezu identische katalytische Eigenschaften. Die drei NOS-Isoformen katalysieren die gleiche Reaktion, wobei NO aus einem terminalen Guanidinstickstoff der Aminosäure Arginin enzymatisch freigesetzt wird (Marletta, 1993). Ein weiteres Produkt dieser oxidativen Umsetzung mit molekularem Sauerstoff ist die Aminosäure Citrullin. An der Reaktion sind ebenfalls die Cofaktoren Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavin-adeninmononucleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin beteiligt (Alderton et al., 2001).

Unterschiede der einzelnen NOS-Isoformen zeigen sich bei der Expression und Regulation der Enzyme. So werden die nNOS und die eNOS überwiegend konstitutiv exprimiert und durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert. In ruhenden Zellen mit niedriger intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration sind beide Isoformen inaktiv und weisen eine geringe Affinität zu Calmodulin auf. Kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bindet der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und beide NOS-Isoformen werden katalytisch aktiv. Das von beiden Isoformen synthetisierte NO entfaltet seine Wirkung als Signalmolekül durch die Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (Abb. 1).

Im Gegensatz dazu wird die iNOS nicht konstitutiv exprimiert. Diese NOS-Isoform ist daueraktiv, da sie Calmodulin gebunden hat und somit nicht durch Ca^{2+} reguliert ist (Alderton et al., 2001). Die iNOS wird im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr und bei einer Entzündungsreaktion induziert, wobei sie im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen relativ hohe NO-Mengen produziert, welche eine direkte zytotoxische Wirkung besitzen.

1.2.3. Der sekundäre Botenstoff cGMP

Mit der Entdeckung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) durch Rall und Sutherland konnten erstmals 1958 cyclische Nucleotide als sekundäre Botenstoffe identifiziert werden. Nach der anfänglichen Beschreibung der Wirkung des cAMP wurde nach weiteren cyclischen Nucleotiden gesucht. 1963 wurde schließlich das cyclische

Guanosinmonophosphat (cGMP) erst in Rattenurin (Ashman et al., 1963) und später in fast allen Säugetiergeweben nachgewiesen (Goldberg et al., 1969). Als sekundärer Botenstoff wirkt cGMP (Murad, 1994) im Rahmen der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion auf Effektorproteine wie cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle und bewirkt so unterschiedliche zelluläre Effekte (Abb. 1).

1.3. Bildung von cGMP durch Guanylyl-Cyclasen

Der Nachweis der enzymatischen Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP gelang bereits 1969 (Hardman und Sutherland, 1969; Ishikawa et al., 1969; Schultz et al., 1969; White und Aurbach, 1969). Das Enzym, welches für die enzymatische Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cGMP und Pyrophosphat verantwortlich ist, wurde als Guanylyl-Cyclase bezeichnet. Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde in den verschiedensten Zelltypen und Geweben fast aller bisher untersuchter Organismen nachgewiesen (Waldman und Murad, 1987). Die Bildung von cGMP konnte sowohl an Membranen als auch in membranfreien Überständen nachgewiesen werden. Daher wurde das Vorkommen verschiedener Enzymformen postuliert (Kimura und Murad, 1974; 1975a, b).

1.3.1. Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen

Die membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen (mGC) gehören zur Gruppe der Rezeptor-gekoppelten Enzyme. In Säugetiergewebe sind bisher insgesamt sieben verschiedene Isoformen, bezeichnet als GC-A bis GC-G, identifiziert worden (Lucas et al., 2000; Garbers et al., 2006). Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen sind weit verbreitet, kommen aber nicht in Thrombozyten vor; da sich diese Arbeit auf die Untersuchung muriner Thrombozyten konzentriert, wird auf die mGC nicht weiter eingegangen. Der Wissensstand der mGC ist in den Übersichtsartikeln von Lucas et al. (2000) und Garbers et al. (2006) zusammengefaßt.

1.3.2. NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC)

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) liegt in der Regel als cytosolisches Protein vor und wurde deshalb lange Zeit auch lösliche GC oder sGC ('soluble GC') genannt (Böhme et al., 1984; Koesling und Friebe, 1999). Die NO-GC stellt den wichtigsten Rezeptor für das von den NOS gebildete NO dar (Mergia et al., 2006; Friebe et al., 2007). NO führt nach Bindung an die prosthetische Häm-Gruppe des Enzyms zur Aktivierung und damit zu einer vermehrten cGMP-Bildung.

1.3.2.1. Struktur der NO-GC

Die NO-GC wurde erstmals 1981 aus Rinderlunge isoliert und konnte als ein Hämhaltiges Protein identifiziert werden (Gerzer et al., 1981a, b). Das Enzym ist ein Heterodimer, welches aus einer α - und einer β -Untereinheit gebildet wird. Nach Ermittlung der DNS-Sequenzen der α_1 - und β_1 -Untereinheiten der NO-GC (Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1988; Koesling et al., 1990; Nakane et al., 1990) wurden durch Homologiescreening die α_2 - und β_2 -Untereinheiten gefunden (Yuen et al., 1990; Harteneck et al., 1991). Allerdings wird der β_2 -Untereinheit keine physiologische Bedeutung zugewiesen, da für die humane β_2 -Untereinheit eine Basen-spezifische Deletion beschrieben wurde, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens führt (Behrends und Vehse, 2000). Zudem wurden in einer quantitativen PCR-Analyse nur sehr geringe Mengen mRNA der β_2 -Untereinheit in murinen Geweben detektiert (Mergia et al., 2003).

Ein Vergleich der Primärstruktur der Untereinheiten erlaubte eine Unterteilung in jeweils drei Bereiche. Die N-terminalen Regionen beinhalten die regulatorischen Domänen und weisen vergleichsweise geringe Homologien auf. Die zentrale Region dient der Dimerisierung der beiden Untereinheiten (Lucas et al., 2000). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass neben der zentralen Region der Untereinheiten auch spezifische Bereiche des N-Terminus zur Dimerisierung benötigt werden (Wagner et al., 2005). Die katalytische Domäne weist die ausgeprägteste Homologie unter den Untereinheiten auf und ist auch in den membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen und den Adenylyl-Cyclasen konserviert (Koesling et al., 1990; Friebe und Koesling, 2003; Sinha und Sprang, 2006).

Die einzelnen Untereinheiten besitzen selbst keine katalytische Aktivität, cGMP wird nur durch das dimere Holoenzym katalytisch gebildet. Ein funktionelles Enzym wird durch die Kombination einer α - mit einer β_1 -Untereinheit gebildet (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991; Foerster et al., 1996).

1.3.2.2. Isoformen der NO-GC

Derzeit sind zwei katalytisch aktive und durch NO-stimulierbare Isoformen der NO-GC bekannt, das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991) und das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer (Harteneck et al., 1991). Die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform wird ubiquitär in Säugetierzellen, vor allem in der glatten Gefäßmuskulatur, der Lunge, im Gehirn und den Thrombozyten exprimiert (Mergia et al., 2003; 2006). Aufgrund der starken Expression in kardiovaskulären Organen wird vermutet, dass diese Isoform eine kardiovaskuläre Isoform darstellt. Die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform entspricht eher der neuronalen Isoform, da diese hauptsächlich im Gehirn, jedoch auch in der Lunge exprimiert wird (Mergia et al., 2003).

Die beiden NO-GC-Isoformen zeigen keine funktionellen Unterschiede (Russwurm et al., 1998). Bislang wurde angenommen, dass die NO-GC als lösliches Enzym im Cytosol vorkommt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich der α_2 -Untereinheit eine Interaktion mit der PDZ-Domäne des postsynaptischen Adapterproteins PSD95 ('postsynaptic density-95') eingehen kann (Hoffmüller et al., 1999; Russwurm et al., 2001). Dadurch kann die α_2 -haltige Isoform im Gegensatz zum $\alpha_1\beta_1$ -Dimer an Membranen von Nervenzellen lokalisiert werden. Da das Protein PSD95 mit neuronalen NOS und dem NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor interagiert (Brenman et al., 1996; Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996), ist es denkbar, dass die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform an der Bildung eines Komplexes aus nNOS und einem NMDA-Kanal beteiligt ist und somit an der Modulation der synaptischen Übertragung beteiligt sein könnte (Russwurm et al., 2001).

1.3.2.3. Aktivierungsmechanismus der NO-GC

Beide Isoformen der NO-GC besitzen im N-terminalen Bereich eine nicht-kovalent gebundene prosthetische Hämgruppe, welche für den Aktivierungsmechanismus der NO-GC von zentraler Bedeutung ist. Der N-Terminus der β_1 -Untereinheit ist für die Bindung der prosthetischen Hämgruppe verantwortlich (Schmidt et al., 2005). Das Histidin-105 der β_1 -Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Stimulierung der NO-GC durch NO, denn es fungiert als proximaler Ligand der prosthetischen Hämgruppe (Stone und Marletta, 1994; Wedel et al., 1994; Zhao et al., 1998). Die Bindung von NO an die sechste Koordinationsstelle führt zu einem Aufbrechen der proximalen Histidin-Eisen-Bindung. Dadurch entsteht ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Eisen-Komplex. Es kommt schließlich zu einer Konformationsänderung und zu einer bis zu 200-fachen Aktivitätserhöhung des Enzyms (Friebe und Koesling, 2003).

1.4. Pharmakologische Beeinflussung der NO-GC

1.4.1. NO-freisetzende Substanzen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen heute in den Industrienationen die Todesursachenstatistik mit Abstand an. In Deutschland wird knapp die Hälfte aller Todesfälle auf Krankheiten des Kreislaufsystems wie z.B. Atherosklerose, Hypertonie, koronare Herzkrankheit oder Herzinsuffizienz zurückgeführt.

Zur medikamentösen Therapie der koronaren Herzkrankheit werden Glyceroltrinitrat (GTN) und andere NO-freisetzende Substanzen eingesetzt (Loskove und Frishman, 1995). Der genaue Wirkungsmechanismus war lange Zeit unbekannt. Ende der 1970-er Jahre wurde erkannt, dass NO-freisetzende Substanzen die NO-GC stimulieren. Über die

NO/cGMP-Kaskade führen GTN und andere klinisch eingesetzte NO-Donatoren zur Relaxation großer Kapazitätsgefäße. Dies bewirkt eine Senkung der Vorlast ('preload') des Herzens, eine Verbesserung der koronaren Durchblutung und damit eine Verminderung der Schmerzen beim akuten Angina pectoris-Anfall.

NO-freisetzende Substanzen finden ebenfalls Anwendung in der Grundlagenforschung. Die verschiedenen NO-Donatoren weisen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Halbwertszeit oder NO-Speziesfreisetzung auf. Das freigesetzte NO kann als Nitroxykation ('nitrosonium ion'; NO^+), als Nitroxylanion (NO^-), oder als NO-Radikal (NO^\bullet) vorliegen, dabei spielt das NO-Trägermolekül, an dessen Grundstruktur das freizusetzende NO-Molekül angelagert ist, eine wichtige Rolle. Die für diese Arbeit wichtigen NO-Donatoren sollen im Folgenden vorgestellt werden. Hierbei wurden die NO-Donatoren in Gruppen nach der von ihnen freigesetzten NO-Spezies eingeteilt (Abb. 2).

SNP (Natriumnitroprussid) ist ein Nitrosyl-Eisen-Komplex, der spontan zerfällt und NO^+ freisetzt. Aufgrund seiner vasorelaxierenden Eigenschaft (Ignarro et al., 1991) wurde SNP früher klinisch zur Senkung des Blutdruckes bei der hypertensiven Krise eingesetzt. Eine rasche präsystemische Elimination und die gleichzeitige Freisetzung von Cyanid-Ionen schränken die therapeutischen Möglichkeiten ein. Eine weitere selektiv NO^+ -freisetzende Substanz ist S-Nitrosoglutathion (GSNO), ein Nitrosothiol (Gaston et al., 1993; 1994). In Experimenten mit humanen Thrombozyten wurde gezeigt, dass GSNO die Thrombozytenadhäsion und -aggregation in einem Dosisbereich hemmt, bei dem nur eine minimale Vasodilatation eintritt (De Belder et al., 1994).

Angeli's Salz (Dinatrium-Diazen-1-ium-1,2,2-triolat; Natrium- ω -Oxyhyponitrit; Natrium-Trioxodinitrat) führt in wässrigen Lösungen zur Freisetzung von NO^- (Liochev und Fridovich, 2003). Jedoch wird diese Substanz nicht zur medikamentösen Therapie eingesetzt.

Diazoniumdiolate (1-substituierte Diazen-1-ium-1,2-diolate), die in der Literatur auch als NONOate bezeichnet werden, sind Salze, die die anionische $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$ -Gruppe tragen. In wässrigen, nicht basischen Medien setzen diese spontan zwei Moleküle NO^\bullet frei (Maragos et al., 1991) und stellen ein wichtiges Werkzeug der heute experimentell eingesetzten NO-freisetzenden Substanzen dar. Liegt die funktionelle Gruppe an Stickstoff gebunden vor, spricht man von N-Diazoniumdiolaten. DEA-NO (Natrium 1-(N, N-diethylamino)-diazon-1-ium-1,2-diolat) wurde erstmals 1960 von Drago beschrieben (Drago und Paulik, 1960; Hansen et al., 1982).

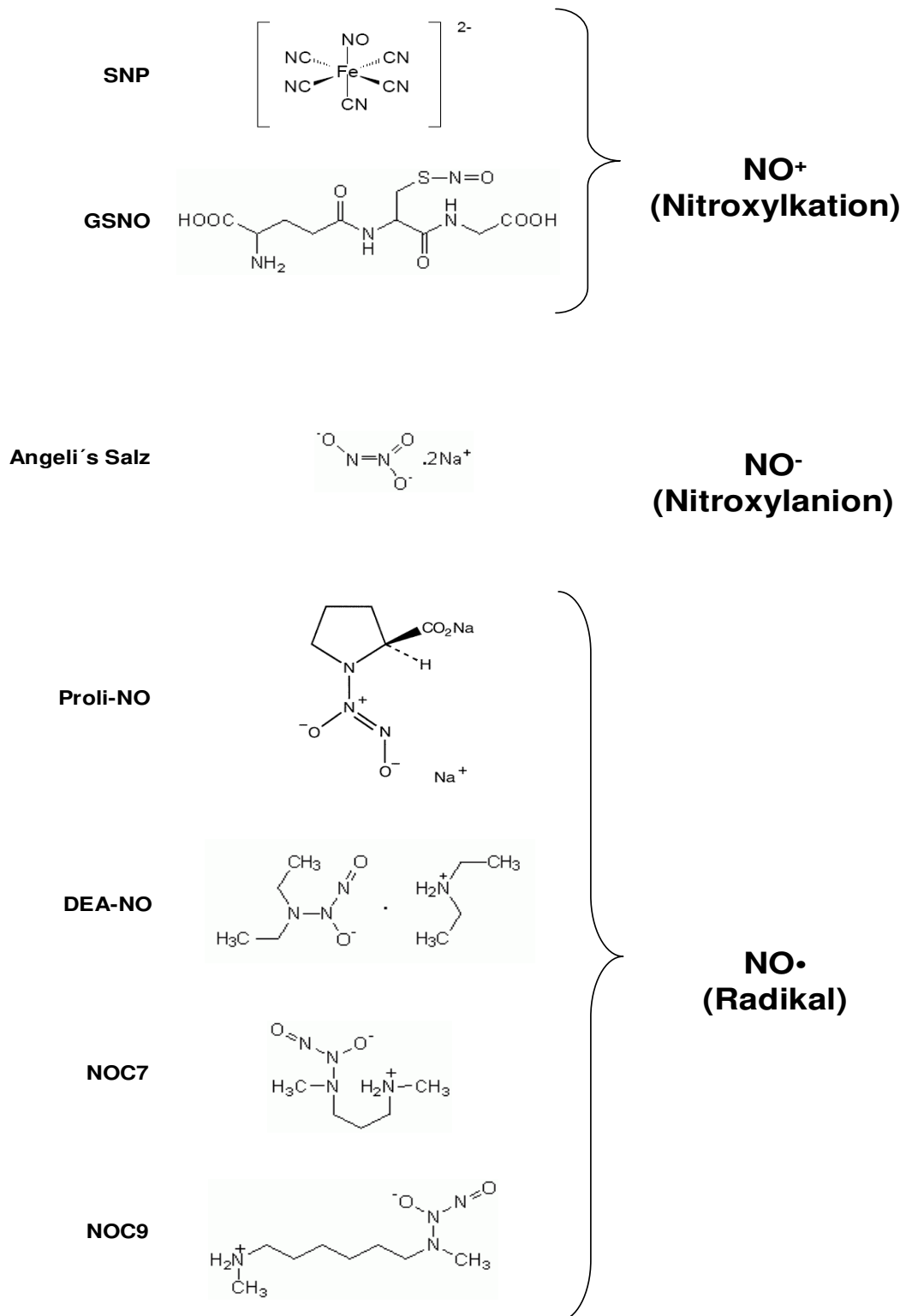


Abb. 2: Chemische Struktur und Einteilung der verwendeten NO-Donatoren.

NO-Donatoren weisen unterschiedliche Eigenschaften auf, wie z.B. Halbwertszeit und freigesetzte NO-Spezies. Das freigesetzte NO kann als Nitroxykation (NO⁺), als Nitroxylanion (NO⁻), oder als NO-Radikal (NO[•]) vorliegen. Die für diese Arbeit verwendeten NO-Donatoren wurden in Gruppen nach der von ihnen freigesetzten NO-Spezies eingeteilt: NO⁺: SNP, GSNO; NO⁻: Angeli's Salz; NO[•]: Proli-NO, DEA-NO, NOC7, NOC 9.

In der Folgezeit wurden mit NOC7 und NOC9 weitere NO-freisetzende Verbindungen (NOC; 'NO-releasing compound') dieser Klasse entwickelt (Hrabie et al., 1993) (NOC7: 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-3-methyl-aminopropyl)-3-methyl-1-triazin; Zhang et al., 1996) und NOC9: 6-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamin; MAHMA NONOate; Wang et al., 2003). Beide NOC-Verbindungen stellen Zwitterionen dar, welche einen stabilen NO-Amin-Komplex bilden, und wie DEA-NO ohne Co-Faktoren zur Freisetzung von zwei NO[•]-Molekülen führen.

Prolin-NO (Prolin-NO) ist eine weitere NO[•]-freisetzende Substanz, die sich aus der nicht-essentiellen, cyclischen Aminosäure L-Prolin und NO zusammensetzt.

1.4.2. NO-unabhängige NO-GC-Aktivatoren

Neben den gerade beschriebenen NO-freisetzenden Substanzen wurden inzwischen auch NO-unabhängige Aktivatoren der NO-GC identifiziert. YC-1 ist ein Benzyl-Indazol-Derivat und aktiviert die NO-GC direkt. Zudem führt YC-1 zu einer Potenzierung der Wirkung von physiologischen NO-Konzentrationen (Wu et al., 1995; Friebe et al., 1996; Mülsch et al., 1997). Neben diesem stimulatorischen Effekt auf die NO-GC zeigt YC-1 einen inhibitorischen Effekt auf Phosphodiesterasen (siehe Kapitel 1.5.2.), wodurch der Abbau des zellulären cGMPs vermindert wird (Friebe et al., 1998; Galle et al., 1999).

Mit BAY41-2272 wurde ein weiterer Aktivator der NO-GC entwickelt. BAY41-2272 stimuliert ebenfalls direkt die NO-GC und führt ebenfalls zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber NO. Es ist dabei etwa 100-fach potenter als YC-1 (Stasch et al., 2001).

Ein weiterer NO-GC-Aktivator, BAY58-2667, stimuliert die Häm-freie NO-GC durch die Interaktion mit bestimmten Aminosäuren der NO-GC, die im Häm-bindenden Bereich liegen (Stasch et al., 2002).

1.4.3. Hemmung der NO-GC

Das Quinoxalin-Derivat 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) ist ein selektiver Hemmstoff der NO-GC. Es wird davon ausgegangen, dass ODQ seine Wirkung über eine Oxidation des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe der NO-GC vermittelt (Garthwaite et al., 1995; Schrammel et al., 1996). ODQ ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Differenzierung cGMP-abhängiger und cGMP-unabhängiger NO-Effekte in intakten Zellen (Garthwaite et al., 1995; Brunner et al., 1995, 1996; Abi-Gerges et al., 1997). Allerdings können hohe ODQ-Konzentrationen zu einer unspezifischen Oxidation anderer Hämproteine führen (Feelisch et al., 1999; Zhao et al., 2000).

1.5. cGMP-Effektorproteine

Die Signalübertragung über cGMP gehört zu den wichtigsten intrazellulären Signalsystemen in Säugerzellen (Denninger und Marletta, 1999; Lucas et al., 2000). Effektoren, die durch den zellulären cGMP-Spiegel beeinflusst werden, sind cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle (Abb. 1).

1.5.1. cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG)

Sehr viele intrazelluläre Signalwege bedienen sich der Proteinphosphorylierung, um Signale weiterzuleiten. Die Proteinkinasen stellen eine der größten Proteinfamilien dar und katalysieren die Übertragung eines Phosphat-Rests an bestimmte Aminosäureseitenketten, wodurch es dann zu einer Änderung der Aktivität von Enzymen und Ionenpumpen kommen kann.

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs) gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP aktiviert. In Säugetieren konnten bisher zwei Gene identifiziert werden, die für die PKGI (Wernet et al., 1989) bzw. die PKGII (Jarchau et al., 1994) kodieren. Die PKGI existiert in Form von zwei Spleißvarianten (PKGI α und PKGI β), die sich in den ersten 89 bzw. 104 Aminosäuren des N-terminalen Bereiches unterscheiden (Hofmann et al., 2006).

Die PKGs der Säugetiere konnten in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen unterschiedlicher Spezies nachgewiesen werden (Pryzwansky et al., 1995; Pfeifer et al., 1999; Hofmann, 2005). Die PKGI wird als lösliches Enzym hauptsächlich in Thrombozyten und in glatter Muskulatur exprimiert (Keilbach et al., 1992). Sie vermittelt im kardiovaskulären System die Hemmung der Thrombozytenaggregation und die Relaxation der glatten Muskulatur (Birschmann und Walter, 2004; Hoffmann et al., 2006).

Eines der am besten untersuchten Substrate der PKGI ist das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), welches an der Regulation der Aktinfilamentassemblierung und Aktinpolymerisation beteiligt ist (Reinhard et al., 2001). VASP weist drei Phosphorylierungsstellen auf, welche mit unterschiedlicher Affinität von der PKGI, aber auch von der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) phosphoryliert werden (Walter et al., 1993; Smolenski et al., 1998). Die VASP-Phosphorylierung steht in einem engen Zusammenhang mit der Inhibierung der Thrombozytenaggregation (Hauser et al., 1999).

Auch das Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziierte-cGMP-Kinase-Substrat (IRAG; Schlossmann et al., 2000) wird durch die PKGI phosphoryliert. In glatten Muskelzellen und Thrombozyten liegt IRAG assoziiert mit dem IP₃-Rezeptor vor (Antl et al., 2007). Die

Phosphorylierung von IRAG durch die PKGI führt zur Hemmung der IP₃-stimulierten Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ammendola et al., 2001). Ausserdem wurde der IP₃-Rezeptor selbst als Substrat der PKGI vorgeschlagen (Haug et al., 1999). Dieser ist neben IRAG an der Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration beteiligt. Für die Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP; Nakamura et al., 1999; Surks et al., 1999) und für die Calcium-abhängigen Kaliumkanäle (BK_{Ca}-Kanal; Fukao et al., 1999) wurde ebenfalls eine Phosphorylierung durch die PKGI gezeigt.

Die PKGII ist nicht löslich, sondern über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert (Vaandrager et al., 1997; Hofmann et al., 2000). Sie wird im Gehirn, in der Dünndarm-Mukosa, der Niere, in den Chondrozyten und der Lunge exprimiert (Lohmann et al., 1997). Derzeit ist nur ein physiologisches Substrat der PKGII bekannt, der CFTR-Kanal ('cystic fibrosis transmembrane conductance regulator'). Wird der CFTR phosphoryliert, so kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Chlorid-Ionen in den Darm (Vaandrager et al., 1998), wobei sekundär Wasser nachfolgt, und es kommt zur Diarhoe.

1.5.2. Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDEs) katalysieren die Umsetzung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP durch die Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe. Auf diese Weise entstehen Adenosinmonophosphat (AMP) bzw. Guanosinmonophosphat (GMP), welche nicht die biologische Aktivität der cyclischen Nukleotide aufweisen. Die Intensität und die Dauer eines cAMP/cGMP-Signals wird nicht nur durch die Bildung, sondern auch durch die Aktivität der jeweils vorhandenen Phosphodiesterasen mitbestimmt. Durch die Hydrolyse der cyclischen Nukleotide führen die PDEs zur Terminierung der cAMP/cGMP-vermittelten Signale.

Die bisher bekannten Säugetier-PDEs lassen sich in 11 Familien (PDE1-PDE11) unterteilen, wobei in jeder Familie noch unterschiedliche Isoformen und Spleißvarianten vorkommen. Die Familien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, Regulation, zellulärer Lokalisation und Gewebeverteilung (Bender und Beavo, 2006). Mit Ausnahme der PDE6 liegen die PDEs als Homodimere vor und bestehen aus mehreren konservierten Domänen, die jeweils für die Lokalisation, Regulation und die Katalyse verantwortlich sind. Dabei liegt die in allen Familien hoch konservierte katalytische Domäne von 250-300 Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus, während die

regulatorischen Domänen in der N-terminalen Hälfte lokalisiert sind (Bender und Beavo, 2006).

Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sich die PDE-Familien in drei Gruppen einteilen. Man unterscheidet cAMP-spezifische PDE-Familien, PDE-Familien mit gemischter Spezifität und cGMP-spezifische PDE-Familien. Die PDE-Familien, die cAMP mit relativ hoher Spezifität gegenüber cGMP abbauen, sind die PDE4, PDE7 und PDE8. Die PDE-Familien mit gemischter Spezifität, d.h., die eine ähnliche Affinität für cAMP und cGMP an ihrer katalytischen Domäne aufweisen, sind die PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11. Zu den PDE-Familien mit hoher Spezifität für cGMP gegenüber cAMP gehören die PDE5, PDE6 und PDE9.

Im Rahmen der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion nimmt die PDE5 eine zentrale Rolle bei der Terminierung des cGMP-Signals ein. Die als Homodimer im Cytosol vorliegende PDE5 wird vorwiegend in der Lunge, der glatten Gefäßmuskulatur, der Niere, im Corpus Cavernosum und in Thrombozyten exprimiert (Corbin und Francis, 1999; Bender und Beavo, 2006). Derzeit sind drei Spleißvarianten der PDE5 bekannt, PDE5A1-3, welche sich jedoch funktionell nicht voneinander unterscheiden (Lin et al., 2000).

Über die Bindung von cGMP an zwei regulatorische, sogenannte GAF-Domänen in der Nähe des N-Terminus des Enzyms wird die Aktivität der PDE5 reguliert (Bender und Beavo, 2006). Darauf folgt die Phosphorylierung der PDE5 durch die PKG (Turko et al., 1998; Corbin et al., 2000).

Die PDE5 wurde als das Zielprotein des Arzneistoffs Sildenafil allgemein bekannt (Corbin und Francis, 1999; Turko et al., 1999) und spielt insbesondere bei der Peniserektion (Burnett, 2006) und bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation eine wichtige Rolle (Haslam et al., 1999; Bender und Beavo, 2006).

1.5.3. cGMP-regulierte Ionenkanäle

Der Vollständigkeit halber soll im Folgenden kurz auf die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle, die sogenannten cyclisch Nukleotid-gesteuerten Kationen-Kanäle (CNG-Kanäle; 'cyclic nucleotide-gated channels'), eingegangen werden. Diese wurden zuerst in sensorischen Zellen, nämlich Photorezeptorzellen (Fesenko et al., 1985; Yau und Nakatani, 1985) und olfaktorischen Neuronen (Nakamura und Gold, 1987) nachgewiesen. Diese Kanäle sind größtenteils an der Signaltransduktion von Umweltreizen an den primären Sinnesneuronen beteiligt. Jedoch wurden CNGs auch in anderen Geweben, wie z.B. dem Darmepithel, Hoden, Ovar, Niere, Hirn und im Herz (Distler et al., 1994) nachgewiesen. Weiteren Untersuchungen zufolge wird der CNG-Kanal auch in Spermatozoen exprimiert

(Weyand et al., 1994; Wiesner et al., 1998). Bei diesen Kanälen handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle. Nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cGMP ermöglichen diese Ionenkanäle den Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen in die Zelle. Diese setzen als tertiäre Botenstoffe ('third messenger') weitere Signalkaskaden in Gang (Biel et al., 1999).

1.6. Transgene Mausmodelle

Die Deletion eines Gens ist eine sehr effektive Methode, um die Funktion eines Gens *in vivo* zu analysieren (Jaenisch, 1988; Shastry, 1994; Galli-Taliadoros, 1995; Houdebine, 2007). Das Ausschalten eines Gens bewirkt das Fehlen des Proteins, welches durch das Gen kodiert wird. Die Analyse des KO-Phänotyps ermöglicht die Funktion des Proteins in einem Organismus zu untersuchen und eventuell neue Funktionen zu identifizieren.

Mäuse (*Mus musculus*) sind derzeit die wichtigste Säugerspezies, in der genomische KOs durchgeführt werden können. Ein wesentlicher Grund dafür ist, dass murine embryonale Stammzellen (ES) in Kultur gehalten werden können (Capecchi, 1989a, b).

Vorteile der Maus sind die hohe Reproduktionsrate, ein geringer räumlicher Anspruch der Tiere und relativ geringe Kosten durch die Tierhaltung. Da Schätzungen zufolge mindestens 99% der Gene von Mäusen und Menschen übereinstimmen (Capecchi, 1994), verspricht man sich, dass die erhobenen Daten am Tiermodell auf den Menschen übertragbar sind (Houdebine, 2007).

Derzeit existieren mehrere KO-Mauslinien, in welchen Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade ausgeschaltet wurden. Diese Mausmodelle haben bereits bei der Aufklärung einiger Funktionen des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges geholfen. Im Folgenden sollen einige dieser Tiermodelle vorgestellt werden.

1.6.1. KO-Mausmodelle der NOS

Wie bereits in Kapitel 1.2.2. dargestellt, sind derzeit drei NOS-Isoformen bekannt, die durch separate Gene kodiert werden (Huang, 2000). Durch die gezielte Inaktivierung jeweils eines der NOS-Gene wurden KO-Mausmodelle generiert, deren Phänotypen wichtige Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der jeweiligen Isoform zuließen.

1.6.1.1. nNOS-defiziente Mäuse

Die als Typ I oder nNOS bezeichnete NOS-Isoform wird in spezifischen Nervenzellen im Gehirn und in nicht-adrenerg-nicht-cholinerger (NANC)-Neuronen des autonomen Nervensystems exprimiert. Zur Generierung nNOS-defizienter Mäuse wurden zwei Strategien verfolgt. Die erste nNOS-KO-Mauslinie wurde durch Huang et al. (1993)

generiert, indem Exon 2 und das Start-Codon genomisch deletiert wurden. Das auffälligste phänotypische Merkmal dieser KO-Mäuse war, neben einem verstärkten aggressiven Verhalten (Nelson et al., 1995), die Entwicklung eines stark vergrößerten Magens mit einer Hypertrophie des Pylorus-Sphincters (Huang et al., 1993).

Es zeigte sich jedoch, dass in diesen nNOS-defizienten Mäusen im Gehirn immer noch NOS-Aktivität (5%) gefunden wurde. Die restliche NOS-Aktivität ließ auf die Expression einer katalytisch aktiven nNOS-Spleißvariante schließen (Eliasson et al., 1997). Die Expression und Aktivität der nNOS β -Spleißvariante konnte schließlich dafür verantwortlich gemacht werden, dass männliche nNOS-KO-Mäuse reproduktionsfähig sind (Hurt et al., 2006).

Eine zweite lebensfähige nNOS-KO-Mauslinie wurde durch Gyurko et al. (2002) generiert, indem Exon 6, welches für die zur katalytischen Aktivierung der nNOS wichtige Häm-bindende Domäne kodiert, genomisch deletiert wurde. Entsprechend wurde in Hirn-Homogenaten aus KO-Mäusen keine nNOS-Aktivität mehr detektiert. Zudem zeigte sich, dass Mäuse beiderlei Geschlechts nicht reproduktionsfähig sind.

Auch diese Mauslinie wies als auffälliges phänotypisches Merkmal eine Pylorusstenose auf (Gyurko et al., 2002). Dieser Befund bestätigte die Rolle von NO als Neurotransmitter von zumindest einem Teil der inhibitorischen NANC-Neuronen, die an der Regulation der gastrointestinalen Motilität und der Pylorus-Relaxation beteiligt sind.

1.6.1.2. iNOS-defiziente Mäuse

Die Expression von Typ II oder iNOS kann in Makrophagen als zelluläre Antwort auf eine Infektion induziert werden. Im Rahmen der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion spielt die iNOS keine physiologische Rolle. Der Vollständigkeit halber sei kurz darauf hingewiesen, dass mehrere iNOS-KO-Linien existieren. Diese Mäuse sind fertil und zeigen keine größeren Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-(WT)- und heterozygoten Mäusen. Jedoch wiesen diese Mäuse eine erhöhte Infektionsanfälligkeit auf (Laubach et al., 1995; MacMicking et al., 1995; Moncada und Liew, 1995; Wei et al., 1995).

1.6.1.3. eNOS-defiziente Mäuse

Die als Typ III oder eNOS bezeichnete NOS-Isoform wird vor allem in Endothelzellen gefunden. Huang et al. (1995) generierten eNOS-defiziente Mäuse, bei denen es durch Acetylcholin nicht mehr zu einer Endothel-abhängigen Vasodilatation kommt. eNOS-defiziente Mäuse sind hyperten. Diese Befunde bestätigen zum einen die Gleichsetzung von EDRF mit NO und unterstreichen zum anderen die Rolle der eNOS-Aktivität bei der Blutdruckregulation (Huang et al., 1995). Zusätzlich zeigen eNOS-defiziente Mäuse im

Vergleich zu WT-Mäusen Defekte bei der Arteriogenese und Angiogenese, was eine antiproliferative Wirkung von endotheliale NO auf die glatten Gefäßmuskelzellen unterstreicht (Moroi et al., 1998; Rudic et al., 1998; Yogo et al., 2000). Obwohl NO bei der Vermittlung der Peniserektion eine wichtige Rolle spielt, waren KO-Mäuse für die eNOS reproduktionsfähig. Nähere Untersuchungen an eNOS- bzw. nNOS-defizienten Mäusen zeigten, dass die Erektion durch Aktivierung der nNOS initiiert wird, während die nachfolgende Aktivierung der eNOS zu einer längerfristigen Aufrechterhaltung der Erektion beiträgt (Burnett et al., 2002; Hurt et al., 2002).

1.6.1.4. nNOS/eNOS/iNOS-defiziente Mäuse

Wie oben gezeigt, wurden bereits einige Studien zur individuellen Untersuchung der einzelnen NOS-Isoformen durchgeführt. Untersuchungen der nNOS/eNOS-defizienten Mäuse ließen auf die kompensatorische Interaktion der NOS-Isoformen schließen (Son et al., 1996). Morishita et al. (2005) haben nNOS/eNOS/iNOS-defiziente Mäuse, in denen alle drei NOS-Isoformen ausgeschaltet sind, generiert. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen NOS-KO-Mäusen keinerlei NOS-Aktivität detektierbar ist. Untersuchungen der NOS-KO-Mäuse zeigten, dass diese wider Erwarten reproduktionsfähig sind. Diese Mäuse sind hyperten und zeigen einen nephrologischen Diabetes insipidus. Die Lebenserwartung dieser Mäuse ist vermindert. Nach 4-5 Monaten waren 80 % der Mäuse gestorben.

1.6.2. KO-Mausmodelle für die PKG

1.6.2.1. PKGI-defiziente Mäuse

Wie bereits in Kapitel 1.5.1. dargestellt, wird die PKGI besonders stark in Thrombozyten und in glatter Muskulatur der Gefäße exprimiert und ist im kardiovaskulären System wahrscheinlich der wichtigste Effektor für cGMP. Die Inaktivierung der PKGI führte zu einem multiplen Phänotyp (Pfeifer et al., 1998). Die KO-Mäuse besitzen eine massiv reduzierte Lebenserwartung wahrscheinlich aufgrund einer gastrointestinalen Dysmotilität. Zudem zeigen die Mäuse eine pathologische Veränderung der Tonusregulation der glatten Muskulatur. Acetylcholin, welches in Endothelzellen die Bildung von NO induziert (Furchgott und Zawadzki, 1980), führt in Organbadversuchen an isolierten Aorten-Ringen aus PKGI-defizienten Mäusen nicht mehr zu einer Vasorelaxation. PKGI-defiziente Mäuse leiden im Alter zwischen 4 und 6 Wochen unter Hypertonie (Pfeifer et al., 1998). Männliche PKGI-defiziente Mäuse wiesen eine stark verminderte Reproduktionsfähigkeit auf, die auf eine erektile Dysfunktion zurückzuführen war (Hedlund et al., 2000). PKG-KO-Tiere zeigen zudem eine gestörte Thrombozytenaggregation. In *in vitro*-Untersuchungen

zeigte sich, dass die Collagen-induzierte Aggregation von Thrombozyten aus den KO-Mäusen nicht durch NO oder cGMP-Analoga gehemmt werden kann. Zudem bilden PKG-defiziente Mäuse *in vivo* im Vergleich zu WT-Mäusen häufiger Thrombosen aus (Massberg et al., 1999). Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass die PKGI der zentrale Mediator für die Wirkungen von NO in Thrombozyten und in der glatten Muskulatur ist.

1.6.2.2. PKGII-defiziente Mäuse

KO-Mäuse für die PKGII zeigten weniger starke pathologische Auffälligkeiten als KO-Mäuse der PKGI. Die PKGII-defizienten Mäuse haben eine normale Lebenserwartung und Reproduktionsfähigkeit. PKGII-defiziente Mäuse sind ca. 30% kleiner als WT-Mäuse, was durch eine starke Wachstumsretardation aufgrund eines Defekts bei der endochondralen Ossifikation bedingt ist (Pfeifer et al., 1996). Dieser Befund bestätigte eine funktionelle Bedeutung der PKGII beim linearen Skelettwachstum.

1.6.3. KO-Mausmodelle für die NO-GC

Vor kurzem wurden Mauslinien generiert, denen die α_1 - und α_2 -Untereinheit (Mergia et al., 2006) sowie die β_1 -Untereinheit (Friebe et al., 2007) der NO-GC fehlen.

1.6.3.1. α -defiziente Mäuse

Die α -KO-Mäuse (α_1 - und α_2 -KO) sind lebensfähig und fertil (Mergia et al., 2006). Der Verlust einer der beiden Isoformen der NO-GC auf Proteinebene führt nicht zu einer Kompensation durch eine Hochregulierung der jeweils anderen Isoform. Im vaskulären System konnte gezeigt werden, dass eine NO-GC-Isoform die Funktion der jeweils anderen Isoform übernehmen kann (Mergia et al., 2006).

Mäuse, denen die α_1 -Untereinheit fehlt, zeigten z.B. in der Aorta nur eine geringe NO-GC-Expression (6%) durch die noch vorhandene $\alpha_2\beta_1$ -Isoform. Im umgekehrten Fall, in α_2 -defizienten Mäusen, zeigte sich eine 94%-ige NO-GC-Expression in der glatten Muskulatur der Gefäße. Interessanterweise wiesen α_1 -KO-Mäuse nur eine leichte Blutdruckerhöhung von 7 mmHg im Vergleich zu WT-Mäusen auf; α_2 -KO-Mäuse sind normoton. Diese Daten zeigen, dass bereits ein kleiner Teil der NO-GC für einen vollen cGMP-vermittelten Effekt ausreicht. Der Überschuss an NO-GC-Molekülen kann demnach als eine NO-Rezeptor-Reserve ('spare receptor') angesehen werden, die *in vivo* zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber NO führt (Mergia et al., 2006).

Eine Beteiligung von NO an der Ausbildung einer Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Signalübertragung wurde bereits durch NOS-KO-Mäuse dargestellt (Son et

al., 1996). In α -defizienten Mäusen bleibt eine NO/cGMP-vermittelte LTP im visuellen Cortex bei beiden α -KO-Mäusen völlig aus (Haghikia et al., 2007). Für die LTP-Ausbildung im visuellen Cortex werden beide NO-GC-Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) benötigt. Somit nehmen beide Isoformen im neuronalen System eine Isoform-spezifische Rolle ein.

1.6.3.2. β_1 -defiziente Mäuse

Anders als die α -KO-Mäuse zeigen die β_1 -defizienten Mäuse eine verminderte Lebenserwartung, eine starke Wachstumsretardation und sind im Vergleich zu WT-Mäusen um ca. 30% kleiner. Über 80% der Mäuse dieser Linie sterben innerhalb der ersten 3 Tage nach der Geburt. Die übrigen 20% der Mäuse sterben zwischen der 3. und 5. Woche, in der Zeit, in welcher die Tiere von der Mutter abgesetzt werden und sich von der Muttermilch auf feste Nahrung umstellen müssen (Friebe et al., 2007).

Die anatomische Untersuchung der β_1 -defizienten Mäuse zeigt, dass das Caecum, die Gallenblase und das Colon der Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen vergrößert sind. Diese Befunde unterstreichen eine wichtige Funktion der NO-GC in glatter Muskulatur. Die Darmpassagezeit bei β_1 -defizienten Mäusen war drastisch verlängert, was auf eine reduzierte gastrointestinale Motilität hinweist. Durch die Fütterung mit einer Ballaststoff-freien Diät konnte die Überlebensrate β_1 -defizienter Mäuse gesteigert werden. Adulte Mäuse wiesen eine systolische Blutdruckerhöhung von ungefähr 26 mmHg im Vergleich zu WT-Geschwistertieren und 19 mmHg zu α_1 -KO-Mäusen auf. Untersuchungen der Aorta im Organbad zeigten, dass eine NO-stimulierte Relaxation der glatten Muskulatur vollständig ausbleibt (Friebe et al., 2007).

Wie nachfolgend ausführlich beschrieben, spielt die NO-GC eine wichtige Rolle bei der NO-induzierten Hemmung der Thrombozytenaggregation. Daher sollte die Funktion der NO-GC-defizienten Thrombozyten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.7. Thrombozyten als zelluläres Modellsystem zur Untersuchung des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung von den Megakaryozyten im Knochenmark und werden im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz abgebaut. Sie weisen im Gegensatz zu anderen eukaryontischen Zellen keinen Zellkern auf und sind dadurch nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Neusynthese von Proteinen fähig. Demnach sind Thrombozyten keine Zellen im klassischen Sinne und werden daher auch 'anukleäre Zellen' genannt. Thrombozyten bilden eine sehr homogene Zellpopulation, d.h. alle Zellen haben im Wesentlichen die gleiche Morphologie, weisen das gleiche Proteinrepertoire auf und reagieren auf äußere Stimuli gleich. Im nicht-aktivierten Zustand weisen

Thrombozyten eine typische diskoide Form auf. Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten sind im Rahmen der Hämostase (Blutstillung) als partikuläre Blutbestandteile direkt an der Bildung von Thromben beteiligt. Zudem beeinflussen sie die Gerinnung und den Gefäßtonus über Ausschüttung von aggregatorischen vasoaktiven Substanzen.

1.7.1. Hämostase

Die Hämostase ist eine lebenswichtige Funktion, durch welche der Körper in der Lage ist, Schäden in Gefäßen abzudichten und somit einen Blutverlust zu reduzieren bzw. zu verhindern. Die Hämostase wird nach der zeitlichen Abfolge in verschiedene Phasen - primäre Hämostase und sekundäre Hämostase - unterteilt.

Während der primären Hämostase (Blutpfropfbildung) adhären Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandläsion (Adhäsion) und bilden durch Interaktion mit weiteren Thrombozyten (Aggregation) den primären hämostatischen Thrombus.

Die sekundäre Hämostase (Blutgerinnung) ist die eigentliche Blutgerinnung und führt zur Ausbildung eines festen Fasernetzes aus Fibrin, in das Thrombozyten und Erythrozyten eingebettet sind.

Die bei der Hämostase ablaufenden physiologischen Prozesse müssen in einem sensibel regulierten Gleichgewicht gehalten werden, damit eine Thrombenbildung vermieden und der Blutstrom nicht gestört wird (Radomski et al., 1993; Schini-Kerth, 1999).

1.7.2. Interaktion zwischen Blutgefäß und Thrombozyten durch Adhäsion

Die Gefäßwand besteht aus drei Schichten: Intima (Endothel und subendotheliale Basalmembran), Media (glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix) und Adventitia (Fibroblasten, extrazelluläre Matrix, kleine Blut- und Lymphgefäße). Die Endothelschicht bildet eine dichte Einzelzellschicht, welche die Gefäßwände auskleidet und das Blut von den thrombogenen Strukturen des Subendothels abtrennt. Bei einer Verletzung werden diese subendothelialen Bereiche freigelegt und für die Thrombozyten zugänglich.

Die Adhäsion von noch ruhenden Thrombozyten an das subendotheliale Bindegewebe der verletzten Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase (Sixma und Wester, 1977; Gibbins, 2004). Die initiale Kontaktaufnahme zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwand findet unter arteriellen Strömungsbedingungen und somit unter hohen Scherkräften statt. Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert, die spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix im Bereich des Subendothels und der Media erkennen. Der wichtigste thrombozytäre Rezeptor ist das Glykoprotein (GP) Ib-V-IX, mit welchem die Thrombozyten an den von-Willebrand-Faktor (vWF) im subendothelialen Bereich binden (Abb. 3A).

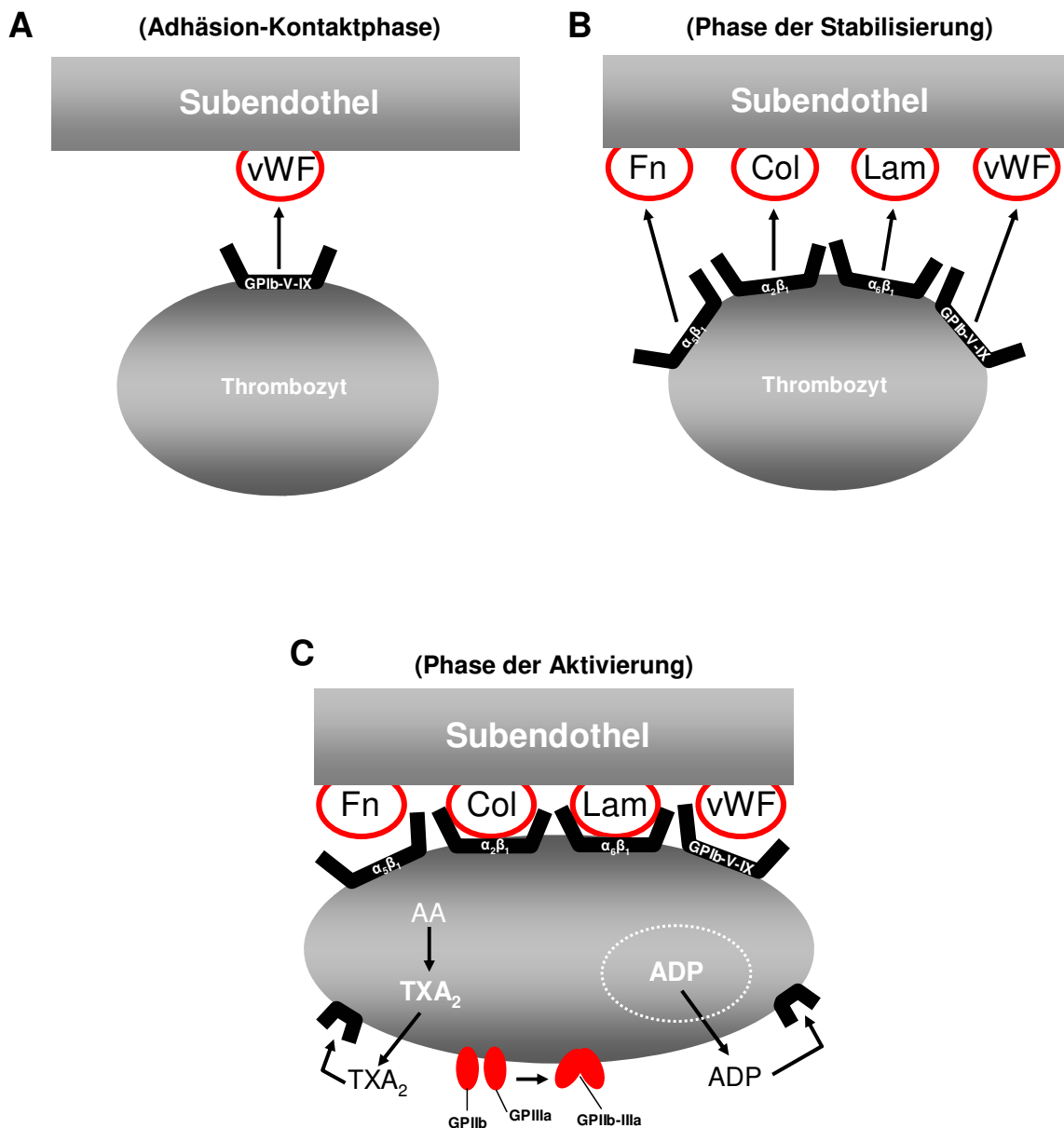


Abb. 3: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion und -aktivierung.

Bei einer Verletzung der Gefäßwand werden subendotheliale Bereiche freigelegt und somit für Thrombozyten zugänglich. Über die Interaktion der thrombozytären Rezeptoren mit dem Subendothel erfolgt die Thrombozytenadhäsion und schließlich auch die Thrombozytenaktivierung.

- (A) Der erste Kontakt (Adhäsion-Kontaktphase) zwischen den Thrombozyten und dem Subendothel erfolgt über die Interaktion des thrombozytären Rezeptors GPIb-V-IX und dem von-Willebrand-Faktor (vWF).
- (B) Die Phase der Stabilisierung der Adhäsion erfolgt durch die Bindung weiterer thrombozytärer Adhäsionsrezeptoren ($\alpha_5\beta_1$: Fibronektin (Fn)-, $\alpha_2\beta_1$: Collagen (Col)- und $\alpha_6\beta_1$: Laminin (Lam)-Rezeptor) an das subendotheliale Bindegewebe.
- (C) In der Phase der Aktivierung kommt es zur Exposition aktiver GPIIb-IIIa-Komplexe in der Plasmamembran der Thrombozyten, die durch die Dimerisierung der inaktiven, monomeren Integrine GPIIb und GPIIIa entstehen. Das aus Arachidonsäure (AA) gebildete Thromboxan A₂ (TXA₂) und das aus intrazellulären Speichern freigesetzte Adenosindiphosphat (ADP) führen durch die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Thrombozytenmembran zur Auto-Aktivierung der Thrombozyten.

Der thrombozytäre Rezeptor GPIb-V-IX gehört zu der Familie der Integrine und ist intrazellulär über einen F-Aktin-bindenden Proteinkomplex mit dem Cytoskelett assoziiert (Gibbins, 2004). Weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren wie z.B. Collagen-, Fibronectin- und Lamininrezeptoren, welche ebenfalls der Rezeptorfamilie der Integrine zugeordnet werden, führen über ihre Bindung an die subendothelialen Bereiche zu einer Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion (Phase der Stabilisierung; Abb. 3B).

1.7.3. Thrombozytenaktivierung

An die Phase der Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion schließt sich die Phase der Aktivierung der Thrombozyten an. Insbesondere die Bindung des thrombozytären Collagenrezeptors an Collagen führt zur Aktivierung und Sekretion selbst-aktivierender Faktoren durch die sogenannte Degranulation, sowie die Synthese des Prostanoids Thromboxan A_2 (TXA₂). Die freigesetzten niedermolekularen Agonisten, wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin, Serotonin und TXA₂, binden an heptahelikale Rezeptoren in der Thrombozytenmembran (Abb. 3C und Abb. 4). Aktivierung dieser Rezeptoren führt G-Protein-vermittelt zur Produktion von IP₃ und 1,2-Diacylglycerol (DAG) durch die Phospholipase C und damit zu einem Anstieg des cytosolischen Calcium-Spiegels (Rink und Sage, 1990; Offermanns, 2000).

Bei der Aktivierung kommt es zunächst zur Formveränderung ('shape change') der adhärennten Thrombozyten. Dabei gehen die Thrombozyten von ihrer rigiden diskoiden Gestalt in eine spheroidere, flexiblere Form über und schwellen an. Es kommt zu einer Umorganisation der formgebenden Anteile des Cytoskeletts, d.h. der Mikrotubuli und bestimmter Aktinfilamente, was die Ausstülpung von Membrananteilen und die daraus resultierende Vergrößerung der Oberfläche auslöst. Dabei bilden die aktivierten Thrombozyten Filopodien und Lamellopodien aus (Morgenstern, 1997).

Im Verlauf der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zudem zur Exposition aktiver GPIIb-IIIa-Komplexe in der Plasmamembran der Thrombozyten, die durch die Dimerisierung der inaktiven, monomeren Integrine GPIIb und GPIIIa entstehen (Abb. 3C). Die Integrin GPIIb-vermittelte Ausbildung funktioneller GPIIb-IIIa-Komplexe wird auch als 'inside-out signalling' bezeichnet und vermittelt die Koadhäsion der Thrombozyten untereinander.

1.7.4. Thrombozytenaggregation

Während der Adhäsion werden Thrombozyten aktiviert und setzen Granulainhaltstoffe frei (Degranulation). Dadurch werden weitere Thrombozyten zur Koadhäsion angeregt. Dieser

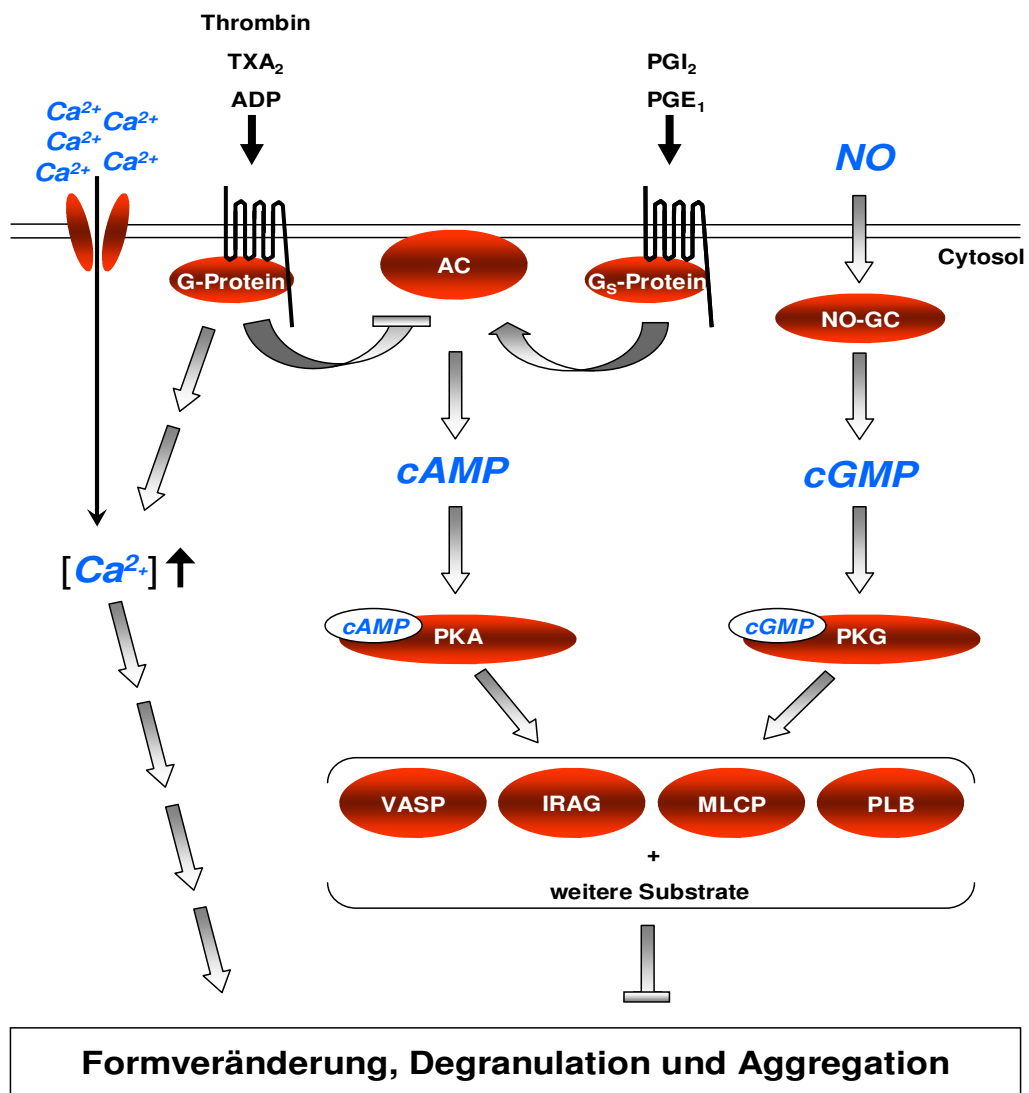


Abb. 4: Schematische Darstellung der Regulation der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation.

Substanzen wie Thrombin, Thromboxan A₂ (TXA₂), Adenosindiphosphat (ADP) binden an spezifische Rezeptoren in der Thrombozytenmembran. Durch die Kopplung an G-Proteine der G_{12/13}, G_q und G_i-Familie wirken sie hemmend auf die Aktivität der Adenyl-Cyclase (AC) und bewirken einen Anstieg des cytosolischen Calcium-Spiegels (Ca²⁺). Durch eine Thrombozytenaktivierung kommt es zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch den Einstrom von Calcium durch Ca²⁺-Kanäle in der Membran und schließlich zur Formveränderung, Adhäsion, Aggregation und Degranulation.

Antagonisten der Thrombozytenaktivierung wie Prostaglandine (PGI₂, PGE₁) führen über die Bindung an spezifische Rezeptoren, welche mit einem G_s-Protein gekoppelt sind, zur Aktivierung der AC, was zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt. NO-induziert kommt es durch die Stimulation der NO-GC zum Anstieg von cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Die Aktivierung der cAMP/cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA/PKG) führt zur Phosphorylierung von Effektorproteinen, wie z.B. dem Vasodilatator-stimulierten Phosphoprotein (VASP), Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziiertes-cGMP-Kinase-Substrat (IRAG), der Myosin-leichten-Kette-Phosphatase (MLCP), Phospholamban (PLB). Diese und weitere Substrate der PKA/PKG führen letztlich zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation.

Prozess der Koadhäsion zwischen zwei bzw. mehreren Thrombozyten, welche entweder adhäsiv an der verletzten Gefäßwand oder frei im Plasma vorliegen, wird Aggregation genannt (Abb. 5). Die Aktivierung aggregierender Thrombozyten führt zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten aus dem Blut, welche wiederum Granulainhaltstoffe freisetzen. Dadurch werden weitere Thrombozyten zur Aggregation angeregt. Der aktive GPIIb-IIIa-Komplex fungiert hierbei als Adhäsionsprotein und ermöglicht die Interaktion mit weiteren Molekülen des vWF, sowie mit den Plasmaproteinen Fibrinogen und Fibronectin. Die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb-IIIa ist Ca^{2+} -abhängig. Über Fibrinogenbrücken zwischen zwei benachbarten Thrombozyten kann sich ein Thrombozytenmikroaggregat bilden (Abb. 5B). Dieser Vorgang ist zunächst noch reversibel. Im weiteren Verlauf degranulieren die Thrombozyten und die Fibrinogenbindung an der Thrombozytenoberfläche wird verfestigt (irreversible Phase; Abb. 5A).

1.7.5. Hemmung der Thrombozytenfunktion

Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sind unter physiologischen Bedingungen einer strengen Regulation unterworfen. Das Endothel setzt Prostazyklin (PGI_2) und NO frei, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP führt. Diese sind neben ihrer relaxierenden Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand verantwortlich für die Hemmung der Thrombozytenaggregation (Mellion et al., 1981; Radomski et al., 1987a, b; Geiger, 2001).

Neben den NO-induzierten cGMP-vermittelten Prozessen werden in der Literatur immer wieder cGMP-unabhängige Mechanismen von NO postuliert. Im Folgenden sollen beide Mechanismen vorgestellt werden.

1.7.5.1. NO/cGMP-vermittelte Mechanismen

Durch die Bindung bestimmter Hormone an ihre Rezeptoren in der Plasmamembran der Endothelzellen kann eine Aktivierung der eNOS ausgelöst werden. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bzw. eine Ca^{2+} -unabhängige Phosphorylierung der eNOS, führen zu einer verstärkten NO-Produktion. Der wahrscheinlich wichtigste Stimulus für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Endothelzelle ist die auf die Gefäßwand wirkende Scherkraft, die durch den Blutfluss ausgeübt wird. Dabei kommt es direkt oder indirekt zu einer Aktivierung unspezifischer Ca^{2+} -permeabler Kationenkanäle (Nilius und Droogmans, 2001). Auf diese Weise kommt es zu einer kontinuierlichen Bildung von NO im Gefäßendothel. Aufgrund der geringen Molekülgröße und des lipophilen Charakters kann NO ungehindert durch Zellmembranen diffundieren.

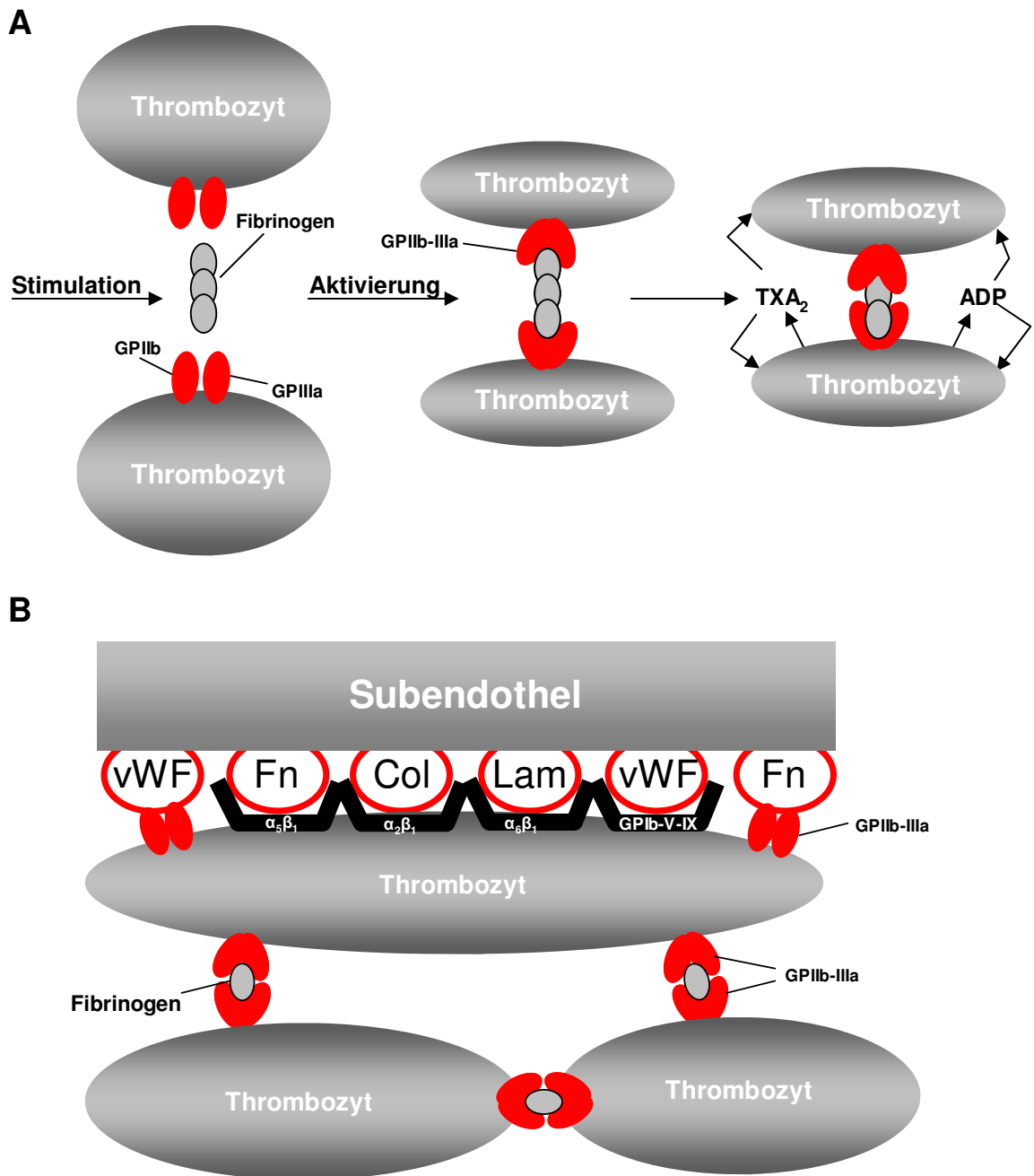


Abb. 5: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation.

- (A) Die Stimulation 'ruhender' (inaktiver) Thrombozyten führt zur Aktivierung der Thrombozyten, d.h. der Dimerisierung der inaktiven, monomeren Integrine GPIIb und GPIIIa zu einem aktiven GPIIb-IIIa-Komplex in der Plasmamembran der Thrombozyten. Der aktive Komplex fungiert als Adhäsionsprotein und ermöglicht die Interaktion mit weiteren Molekülen wie z.B. Fibrinogen. Die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb-IIIa ist Ca^{2+} -abhängig und zunächst reversibel. Die Auto-Aktivierung durch Substanzen wie Thromboxan A_2 (TXA_2) und Adenosindiphosphat (ADP) verfestigt die Fibrinogenbindung (irreversibel).
- (B) Bei der Aggregation zweier benachbarter Thrombozyten bildet sich ein Thrombozytenmikroaggregat.

In Thrombozyten und in der angrenzenden Gefäßmuskulatur kommt es nach einer NO-induzierten Stimulation der NO-GC zur Produktion von cGMP. Das cyclische Nukleotid entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über die PKG (siehe Kapitel 1.5.1.; Butt et al., 1992; Geiger et al., 1992; Eigenthaler et al., 1993; Sausbier et al., 2000), wobei es zur Vasodilatation der glatten Muskulatur der Gefäße kommt.

In Thrombozyten bewirkt die PKGI eine Phosphorylierung von IRAG (Antl et al., 2007). Dieses Protein ist an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert und inhibiert in der Folge die IP₃-induzierte Ca²⁺-Freisetzung (Antl et al., 2007). Ein weiteres cGMP/PKG-Effektorprotein in Thrombozyten ist das bereits beschriebene VASP. Das Protein liegt in Thrombozyten in hoher Konzentration vor, ist mit dem Cytoskelett assoziiert und wird im Bereich der fokalen Kontakte gefunden (Reinhard et al., 2001). Neuere Untersuchungen an VASP-defizienten Thrombozyten aus Mäusen weisen darauf hin, dass VASP bei der Inhibierung der Thrombozytenadhäsion an die Endothelschicht von Blutgefäßen beteiligt ist. Zudem wird angenommen, dass die NO/cGMP-induzierte Hemmung der Endotheladhäsion bei diesen Thrombozyten unterbunden wird (Massberg et al., 2004). Die PKG wirkt außerdem hemmend auf die Phospholamban- und SERCA ('sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases')-abhängige Wiederauffüllung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher (Nguyen et al., 1991; Trepakova et al., 1999). Die Reduktion der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration vermindert die Bildung des Ca²⁺/Calmodulin-Myosin-Komplexes, was eine Vasokonstriktion bzw. Thrombozytenaggregation verhindert (Horowitz et al., 1996).

Zusammenfassend hemmen sowohl cAMP- als auch cGMP-bildende Substanzen die Thrombozytenfunktionen über die Reduktion der freien intrazellulären Calcium-Konzentration in der Zelle.

1.7.5.2. cGMP-unabhängige Mechanismen von NO

NO kann neben der NO-GC auch mit anderen Effektoren interagieren. Als Reaktionspartner von NO können Häm-haltige Proteine, wie bereits für die NO-GC beschrieben, Hämoglobin oder andere metallhaltige Proteine sowie Sauerstoff, Superoxidanionen und Thiolgruppen dienen.

Als ein wichtiger cGMP-unabhängiger Signalweg wird die S-Nitrosylierung von reaktiven Cysteinen in Proteinen oder Peptiden angesehen (Barrett et al., 2005; Blaise et al., 2005). Bei der S-Nitrosylierung reagiert NO mit einer Thiol-Gruppe. Im Gegensatz zu Oxidations- und Nitrierungsreaktionen ist die S-Nitrosylierung eine reversible Reaktion.

Für den NMDA-Rezeptor wurde als eines der ersten Proteine postuliert, dass NO durch S-Nitrosylierung regulierend einwirken kann (Lipton und Stamler, 1994). Eine Reihe weiterer direkter NO-Effektormoleküle wurden in der Literatur beschrieben, so z.B. Cytochrom c, eine cytosolische ADP-Ribosyltransferase, Ionen-Kanäle und G-Proteine (Cleeter et al., 1994; Brune und Lapetina, 1989; Bolotina et al., 1994; Ahern et al., 2002; Fischmeister et al., 2005).

Bis heute ist ungeklärt, ob NO nur über cGMP-abhängige oder auch cGMP-unabhängige Signalwege die Hemmung der Thrombozytenadhäsion bzw. -aggregation vermittelt (Sogo et al., 2000; Crane et al., 2005; Wanstall et al., 2005). In diesen Studien wurden NO-freisetzende Substanzen auf ihre antiaggregatorische Potenz auf humane Thrombozyten untersucht. NO-freisetzende Substanzen, die trotz der Anwesenheit des selektiven NO-GC-Hemmstoffes ODQ zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen, werden demnach als cGMP-unabhängig wirkende Substanzen klassifiziert.

Sogo et al. (2000) konnten zeigen, dass die Agonisten-induzierte Aggregation des Thrombozyten-reichen Plasmas (PRP) in Anwesenheit von ODQ durch das von den NO-Donatoren GTN, GSNO und DEA-NO freigesetzte NO gehemmt wird. SNP hatte allerdings keinen hemmenden Einfluss auf die Agonisten-induzierte Aggregation des PRP. Daher postulierten sie, dass die Signalweiterleitung für das von SNP freigesetzte NO ausschließlich über cGMP-abhängige Signalwege erfolgt. Den anderen NO-Donatoren schrieben sie cGMP-unabhängige Effekte zu.

Auch Crane et al. (2005) zeigten, dass eine Agonisten-induzierte Aggregation des PRP in Anwesenheit von ODQ durch die NO-Donatoren DEA-NO, SNVP (S-Nitroso-N-valerylpenicillamin) und SIN-1 (3-Morpholinosydnonomin) gehemmt werden kann. Die cGMP-unabhängige Wirkung von DEA-NO konnte von dieser Arbeitsgruppe auch in gewaschenen Thrombozyten bestätigt werden.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg ist an der Regulation des Blutdrucks und an der Hemmung der Thrombozytenfunktion beteiligt. NO-freisetzende Substanzen werden bereits seit vielen Jahren zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) stellt den derzeit wichtigsten NO-Rezeptor dar, durch den das NO-Signal in eine intrazelluläre Erhöhung der cGMP-Konzentration umgesetzt wird. Die NO-GC ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Auf Proteinebene konnte das Vorkommen von zwei Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) nachgewiesen werden, die keine funktionell relevanten Unterschiede aufwiesen.

Um die physiologischen Funktionen der NO-GC untersuchen zu können, wurden Mäuse generiert, in denen das Gen für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit (Mergia et al., 2006) und das Gen für die β_1 -Untereinheit (Friebe et al., 2007) ausgeschaltet wurde.

Die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade ist an der Regulation der Thrombozytenfunktion beteiligt. Dabei hemmt NO die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Derzeit ist noch nicht geklärt, ob NO diese Funktion nur über cGMP-abhängige, oder auch über cGMP-unabhängige Mechanismen vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 1) Ist NO in der Lage, *in vitro* die Agonisten-induzierte Aggregation von Thrombozyten aus α_1 -, α_2 - und β_1 -defizienten Mäusen zu hemmen?
- 2) Hat NO *in vitro* einen Einfluss auf die Agonisten-vermittelte Adhäsion und Calcium-Mobilisierung in β_1 -defizienten Thrombozyten?
- 3) Unterscheidet sich *in vivo* die Schwanzblutungszeit von β_1 -defizienten Mäusen im Vergleich zu der von WT-Mäusen?

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Proli-NO, GSNO, DEA-NO, Angeli's Salz, PGE₁ und Iloprost stammten von der Firma Axxora (Grünberg). NOC7 und NOC9 wurden von der Firma Calbiochem/Merck (Schwalbach) bezogen. SNP, humanes Fibrinogen, Thrombin, Heparin und p-Nitrophenylphosphat stammten von der Firma Sigma (Taufkirchen). Fura-2/AM wurde von der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) bezogen. Isofluran stammte von Baxter (Unterschleißheim), 8-pCPT-cGMP von Biolog (Bremen). Sildenafil wurde dankenswerter Weise von der Firma Pfizer (Sandwich, UK) zur Verfügung gestellt. Collagen wurde über die Firma Probe&Go (Endingen) bezogen.

Alle weiteren Chemikalien, welche für die Arbeiten im Labor angefallen sind, stammten von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Applichem (Darmstadt), Applied Biosystems (Weiterstadt), Baker Chemikalien (Gross-Gerau), Biozym (Hess. Oldendorf), Carl-Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Stratagene (Heidelberg) und lagen in Analysequalität vor.

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs oder MBI Fermentas bezogen. Der Molekulargewichtsmarker (SDS-PAGE low-molecular-weight-standards, Low Range) stammte von der Firma Biorad. Antibiotika wurden von der Firma Sigma bezogen.

Für die Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen, bzw. das NucleoSpin Plasmid-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Für die Extraktion von Plasmid-DNS, PCR-Fragmenten und genomischer DNS aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Die radioaktiven Substanzen wurden von der Firma New England Nuclear (Boston, MA/USA) bezogen.

Alle hitzebeständigen Lösungen, Glas- und Plastikmaterialien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 2 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

3.2. Verwendete Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien, welche in dieser Arbeit für die Experimente Verwendung fanden, waren bereits generiert und wurden mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. E. Mergia (α_1 -KO, α_2 -KO) und Herrn Dr. A. Friebe (β_1 -KO) zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse hatten einen chimären 129/SvJ/BL6 genetischen Hintergrund und wurden auf einen C57BL/6 genetischen Hintergrund zurückgekreuzt (F3-F9 Generation). Die Untersuchungen mit den Mäusen aus der Linie β_1 -KO wurden mit 3-16 Wochen alten Mäusen, die der Linien α_1 -KO und α_2 -KO mit adulten Tieren (2-4 Monate alt) durchgeführt. Für die Experimente wurden KO-Mäuse und zur Kontrolle WT-Geschwistertiere beiderlei Geschlecht verwendet. Für nähere Angaben zur Generierung der Mäuse siehe Mergia et al. (2006) und Friebe et al. (2007).

Die Mäuse wurden in einem Tierstall der medizinischen Einrichtungen an der Ruhr-Universität Bochum den Anforderungen entsprechend gehalten (bis 2 adulte Tiere in einem Typ II Makrolon Käfig; bis zu 6 adulte Tiere in einem Typ III Makrolon Käfig). Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer Ballaststoff-freien Diät für Ratten und Mäuse (Altromin C1013) gefüttert und mit Trinkwasser versorgt (Wechsel der Wasserflaschen einmal pro Woche). Als Einstreu und Nistmaterial wurden Holzspäne (Altromin) zur Verfügung gestellt. Zur Zucht wurden zwei Weibchen im gebärfähigen Alter (8-45 Wochen) mit einem Männchen (7 Wochen bis 1 Jahre alt) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 3 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt und durch PCR-Analyse der DNS aus Schwanzgewebe genotypisiert.

3.3. Bakterienstamm

Zur Vermehrung von Plasmid-DNS wurde der *Escherichia coli* K12-Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]^c

3.4. Plasmid und verwendete Oligonukleotide (Primer)

Das Plasmid ist ein Derivat des pBluescript Vektors pBSSK(+) (GenBank-Nr.: X52328) und stammt von der Firma Stratagene (Heidelberg). Es trägt eine zusätzliche DNS-Sequenz, die für einen Teil der DNS-Sequenz der β_1 -Untereinheit kodiert.

Zum Nachweis der „gefloxten“- bzw. deletierten DNS-Sequenz der α_1 -, α_2 - sowie β_1 -Untereinheit der NO-GC wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Alle Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen und mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, auf eine Konzentration von 50 μ M eingestellt. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte mit dem Programm DNASTARTM. Der Buchstabe U (Upper) als tiefgestellter Index kennzeichnet Primer-Sequenzen des Sense-Stranges, der Buchstabe L (Lower) des Antisense-Stranges.

Tab. 1: Oligonukleotide zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.

Die Oligonukleotide F₁U₁ und F₁L₁ wurden zur Amplifizierung eines WT- (879 bp) und α_1 -*flox*-Fragmentes (920 bp) in einer PCR eingesetzt. Zur Generierung eines α_1 -*del*-Fragmentes (997 bp) wurden die Oligonukleotide F₁L₁ und lox- α_1 -U₁ verwendet. Zur Amplifizierung eines WT- (760 bp) und α_2 -*flox*-Fragmentes (800 bp) wurden die Oligonukleotide F₂U₁ und F₂L₂ in einer PCR eingesetzt. Zur Generierung eines α_2 -*del*-Fragmentes (513 bp) wurden die Oligonukleotide P α_2 U₅ und F₂L₁ verwendet. Die Oligonukleotide lox- β_1 -U1, lox- β_1 -L1 sowie del- β_1 -L1Primer wurden zur Amplifizierung eines WT- (680 bp) und β_1 -KO-Fragmentes (830 bp) in einer Multiplex-PCR eingesetzt.

Bezeichnung	Sequenz	UE	Nachweis
F ₁ U ₁ F ₁ L ₁	5'-ATG ACA AAT GAG CAG ACG-3' 5'-TCC CGA GAT GAA GTA GTT AGT A-3'	α_1	WT, flox
F ₁ L ₁ lox- α_1 -U ₁	5'-TCC CGA GAT GAA GTA GTT AGT A-3' 5'-TGT AGA AGA GGG GTA AGA AAG ACC-3'	α_1	del
F ₂ U ₁ F ₂ L ₂	5'-TTT GAA ATT ACT TGG AGA TAG A-3' 5'-AAC TAT GTA ATT ATC AAC TGG-3'	α_2	WT, flox
P α_2 U ₅ F ₂ L ₁	5'-AGG TGG GGC TGT CTC TGA A-3' 5'-GGG GGC CCT GAC ATT TGA-3'	α_2	del
lox- β_1 -U1 lox- β_1 -L1 del- β_1 -L1	5'-AAG ATG CTG AAG GGA AGG ATG C-3' 5'-CAG CCC AAA GAA ACA AGA AGA AAG-3' 5'-GAT GTG GGA TTG TTT CTG AGG A-3'	β_1	WT, del

3.5. Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von Bakterienzellen in kleinem Maßstab erfolgte in Flüssigkulturen in sterilen Greiner-Röhren mit ca. 2 ml LB-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37°C und 200 - 250 rpm über Nacht in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey). Die Kulturen wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von einer Einzelkolonie auf Agarplatten oder mit 50 μ l einer Stammkultur angeimpft.

Bei größeren Kulturvolumina von ca. 10-100 ml wurden zur Anzucht sterile Erlenmeyer-Kolben mit einer über Nacht gewachsenen 2 ml Vorkultur 1%-ig angeimpft. Die Anzucht des Bakterienstamms, der mit dem Plasmid über eine Ampicillinresistenz verfügte, erfolgte in Flüssigmedium, dem das Antibiotikum zugesetzt wurde.

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die Bakterien mit einer Impföse oder einer gebogenen Pasteurpipette auf einer Festagarplatte ausgestrichen und 16 - 18 h bei 37°C bebrütet.

Zur Herstellung von Gefrierstocks wurden 0,7 ml einer Übernachtskultur mit 0,3 ml 88% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:	NaCl	10	g
	Bacto-Pepton	10	g
	Hefe-Extrakt	5	g
	A. dest.	ad 1	l
	mit 2 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt		
LB-Agar:	1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium		
Selektionsmedium:	Ampicillin	100	mg
	LB-Medium	ad 1	l

3.6. Molekularbiologische Methoden

3.6.1. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Escherichia coli-Bakterien sind von sich aus schlecht transformationsfähig. Sie können jedoch durch eine Behandlung mit Calciumchlorid bei niedrigen Temperaturen in die Lage versetzt werden, effizient freie DNS aus dem Medium aufzunehmen. Zur Herstellung kompetenter Zellen nach Sambrook et al. (1989) wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium 1%-ig angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,5 inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Gefäße gegeben und 10 min auf Eis belassen. Schließlich wurden die Zellen sedimentiert (1 min, 20.000 x g, RT). Der Überstand wurde restlos verworfen. Die Zellen wurden dann in 30 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, 10 min auf Eis belassen und anschließend erneut sedimentiert (10 min, 1.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 4 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und mit 4 ml Glycerin versetzt bei -80°C gelagert.

3.6.2. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Vermehrung des Plasmids (ein Derivat des Bluescript Vektors pBSSK(+)) wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL-1-Blue (siehe Kapitel 3.3.) verwendet. Zur Transformation kompetenter Bakterienzellen wurde die Methode nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) eingesetzt. 200 µl kompetente Zellen wurden mit ca. 100 ng Plasmid-DNS vorsichtig gemischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad wurden die Zellen sofort auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (Sambrook et al., 1989; siehe Kapitel 3.5.) und 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4 min, 1.400 x g, RT) sedimentiert. Der erhaltene Überstand wurde abgegossen, so dass mit dem restlichen

Medium die Zellen resuspendiert werden konnten. Im Anschluss wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

3.6.3. Methoden zur DNS-Präparation

3.6.3.1. Präparation von Plasmid-DNS

Die Standard-Präparation von Plasmid-DNS erfolgte durch das Midipräparations-Kit der Firma Qiagen (Hilden) oder durch NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel. Zur Mini-/Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurden die mitgelieferten Puffer der Firma Qiagen bzw. der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Herstellerprotokolle.

3.6.3.2. Lyse tierischen Gewebes zur Isolierung von genomischer DNS

Abgeschnittene Schwanzspitzen (ca. 0,3-0,5 cm lang) von Mäusen wurden mit 200 µl Lysispuffers (0,1 M EDTA, 0,5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 700 µg/ml Proteinase K) versetzt und unter ständigem Schütteln bei 56°C inkubiert. Nach 2-3 Stunden wurde die Gewebelösung abzentrifugiert (10 min, 13.000 x g, RT). Der klare Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.6.4. Methoden zur Extraktion von DNS

3.6.4.1. Extraktion von DNS durch Phenol-Chloroform

Häufig enthalten Nukleinsäurelösungen unerwünschte Verunreinigungen, zumeist handelt es sich dabei um Proteine. Daher wurde der klare Überstand (siehe Kapitel 3.6.3.2.) nacheinander mit einem Volumen Phenol (pH 8,0), einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v/v)) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert (3 min, 14.000 x g, RT) und die obere, wässrige Phase unter Vermeidung der proteinhaltigen Interphase in ein neues Gefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt. Hierzu wurde ein Volumen der wässrigen Phase mit 1/10 Volumen an 3 M Na-Acetat, pH 5,2, und 2 Volumina Ethanol versetzt und vorsichtig durchmischt. Die ausgefallene DNS wurde dabei als weißer Faden sichtbar. Dieser klebrige DNS-Faden wurde dann mit einer Pipettenspitze herausgenommen und in 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Entfernung der Ethanolösung wurde die DNS an der Luft getrocknet, in 50 µl 0,1 mM Tris-HCl pH 8,5, aufgenommen und über Nacht bei 56°C, bzw. bei 37°C im Brutschrank gelöst.

3.6.4.2. Extraktion von DNS mittels Isopropanol

Eine Alternative zur Reinigung von DNS mit dem ätzenden und giftigen Phenol ist die Extraktion mittels Isopropanol. Hierzu wurde das klare Gewebslysat mit 500 µl Isopropanol versetzt und geschüttelt, bis ein weißlicher Faden sichtbar wurde. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (1 min, 13.000 x g, RT), so dass die DNS sedimentierte und die Flüssigkeit komplett abgenommen und verworfen werden konnte. Die DNS wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (4 min, 18.000 x g, RT). Die sedimentierte DNS wurde für 1 min bei 56°C getrocknet, in 50 µl 0,1 mM Tris-HCl, pH 8,5, aufgenommen und über Nacht bei 56°C gelöst.

Es zeigte sich, dass diese Art der DNS-Reinigung sehr effizient und zudem Zeit und Kosten einsparend ist, jedoch nicht für die Extraktion von DNS aus Gewebe von verstorbenen Tieren einzusetzen war.

3.6.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

3.6.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Messungen wurden in Quarzküvetten oder speziellen UV-durchlässigen Kunststoffküvetten (UVette[®]) mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf durchgeführt.

3.6.5.2. Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese

Geringe Mengen an DNS wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.6.8.) quantifiziert. Auf ein 0,8%-iges Agarosegel in TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde ein Teilvolumen der zu bestimmenden DNS-Lösung und ein Mengenmarker ('High DNS MASS Ladder', Invitrogen), der aus verschiedenen DNS-Fragmenten bekannter Länge und Konzentration besteht, aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde durch Vergleich der Bandenintensitäten unter UV-Licht die Menge des zur Bestimmung eingesetzten DNS-Fragmentes abgeschätzt. Das Ergebnis ist somit mit einiger Ungenauigkeit behaftet. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 5 ng DNS pro Bande. Neben der Konzentration wird auch die Länge des DNS-Fragmentes mitbestimmt und erlaubt Rückschlüsse auf die Unversehrtheit sowie auf Verunreinigungen mit anderen DNS-Fragmenten.

3.6.6. Amplifikation spezifischer DNS-Fragmente mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, 'polymerase chain reaction') ist ein *in vitro*-Amplifikationsverfahren von definierten DNS-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988; Sambrook et al., 1989). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess, der auf der Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten beruht: 1. Denaturierung ('denaturation'), 2. Primeranlagerung ('annealing') und 3. Polymerisation ('elongation'). Im Idealfall wird in jedem Zyklus der durch die Oligonukleotide flankierte DNS-Abschnitt verdoppelt, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz führt (bei n Zyklen: 2^{n-1}). Eine typische PCR wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt und enthielt 1 μ l Template-DNS (ca. 200 ng genomische DNS), je 500 nM der Primer (siehe Kapitel 3.4.), je 200 μ M der Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 U Taq-Polymerase (Invitrogen), den von der Herstellerfirma des Enzyms mitgelieferten Puffer (1-facher Konzentration) und 1,5 mM oder 2,5 mM $MgCl_2$. Anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler (Eppendorf) nach einem initialen Denaturierungsschritt der doppelsträngigen Template-DNS (3 min bei 94 °C) bei folgendem Temperaturverlauf durchgeführt: Schritt 1 Denaturierung: 94 °C/30 s. Schritt 2 Anlagerung der Primer: ermittelte Annealing-Temperatur (T_a)/45 s. Schritt 3 Verlängerung der Primer: 72 °C/1-4 min je nach Länge des erwarteten Produktes. Diese drei Schritte wurden in der PCR 30-mal wiederholt. In der letzten Runde wurde die Zeit für den Polymerisationsschritt auf 7 min verlängert, damit alle Stränge vollständig synthetisiert werden.

Bei allen Amplifikationen wurde eine Negativkontrolle in Form eines PCR-Ansatzes ohne Template-DNS mit angesetzt, um mögliche Kontaminationen nachweisen zu können.

3.6.7. Restriktionsverdau der genomischen DNS

Die Typ-II-Restriktionsendonukleasen hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen eines DNS-Moleküls, die innerhalb einer kleinen, in der Regel vier bis sechs Basenpaare (bp) langen, spezifischen Erkennungssequenz liegen. Die hydrolytische Spaltung der beiden DNS-Stränge wird auch als Restriktionsenzymverdau oder einfach als Verdau der DNS bezeichnet. Unter optimalen Reaktionsbedingungen schneidet ein Restriktionsenzym die DNS an sämtlichen vorhandenen Erkennungsstellen. Die dabei entstehenden DNS-Fragmente stehen sowohl untereinander als auch zum Ausgangs-DNS-Molekül im äquimolaren Verhältnis. Unter suboptimalen Reaktionsbedingungen werden dagegen nicht alle vorhandenen Erkennungsstellen eines Enzyms gespalten und es besteht kein äquimolares Verhältnis zwischen Ausgangs-DNS und daraus entstehenden DNS-

Fragmenten. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI-Fermentas bzw. NEB bezogen, die jeweils entsprechenden optimierten Reaktionspuffer wurden mitgeliefert. Die unter 3.6.3.2. isolierte und unter 3.6.4. extrahierte genomische DNA (10 µg) wurde in einem Reaktionsvolumen von 30 µl mit 15 U des ausgewählten Enzyms (NheI) über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurden weitere 10 U des Enzyms zugegeben und die Reaktion für 4-5 h fortgesetzt.

3.6.8. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von doppelsträngiger DNS

Doppelsträngige DNS-Fragmente können aufgrund der negativen Ladung elektrophoretisch in horizontalen, nicht-denaturierenden Agarosegelen entsprechend der Länge getrennt werden. Dabei ist die relative Wanderungstrecke eines DNS-Fragmentes umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus seiner Länge. Die Länge der Fragmente wird bestimmt durch den Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge, die als Größenmarker auf demselben Gel aufgetragen werden. Je nach zu erwartender Länge der zu bestimmenden Fragmente wurden 0,5 µg folgender Größenmarker aufgetragen: zur Größenbestimmung zwischen 12 kb und 500 bp wurde die „1 kb DNS Ladder“ (Invitrogen) eingesetzt und für solche zwischen 1,5 kb und 100 bp die „100 bp DNS Ladder“ (NEB). Die Qualität der Auftrennung hängt von der Agarose-Konzentration im Gel und von der angelegten elektrischen Feldstärke ab. Diese Bedingungen wurden hinsichtlich der Länge der Fragmente ausgewählt, wobei auch die Unterschiede in den Fragmentlängen berücksichtigt wurden. Bei der Gelelektrophorese von genomischer DNS wurden 0,5%-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die Auftrennung der DNS erfolgte über Nacht mit einer Feldstärke von 1,25 V/cm. Die Bestimmung der Anzahl und Größe von DNS-Fragmenten aus Restriktionsanalysen von Plasmiden erfolgte meist auf 0,8%-igen Agarosegelen in TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 5 V/cm. Sollten Fragmente mit einer Länge unter 1000 bp und Längenunterschiede von etwa 40 bp nachgewiesen werden, wurden 1,2-2,5%-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer angewandt, und eine Feldstärke von 5 V/cm angelegt. Da die DNS-Lösungen annähernd die gleiche Dichte wie der Elektrophoresepuffer (TAE) besitzen, wurden sie vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (60 mM EDTA, 60% Glycerin, Bromphenolblau) versetzt. Zum Nachweis der DNS-Fragmente enthielten die Agarosegele Ethidiumbromid-Lösung (10 µl einer 1%-igen (10 mg/ml) Ethidiumbromid-Stocklösung ad 100 ml 1-fach TAE-Puffer). Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen und absorbiert verstärkt UV-Licht. Diese Energie wird im sichtbaren Bereich (560 nm) wieder abgegeben, wobei die DNS-Fragmente als rot-orange-farbene Banden sichtbar

werden. Zur Dokumentation der Banden wurden die Agarosegele auf dem UV-Transilluminator (Fluo-Link; Biometra) von unten mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt und mit einer CCD-Kamera (QuickStore; MS Laborgeräte) aufgenommen.

3.6.9. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen und DNS-Lösungen

Um das gewünschte DNS-Fragment von weiteren Spaltprodukten eines Restriktionsverdau oder Nebenprodukten einer PCR-Reaktion zu trennen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt und die entsprechende Bande wurde dann mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Isolierung der DNS aus dem mit TAE gepufferten Agarosegelstück wie auch aus DNS-haltigen Lösungen erfolgte durch reversible Bindung der DNS an Glasmilch. Dazu wurden folgende kommerzielle Reagenziensysteme verwendet: das „QIAquick PCR Purification/Gel Extraction“ Kit, von Qiagen, das „High Pure PCR Product Purification“ Kit von Boehringer Mannheim, der „NucleoSpin Extract 2 in 1“ von Macherey-Nagel. In diesen Reagenziensystemen waren alle notwendigen Puffer sowie die Affinitätssäulen mit Kieselgelmembranen enthalten. Die Isolierung der DNS erfolgte jeweils gemäß den Angaben der Hersteller.

3.6.10. Southern-Blot

Ziel des Southern Blots ist es, DNS-Fragmente, die zuvor durch spezifische Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe Kapitel 3.6.7.) und mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.6.8.) entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf eine Membran zu transferieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNS-Fragmente spezifisch nachweisen zu können.

3.6.10.1. Transfer von DNS-Fragmenten auf Nylonmembranen

Um DNS-Fragmente spezifisch durch Hybridisierung mit radioaktiven Sonden nachweisen zu können, wurden sie nach ihrer Auftrennung in Agarosegelen auf Nylonmembranen übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe von einseitig gerichteten Kapillarkräften. Vor dem Blotten wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl-Lösung gelegt, um die DNS partiell zu depurinieren und somit die Transfereffizienz von Fragmenten mit einer Länge von mehr als 10 kb zu erhöhen. Danach wurde das Gel für 30 min in etwa das 3-fache Gel-Volumen 0,4 N NaOH-Lösung gelegt, um die DNS zu denaturieren. Die verwendete Nylonmembran (GeneScreen Plus; NEN) wurde ebenfalls vorbehandelt. Zuerst wurde sie mit destilliertem Wasser benetzt und dann in 0,4 N NaOH-Lösung 15 min äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf einem Papiertücherstapel wurde mit 0,4 N

NaOH getränktes Filterpapier (3 MM Chromatographie-Papier, Whatmann), darauf die Membran und dann das Gel mit den Geltaschen nach unten gelegt. Das Filterpapier und die Membran waren so zurechtgeschnitten, dass sie eine größere Fläche als das Gel aufwiesen. Auf das Gel wurden vier mit 0,4 N NaOH getränkte Lagen Filterpapierstreifen gelegt, die die Breite des Gels aufweisen und lang genug waren, um mit einem Ende in ein daneben stehendes Vorratsgefäß mit 0,4 N NaOH eingetaucht zu werden. Für einen gleichmäßigen Andruck wurde oben auf den Stapel ein Gewicht gelegt. Bei dem Aufbau wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den jeweiligen Schichten des Stapels eingeschlossen blieben, die zur Unterbrechung der Strömung der Transferlösung (0,4 N NaOH) hätten führen können. Die Transferlösung wird nach unten gesaugt. Die dabei entstehenden Kapillarkräfte transportierten die DNS-Fragmente auf die unter dem Gel liegende Nylonmembran, wo sie schließlich kovalent gebunden wurden. Der Transfer von genomischer DNS dauerte etwa fünf Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2-facher SSC-Lösung (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat, pH 7,2) geschwenkt und an der Luft getrocknet oder mit der Hybridisierung fortgefahren.

3.6.10.2. Herstellung radioaktiv markierter DNS-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNS-Fragmente erfolgte mit Hilfe der „random priming“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Diese Methode ermöglicht die Synthese von DNS-Sonden mit hohen spezifischen Aktivitäten (5×10^8 - 4×10^9 cpm/ μ g DNS). Dazu wird die doppelsträngige Template-DNS denaturiert und mit zufälligen Hexanukleotiden ('random primers') hybridisiert, die dann als Primer für eine DNS-Polymerase I dienen. 100 ng der Template-DNS wurden nach Denaturierung im kochenden Wasserbad in einem Reaktionsansatz von 30 μ l mit je 20 μ M dCTP, dGTP, dTTP und 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 M HEPES, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 6 OD_{260nm}/ml Hexanukleotiden, 100 μ Ci [α -³²P] dATP (6000 Ci/mmol) und 5 U Klenow-Polymerase (langes Fragment) 3 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,5, 2 μ l Heringsspermien-DNS (10 mg/ml), 63 μ l H₂O, 50 μ l 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,2, und 250 μ l Ethanol abgestoppt. Die Präzipitation der fertigen DNS-Sonde erfolgte nach Inkubation für 30 min auf Eis und Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4°C). Das Sediment wurde in 50 μ l Wasser aufgenommen, 10 min hitzedenaturiert, dann auf Eis abgekühlt und sofort in die Hybridisierung eingesetzt.

3.6.10.3. Überprüfung der radioaktiven Markierung

Um zu überprüfen, ob die Markierung der DNS erfolgreich verlaufen war, wurde das Ausmaß des Einbaus des radioaktiv markierten Nukleotides bestimmt. Hierfür wurde aus

2 µl des 1:100 verdünnten Reaktionsansatzes die markierte DNS durch Zugabe von 50 µl BSA (10 mg/ml) und 950 µl eiskalter, 10%-iger (w/v) Trichloressigsäure präzipitiert. Nach Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, RT) wurden Überstand (freie nicht eingebaute radioaktiv markierte Nukleotide) und Präzipitat (radioaktiv markierte DNS) getrennt. Die Zerfallsraten des ^{32}P wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Zerfallsrate im Präzipitat mit der Summe der Zerfallsraten in Präzipitat und Überstand.

3.6.10.4. Hybridisierung

Die Nylonmembran mit der gebundenen DNS wurde in einer Glasröhre mit der DNS-Seite nach innen zeigend zunächst mit 2-facher SSC-Lösung, pH 7,2, 30 min bei 68°C in einem Hybridisierungssofen gewaschen. Um verbleibende freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran anschließend weiter bei 68°C für ca. 1-2 h prähybridisiert. Die Prähybridisierung erfolgte mit mindestens 0,5 ml pro cm² Membran Church-Puffer (7% SDS, 0,5 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% BSA). Die anschließende Hybridisierung erfolgte 16 h bei 68°C durch Zugabe der denaturierten Sonde in 5 ml Church-Puffer. Im Anschluss wurde die Membran in einer Schale mit 2-facher SSC pH 7,2, 0,2% SDS bei RT gewaschen. Ein zweiter Waschschrift erfolgte bei 65°C mit der gleichen Waschlösung für 5-15 min. Der Waschvorgang wurde beendet, wenn die Gesamtstrahlung des Blots unter einen mit einem Handmonitor (Modell LB 122; Berthold) gemessenen Wert von etwa 80 Impulse/s pro 100 cm² Membranfläche fiel. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und zur Detektion der radioaktiven Signale auf einem Röntgenfilm oder auf einer speziell beschichteten Phosphorimager-Platte exponiert.

3.6.10.5. Nachweis der markierten DNS

Radioaktiv markierte DNS auf Nylonmembranen wurde durch Exposition auf Röntgenfilmen oder speziell beschichteten Phosphorimager-Platten nachgewiesen. Zur Autoradiographie wurden BioMax MS Filme und BioMax MS Verstärkerfolien von Kodak verwendet. Die Exposition erfolgte in Röntgenkassetten bei -70°C, um die Stabilität der durch die ionisierende Strahlung aktivierten Silberbromidkristalle zu erhöhen. Bei der Entwicklung wurden dann die aktivierten Silberbromidkristalle zu schwarzen Silberkörnern reduziert, wodurch die mit der Sonde interagierenden DNS-Banden sichtbar wurden. Die Expositionszeit variierte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Signalstärke. So wurde ein Blot mit genomischer DNS 5-24 h exponiert. Dagegen lieferte bei der Verwendung einer Phosphorimager-Platte schon nach 4 h Expositionszeit deutlich erkennbare Signale. Dazu wurde nach der Exposition die verwendete Platte (BAS-MS, FUJI) im

Phosphorimager (Fujix BAS 1000) mittels Laserlicht ausgelesen und die Daten mit dem Programm TINA ausgewertet.

Um die β_1 -Untereinheit der NO-GC mittels Southern-Blot nachweisen zu können wurde eine 3'-homologe Rekombinationsstrategie verfolgt. Hierbei sollte isolierte DNS aus WT-Tieren ein ungefähr 5,5 kb große Bande, aus Tieren die Träger des flox-Alleles sind eine ungefähr 11,7 kb große Bande und Tiere die ein Deletion in ihrem Genom aufweisen eine ca. 10,2 kb große Bande aufweisen.

3.7. Proteinbiochemische Methoden

3.7.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden entweder mittels der Methode nach Bradford (1976) oder nach der BCA-Methode ('b_ic_in_ch_on_ic a_ci_d'; Smith et al., 1985) gemäß den Herstellerangaben (Pierce) durchgeführt.

3.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von murinen Proteinen

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung. Die meisten Proteine binden SDS (Natriumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit β -Mercaptoethanol und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (Sekundärstruktur). Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit für viele Messmethoden nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf. Die verschiedenen SDS-Gelelektrophoresesysteme unterscheiden sich u.a. in den verwendeten Puffern. Am häufigsten wird das diskontinuierliche Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli, 1970). Der SDS-haltige Probenpuffer für die Gelelektrophorese nach Laemmli enthielt 10% (v/v) Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris, pH 6,6 (Laemmli, 1970).

3.7.3. Coomassie-Färbung von Proteinen

Der einfachste Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen ist die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Merril, 1990), wobei aromatische und basische Reste der Aminosäuren angefärbt werden. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden

die Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant-Blue ca. 1 h unter Schütteln angefärbt oder auf Nitrocellulose (siehe Kapitel 3.7.4.) überführt. Die Gelentfärbung erfolgte zunächst für 10 min in der Entfärbelösung I (s. u.) und anschließend für mehrere Stunden in der Entfärbelösung II (s. u.).

Färbelösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250
 500 ml Methanol
 70 ml Eisessig
 ad 1 l A. dest.

Entfärbelösung I: 50% Methanol
 7,5% Eisessig
 ad 1 l A. dest.

Entfärbelösung II: 5% Methanol
 7,5% Eisessig
 ad 1 l A. dest.

3.7.4. Immunologische Methoden

3.7.4.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen (siehe Kapitel 3.7.2.) auf Nitrozellulosemembranen erfolgte nach der Methode von Towbin et al. (1979). Im Anschluss an eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine in Mini-Gelkammern (Mini-Protean II Cell, Biorad) durch den elektrischen Transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) überführt (1 ½ h, 160 V, 54 mA).

3.7.4.2. Ponceau-Färbung und Absättigung der Nitrozellulosemembran

Zur Überprüfung des Transfererfolges wurden die Proteine sofort nach Beendigung des Blotvorganges für 4 min mit Ponceaureagenz (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (v/v) Trichloressigsäure) bei RT gefärbt, so dass die Proteinbanden auf der Membran sichtbar wurden. Nach dem Markieren der Größenstandards wurde die Membran für 30 min mit Roti-Block (Roth) zur Absättigung freier Proteinbindestellen inkubiert. Anschließend wurde die Membran zur Aufbewahrung an der Luft getrocknet oder zur Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper eingesetzt.

3.7.4.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum Nachweis der elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Inkubation mit einem sekundären, Immunglobulin-spezifischen Antikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Als Substrat wurde das 'Biowest™ extended duration bioluminescence detection kit' (UVP) verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer (Biochemi™ GDS 8000 System, UVP).

3.7.5. Quantitative Bestimmung von cAMP und cGMP mittels Radioimmunoassay

3.7.5.1. Herstellung von radioaktiv markiertem cAMP und cGMP (Tracer)

Die Herstellung von radioaktiv markierten cyclischen Nukleotiden wurde nach der Chloramin T (N-Chlor-Toluol-Sulfonamid Natrium)-Methode (Hunter und Greenwood, 1964; Steiner et al., 1972) vorgenommen. Dabei wird der Tyrosinmethylester von 2'-Succinyl-cGMP/cAMP (Sc-cGMP/cAMP-TME) am aromatischen Ring des Tyrosylrests durch eine elektrophile Substitution mit ^{125}I markiert. Der Reaktionsansatz enthielt dabei 36,5 µl Phosphatpuffer (500 mM, pH 7,4), 5 µl 160 µM Sc-cGMP/cAMP-TME (800 pmol) und 9,5 µl Na^{125}I (37 MBq bzw. 400 pmol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1,8 µM Chloramin T (90 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gestartet (100 µl Gesamtvolumen) und nach 50 Sekunden durch Zugabe von 100 µl 2,6 µM Na-Metabisulfit (260 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gestoppt. Durch Chloramin T wird das Iodid zu molekularem Iod (I_2) oxidiert, welches an mehreren Positionen des aromatischen Rings (bevorzugt in ortho-Position zur OH-Gruppe) Reaktionen eingehen kann (elektrophile Substitution). Die Zugabe von Na-Metabisulfit stoppt die Reaktion durch Reduktion des molekularen Iods zu Iodid. Die Reinigung des iodierten Produkts (Tracer) erfolgte über eine Anionenaustauschersäule (QAE-A-25 Sepharose, 0,9x10cm), die mit 50 mM Ammoniumformiat (pH 6,0) äquilibriert wurde. Vor dem Auftragen auf die äquilibrierte Säule wurde dem Reaktionsgemisch 100 µl Wasser zugegeben, um die Ionenstärke zu verringern. Die Elution erfolgte mit 250 mM Ammoniumformiat (pH 6) bei einer Durchflussrate von ca. 2 ml/min. Es wurden 30 Fraktionen zu je 5 ml gesammelt, von denen je 5 µl abgenommen und im β -Zählgerät gemessen wurden. Die Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von mehr als 100 cpm aufwiesen, wurden vereinigt, im Verhältnis von 1:1 mit n-Propanol verschnitten, um die Autoradiolyse zu verlangsamen, und bei -20°C gelagert.

3.7.5.2. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)

Diese Methode dient der Bestimmung geringer cAMP- und cGMP-Mengen durch die immunologische Präzipitation des radioaktiv-markierten Tracers mittels eines spezifischen Antiserums. Durch Inkubation des Tracers mit dem Antiserum stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des Tracers ein. Dieses Gleichgewicht kann durch nicht-markiertes cAMP/cGMP in Richtung des freien Tracers verschoben werden, wodurch der präzipitierbare, gebundene Anteil sinkt. Nach einer Proteinfällung und Dekantieren des Überstands kann nun die im Präzipitat befindliche, gebundene Tracermenge durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden. Die Verteilung des Tracers auf die freie und die gebundene Fraktion wird bei verschiedenen Konzentrationen von nicht markiertem cAMP/cGMP ermittelt. Bei steigenden Konzentrationen von nicht markiertem cAMP/cGMP wird die gebundene Fraktion des Tracers kleiner werden und so die im Präzipitat gemessene Radioaktivität abnehmen. Über eine Standardkurve, die mit bekannten Mengen von nicht markiertem cAMP/cGMP und den gemessenen Zerfällen erstellt wird, kann der cAMP-, bzw. cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt werden. Bei der Bestimmung des cAMP-/cGMP-Gehalts einer gegebenen Probe war der ermittelte Wert in unterschiedlichen Verdünnungen konsistent. Die gewählten Bedingungen zur Durchführung des RIAs, die Behandlung der Proben und die Antikörperinkubation erfolgten wie beschrieben (Steiner et al., 1972). Die getrockneten Überstände aus den Thrombozyteninkubationen wurden in 100 µl Reaktionspuffer (100 mM Natriumacetat, pH 6,0) aufgenommen und mit 3 µl eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) acetyliert. Durch die Acetylierung des in den Proben enthaltenen cGMP an der 2'-OH-Position wird die Sensitivität des RIA um den Faktor 40 vergrößert (Harper und Brooker, 1975). 10 µl einer acetylierten Probe wurde in Polypropylenröhrchen mit 100 µl des in Schweine- γ -Globulin (0,5 mg/ml) verdünnten Antiserums (final 1:200.000) versetzt und 50 µl Reaktionspuffer zugegeben. Anschließend wurden 40 µl des verdünnten Tracers (in Reaktionspuffer) hinzugefügt und der Ansatz gemischt. Das γ -Globulin soll die Adsorption des Antikörpers an die Wände der Polypropylenröhrchen verhindern. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 16-20 Stunden. Zur Trennung von freiem und gebundenem cGMP wurde das im Reaktionsansatz befindliche Protein durch Zugabe von 3 ml Polyethylenglycol-Puffer (16% PEG 6000 in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) gefällt. Hierzu wurden zunächst 50 µl einer 0,8%-igen Schweine- γ -Globulin-Lösung (in Reaktionspuffer) zugesetzt, um eine ausreichende Proteinmenge für die möglichst quantitative Fällung des Antikörpers zu gewährleisten. Es wurde für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 6000 x g, 4°C). Nach Absaugen der Überstände wurde die in den Sedimenten gebundene Radioaktivität im β -

Zähler gemessen. Das Verhältnis von Tracermenge (7.000-10.000 cpm) und Antikörperverdünnung (1:200.000) wurde so gewählt, dass maximal 30-40% der eingesetzten Aktivität präzipitiert wurden. Dieses Verhältnis wurde durch den Zusatz verschiedener Antikörperverdünnungen zu einer gegebenen Tracermenge bestimmt. Die Nachweisgrenze für cAMP/cGMP lag bei 2 fmol; zur Erstellung der Standardreihe wurden insgesamt neun cGMP-Mengen von 2-512 fmol und zehn cAMP-Mengen von 2-1024 fmol verwendet. Für den Standard wurden Lösungen verwendet, deren Konzentration photometrisch bei 252 nm bestimmt wurde. Wenn nicht anders angegeben, repräsentieren die in den Ergebnissen angegebenen Werte Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

3.8. Isolierung von Organen sowie Thrombozyten aus der Maus

3.8.1. Präparation von Mäusen zur Gewinnung von Gewebe-spezifischen Protein-Proben

Zur Organentnahme wurden Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Aufgrund der hohen Sterberate der GC-KO-Mäuse (Mauslinie β_1 -KO) wurden ca. 3 Wochen alte Tiere bzw. Wildtyp-Tiere verwendet. Die Tiere wurden durch CO₂-Inhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Die Organe wurden entnommen, gewogen und stets auf Eis gehalten. Zu den jeweiligen Geweben wurde das 4-fache Volumen des Gewichtes an Homogenisationspuffer (50 mM TEA, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM Benzamidin; in absolutem Ethanol, 1 μ M Pepstatin A; in DMSO, 0,5 mM PMSF; in absolutem Ethanol, 2 mM DTT) zugegeben und in einem Plotter (B. Braun, Melsungen) verarbeitet (20-Hübe Glas/Glas, 600 U/min, RT). Anschließend wurde das entstandene Homogenat kurz zentrifugiert (5 min, 800 x g, 4°C), um nicht homogenisierte Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Homogenat verwendet. Zur Gewinnung von cytosolischen Fraktionen wurde das Homogenat nochmals zentrifugiert (30 min, 20.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als cytosolische Fraktion verwendet. Von den Homogenat- und cytosolischen Fraktionsproben wurde jeweils ein Aliquot zur Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 3.7.1.) abgenommen.

3.8.2. Isolierung von Thrombozyten-reichem Plasma (PRP)

WT, α -KO und β_1 -KO Mäuse wurden mit Diethylether narkotisiert. Das Blut (ungefähr 800 μ l) wurde aus dem Orbitalsinus mit einer Glaskapillare entnommen und in einem mit 200 μ l Heparin (50 U/ml) gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Versetzen des Blutes mit 1 ml PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) und Zentrifugation (10 min, 90 x g, 20°C) wurde die obere

Phase (Thrombozyten-reiches Plasma; PRP) abgenommen. Die untere Phase wurde mit PBS versetzt (entsprechend dem zuvor abgenommenem Volumen), erneut zentrifugiert und die obere Phase schließlich mit dem PRP gemischt. Die untere Phase wurde zentrifugiert (10 min, 700 x g, 20°C) und der erhaltene Überstand als Thrombozyten-freies Plasma (PPP) verwendet.

3.8.3. Isolierung und Reinigung von Thrombozyten ('washed platelets'; WP)

WT, α -KO und β_1 -KO Mäuse wurden mit Diethylether narkotisiert. Das Blut (ungefähr 800 μ l) wurde aus dem Orbitalsinus mit einer Glaskapillare entnommen und in einem mit 200 μ l Heparin (50 U/ml) gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Versetzen des Blutes mit 1 ml PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) und Zentrifugation (10 min, 90 x g, 20°C) wurde die obere Phase (PRP) abgenommen. Die untere Phase wurde mit PBS versetzt (entsprechend dem zuvor abgenommenem Volumen), erneut zentrifugiert und die obere Phase schließlich mit dem PRP gemischt. Das gesammelte PRP wurde erneut zentrifugiert (10 min, 700 x g, 20°C) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Thrombozyten wurden schließlich in Wasch-Puffer (15 mM NaCl, 0,055 mM NaH_2PO_4 , 0,7 mM NaHCO_3 , 0,27 mM KCl, 0,05 mM MgCl_2 , 0,5 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 g Glukose) resuspendiert. Für die Adhäsionsexperimente wurde die Thrombozytenkonzentration auf 5×10^9 Thrombozyten/ml und für die Fluoreszenz-Untersuchungen auf $0,2 \times 10^9$ Thrombozyten/ml eingestellt.

3.9. *In vitro*-Untersuchungen muriner Thrombozyten

3.9.1. Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten

Die Untersuchungen der Thrombozytenaggregation wurden mit PRP (siehe Kapitel 3.8.2.) ($2-3 \times 10^7$ Thrombozyten/200 μ l) in einem vier Kanal Aggregometer (Chronolog, Havertown, USA) durchgeführt. PRP ist eine trübe Lösung. Daher wird die Lichttransmission von PRP als 0% angesehen. Als Kontrolle (100% Aggregation) wurde die Lichttransmission von Thrombozyten-armem Plasma (PPP) gewählt. Behandelt man PRP mit einem proaggregatorischen Agens, dann aggregieren die Thrombozyten und die Lösung wird klarer. Diesen Wechsel kann man im Aggregometer überwachen, indem man die Lichtdurchlässigkeit misst. Als proaggregatorische Agens wurden Collagen, (4 μ g/ml), U46619 (0,3 μ M) und Thrombin (0,05 U/ml) eingesetzt. Für die Untersuchungen wurde Proli-NO (4 mM) direkt mit der Agonistengabe zugegeben, NOC7 (0,4 mM), DEA-NO (4 mM), NOC 9 (0,4 mM), GSNO (4 mM), Angeli's Salz (0,1 mM), 8-pCPT-cGMP (40 μ M) und PGE1 (10 μ M) wurden 3-20 min vor der Zugabe des Agonisten zugegeben. Die Messung der Aggregation erstreckte sich über einen Zeitraum von ungefähr 15 min.

3.9.2. Untersuchung der Adhäsion von murinen Thrombozyten

Der Adhäsionsassay wurde anlehnd an Bellavite et al. (1994) mit gewaschenen Thrombozyten (siehe Kapitel 3.8.3.) durchgeführt. 96-Well Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit Fibrinogen (50 mg/ml pro Well) inkubiert. Anschliessend wurden die Wells mit PBS (200 µl) gewaschen. Um eine nicht-spezifische Adhäsion der Thrombozyten zu minimieren, wurden die Wells mit 3% BSA (1 h, 37 °C) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (200 µl) wurden 50 µl der gewaschenen Thrombozyten-Suspension (5×10^6 Thrombozyten/ml), versetzt mit CaCl_2 und MgCl_2 (jeweils 1 mM), in jedes Well zugegeben. Die Thrombozytenadhäsion wurde durch die Zugabe von ADP (10 µM) in An- und Abwesenheit von DEA-NO (100 µM) stimuliert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Platte vorsichtig zweimal mit 0,9% NaCl (300 µl) gewaschen, um alle nicht gebundenen Thrombozyten abzuspülen. Die Quantifizierung der adhärenen Thrombozyten erfolgte nach Zugabe von 150 µl Phosphatase-Substrat-Lösung (0,1 M Citrat-Puffer, pH 5,4, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,1% Triton X-100) pro Well. Hierbei wird die Anzahl der Thrombozyten indirekt über die Aktivität der Sauren Phosphatase-Aktivität bestimmt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl 2 M NaOH gestoppt. Durch die pH-Wertänderung erfolgt eine Farbentwicklung durch die Bildung von p-Nitrophenol. Die Entstehung von p-Nitrophenol wurde mit Hilfe eines Mikroplattenlesegerätes bei 405 nm bestimmt. Die genaue Anzahl der adhärenen Thrombozyten wurde mittels einer Standardkurve, welche mit bekannten Thrombozytenkonzentrationen aufgenommen wurde, bestimmt. Alle Experimente wurden in vierfacher Ausführung durchgeführt.

3.9.3. Bestimmung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung

Um Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration untersuchen zu können, wurde der Farbstoff Fura-2 verwendet. Fura-2 ist ein Fluoreszenzindikator, mit dem die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden kann. Erstmals beschrieben wurde er 1985 von Tsien und Mitarbeitern. Die Struktur weist dem bekannten Calcium-selektiven Chelator EGTA ähnliche Bindungsstellen auf. Das Emissionsspektrum von Fura-2 wird bei 510 nm gemessen, wobei die Intensität der Fluoreszenz von der Calcium-Konzentration und von der Wellenlänge der UV-Anregung abhängig ist. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 340 nm nimmt die Intensität der Fluoreszenz mit steigender Calcium-Konzentration zu, bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 380 nm hingegen nimmt sie ab. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 360 nm ist die Intensität von der vorhandenen Calcium-Konzentration unabhängig. Um die Calcium-Konzentration zu bestimmen, wird das Verhältnis der Emissionsintensitäten bei 340nm/380nm oder bei

360nm/380nm gebildet (Gryniewicz et al., 1985; Poenie und Tsien, 1986). Durch die Berechnung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten werden Faktoren wie die Schichtdicke der Thrombozyten und die intrazelluläre Fura-2 Konzentration eliminiert. Fura-2 weist gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen bessere Absorptions- und Emissionseigenschaften auf, wodurch die Verwendung vergleichsweise niedriger Konzentrationen von Fura-2 ermöglicht wird. Außerdem weist Fura-2 eine bessere Photostabilität auf, hierdurch wird der experimentelle Zeitrahmen der Fluoreszenzanalysen verlängert. Zur Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde die veresterte Form des Fura-2, Fura-2/AM (1 μM) verwendet. Dieses Fura-2-Derivat weist fünf Acetomethylgruppen auf, die mit den Carboxygruppen des Fura-2 verbunden sind. Das Derivat ist membrangängig. In den Zellen wird die veresterte Form von intrazellulären Esterasen zu dem membranundurchlässigen Calcium-bindenden Fura-2 hydrolysiert. Eine vollständige Hydrolyse des Esters ist wichtig, da auch diese Form stark fluoreszent, aber Calcium-insensitiv ist. Um eine möglichst hohe Hydrolyserate zu erhalten, sollte sich zwischen der Fura-2/AM Zugabe und der experimentellen Analyse der Zellen eine Zeitspanne von 20 bis 30 Minuten befinden. Da das auf diese Weise in die Zellen gelangte Fura-2 nach einiger Zeit durch Exozytose wieder aus den Zellen hinaus transportiert wird, ist der Zeitraum der experimentellen Analyse auf etwa eine Stunde begrenzt. Die Fura-2/AM Konzentration für ein optimales Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde empirisch ermittelt. Für gewaschene Thrombozyten stellte sich eine Konzentration von 1 μM Fura-2/AM als optimal heraus. Zur Beladung mit Fura-2/AM wurden gewaschene Thrombozyten auf eine Konzentration von $0,2 \times 10^9$ Thrombozyten pro ml gebracht und mit Fura-2/AM (1 μM) für 1 h in der Dunkelheit bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten sedimentiert (15 min, 700 x g, RT) und mit 0,9% NaCl gewaschen und erneut sedimentiert (15 min, 700 x g, RT). Die sedimentierten Thrombozyten wurden schließlich in Wasch-Puffer (15 mM NaCl, 0,055 mM NaH_2PO_4 , 0,7 mM NaHCO_3 , 0,27 mM KCl, 0,05 mM MgCl_2 , 0,5 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 g Glukose) resuspendiert ($0,2 \times 10^9$ Thrombozyten/ml). Aliquots Fura-2/AM-beladener Thrombozyten wurden zur Calcium-Bestimmung in eine 10x10 mm Spezialquartzküvette überführt. Über die Excitation bei 340 nm und 380 nm wurde die Ratio bei einer Emission von 510 nm in einem Spektrofluorometer bestimmt (Cary Eclipse; Varian).

3.9.4. Bestimmung der NO-induzierten cGMP-Akkumulation in intakten Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten (siehe Kapitel 3.8.3.) (20×10^6 Thrombozyten in 100 μl) wurden bei 37°C für 10 min vorinkubiert. Die Bildung von cGMP wurde durch die Zugabe

von DEA-NO (100 μ M) in Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μ M) stimuliert. Zur Bestimmung des cGMP-Spiegels in Abwesenheit des NO-Donators wurden 10 μ l des Lösungsmittels (10 mM NaOH) in Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μ M) zugeführt. Die Reaktion wurde nach 2 min durch Zugabe von 200 μ l eiskaltem absolutem Ethanol gestoppt. Zur Bestimmung des basalen cGMP-Spiegels wurden die Thrombozyten direkt mit 200 μ l eiskaltem absolutem Ethanol versetzt. Die Proben wurden dann in einem Thermoheizblock bei 95°C eingedampft und anschließend mit 100 μ l RIA-Puffer (100 mM Na-Acetat, pH 6,0) versetzt. Anschließend wurde wie unter 3.7.5. beschrieben weiterverfahren.

3.9.5. Bestimmung der NO-induzierten cAMP-Akkumulation in intakten Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten (siehe Kapitel 3.8.3.) (20×10^6 Thrombozyten in 100 μ l) wurden bei 37°C für 10 min vorinkubiert. Die Bildung von cAMP wurde durch die Zugabe von PGE₁ (10 μ M) stimuliert. Zur Bestimmung des cAMP-Spiegels in Abwesenheit des PGE₁ wurden 10 μ l des Lösungsmittels (DMSO) zugeführt. Die Reaktion wurde nach 0-5 min durch Zugabe von 200 μ l eiskaltem absolutem Ethanol gestoppt. Zur Bestimmung des basalen cAMP-Spiegels wurden die Thrombozyten direkt mit 200 μ l eiskaltem absolutem Ethanol versetzt. Die Proben wurden dann in einem Thermoheizblock bei 95°C eingedampft und anschließend mit 100 μ l RIA-Puffer (100 mM Na-Acetat, pH 6,0) versetzt. Anschließend wurde wie unter 3.7.5. beschrieben weiterverfahren.

3.9.6. Phosphorylierung von VASP und PDE5

Gewaschene Thrombozyten (siehe Kapitel 3.8.3.) (20×10^6 Thrombozyten in 100 μ l) wurden bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten in Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μ M) mit GSNO (100 μ M, 3 min), 8-pCPT-cGMP (40 μ M, 20 min) oder Iloprost (10 μ M, 2 min) stimuliert. Die Reaktion wurde nach 2-20 min durch die Zugabe von 33 μ l 4-fach Laemmli-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 min gekocht. Zur Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die Proben zunächst wie unter 3.7.2. beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die PDE5- und VASP-Phosphorylierung durch Western-Blot-Analyse mit den phospho-spezifischen Antikörpern (VASP an Ser-239, PDE5 an Ser-102) bestimmt (siehe Kapitel 3.7.4.).

3.10. Bestimmung der Schwanzblutungszeit GC-defizienter Mäuse *in vivo*

Zur Untersuchung der Blutungszeit wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert. Mit einer scharfen Skalpellklinge wurden ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und mit einem Filterpapier wurde alle 10 s der entstandene Blutropfen abgetupft. Die Zeit bis zum Stoppen der Blutung wurde ermittelt.

3.11. Bestimmung der NO-GC-Aktivität in Hirn- und Lungen-Homogenaten

Hirn- und Lungen-Homogenate wurden aus murinem Gewebe wie unter 3.8.1. beschrieben gewonnen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde wie unter 3.7.1. beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC)-Aktivität wurden 10 µg Protein eingesetzt. Die Aktivität der NO-GC wurde nach der Methode von Schultz und Böhme (1984) bestimmt. Dabei wird $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ zu $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$ umgesetzt, welches - nach Abtrennung der nicht umgesetzten Nukleotide - durch Detektion der radioaktiven Zerfälle quantifiziert wird. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden 10 µg Protein aus Lungen- oder Hirn-Homogenaten im Reaktionspuffer (3 mM MgCl_2 , 3 mM DTT, 1 mM cGMP, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 8 U Creatinkinase, 5 mM Creatinphosphat, 300 µM GTP, ca. 5 kBq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ und 50 mM TEA/HCl, pH 7,4) mit GSNO (300 µM) versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Bei der Bestimmung der Enzymaktivität der NO-GC sind divalente Kationen wie Mg^{2+} einerseits als Kofaktoren des Enzyms essentiell, andererseits wird das als Substrat dienende GTP nur im Komplex mit divalenten Kationen umgesetzt. DTT soll die Inaktivierung des Enzyms durch Oxidation verhindern. Zugewetztes cGMP erhöht nicht nur die Wiederfindungsrate von $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$, sondern erniedrigt auch den Anteil des durch eventuell vorhandene Phosphodiesterasen abgebauten $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$. Rinderserumalbumin dient als Schutzprotein, Creatinkinase und Creatinphosphat bilden ein GTP-regenerierendes System.

GSNO wurde als NO-Donator zur Aktivierung der NO-GC eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 450 µl 120 mM Zn-Acetat-Lösung gestoppt. Durch Zugabe von 450 µl 120 mM Na_2CO_3 -Lösung wurden Phosphat und Pyrophosphat sowie die Nukleotide mit freien 5'-Phosphat-Gruppen, d.h. GTP, GDP und GMP, zusammen mit dem entstehenden ZnCO_3 präzipitiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, RT) wurde der Überstand über eine Säule mit Aluminiumoxid gegeben, das mit 0,1 M Perchlorsäure äquilibriert worden war. Dabei wandern Phosphate und nicht präzipitierte Nukleotide mit einer freien 5'-Phosphat-Gruppe in den Durchlauf, während $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$ an die Säule bindet. Nach Spülen mit demineralisiertem Wasser wurde das $^{32}\text{P}\text{-cGMP}$ mit 5 ml 250 mM Na-Acetat-Lösung von der Säule in Szintillationsgefäße eluiert und die gezählten Zerfälle/min (cpm) des ^{32}P

durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$v(\text{GC}) = \frac{C - C_0}{C_t} \times \frac{S}{V \times t}$$

v(GC)	spezifische Aktivität (pmol/min/ml)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C ₀	Zählrate des Leerwertes (cpm) (Ansatz ohne Probe)
t	Inkubationsdauer (min)
C _t	Zählrate des eingesetzten [³² P]cGMP (cpm)
S	eingesetzte Substratmenge (pmol cGMP)
V	Volumen Probe pro Reaktionsansatz (ml)

3.12. Auswertung und Statistik

Die in dieser Arbeit abgebildeten Western-Blot-Analysen zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen. Die abgebildeten Aggregationsexperimente von WT und GC-defizienten Thrombozyten zeigen repräsentative Experimente von mindestens vier unabhängigen Bestimmungen. Die Werte zur statistischen Auswertung dieser Aggregationsexperimente sind als % Aggregation angegeben und entsprechen Mittelwerten ± SEM von mindestens vier unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp.

4. Ergebnisse

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) vermittelt als NO-Rezeptor die Wirkung des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO). Dabei aktiviert die Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe die NO-GC und es kommt zur vermehrten Bildung des Signalmoleküls cGMP. Das Enzym ist ein Heterodimer und wird aus einer α - und einer β -Untereinheit gebildet. Derzeit sind zwei katalytisch aktive und durch NO-stimulierbare Isoformen der NO-GC bekannt, das $\alpha_1\beta_1$ - und das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer.

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden konditionale KO-Mäuse der NO-GC generiert, denen die α_1 - und α_2 -Untereinheit (Mergia et al., 2006) sowie die β_1 -Untereinheit (Friebe et al., 2007) fehlen.

4.1. Die Signaltransduktion in β_1 -defizienten Mäusen

Zunächst wurden die Mäuse mittels PCR-Analyse genotypisiert, um KO- von heterozygoten und WT-Mäusen unterscheiden zu können. Dazu wurde aus Schwanzbiopsien genomische DNS isoliert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion ergab ein Fragment von 680 bp für genomische WT-DNS (Abb. 6A). Mit DNS aus β_1 -defizienten Mäusen ergab sich ein PCR-Fragment von 830 bp. Im Fall von heterozygoten Mäusen, die nur ein intaktes Allel für die NO-GC tragen, erhielt man sowohl das WT- als auch das KO-Fragment.

Zusätzlich zur PCR wurden die Mäuse mittels Southern-Blot genotypisiert. Im Southern-Blot zeigte sich bei WT-Mäusen eine spezifische Bande bei 5.5 kb, bei KO-Mäusen hingegen ein Signal bei 10.2 kb (Abb. 6B). Für genomische DNS aus heterozygoten Tieren zeigte sich das Auftreten der WT- und KO-spezifischen Bande. Die β_1 -spezifische Bande ist größer als die WT-Bande, da durch die Inserierung eines Selektionsmarkers (TK/Neo-Kassette) eine Schnittstelle (Nhe I) in Intron 10 verloren geht. Somit konnte das erfolgreiche Ausschalten von Exon 10 in den KO-Mäusen auf DNS-Ebene gezeigt werden (Abb. 6A, B).

In weiteren Untersuchungen wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern die Expression der Untereinheiten der NO-GC im Western-Blot analysiert. Hierzu wurden Lungen-Homogenate aus WT- und KO-Mäusen gewonnen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 6C zeigt, dass sowohl die α_1 -, die α_2 - als auch die β_1 -Untereinheiten der NO-GC in Lunge aus WT-Mäusen exprimiert werden. Im Lungen-Homogenat aus β_1 -defizienten Mäusen konnte keine β -Untereinheit nachgewiesen werden, was den erfolgreichen KO bestätigte. Unerwarteterweise konnten weder die α_1 - noch die α_2 -Untereinheit auf Proteinebene detektiert werden.

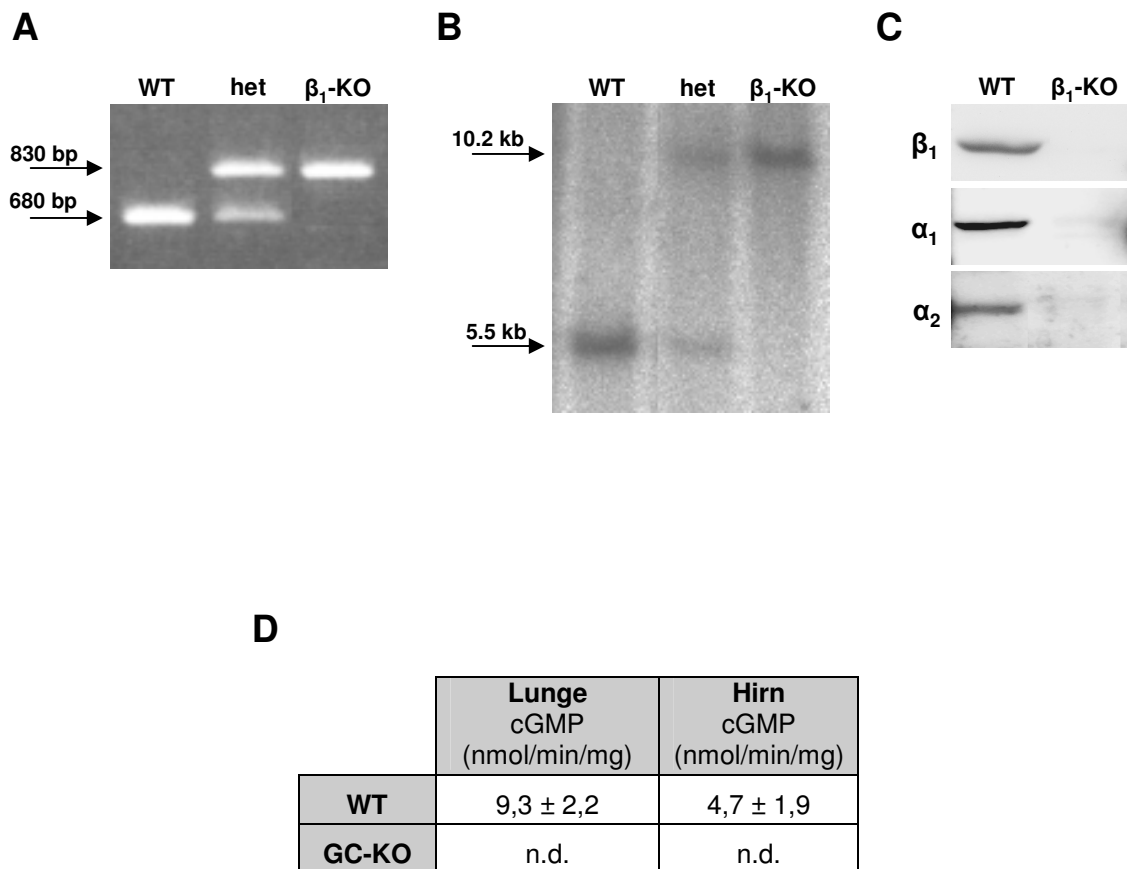


Abb. 6: Gen-Inaktivierung der β_1 -Untereinheit der NO-GC in Mäusen.

- (A) Genotypisierung der Wildtyp- (WT), Heterozygoten- (het) und Knock-out-(KO)-Mäuse mittels PCR. WT-DNS ergab ein PCR-Fragment von 680 bp. Für genomische KO-DNS erhält man ein 830 bp großes Fragment. Für genomische DNS aus heterozygoten Tieren erhält man die WT- und KO-spezifische Bande.
- (B) Southern-Blot-Analyse der genomischen DNS. Im Southern-Blot zeigt sich in β_1 -KO Mäusen eine größere Bande (10.2 kb) als im WT (5.5 kb), da die Nhe I-Schnittstelle in Intron 10 in KO-Mäusen durch die Inserierung der TK/Neo-Kassette verloren geht. Für genomische DNS aus heterozygoten Tieren erhält man die WT- und KO-spezifische Bande.
- (C) Western-Blot-Analyse der drei Untereinheiten der NO-GC in Lungen-Homogenaten. Auf ein 9%-iges Gel wurden 20 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper gegen die Untereinheiten der NO-GC eingesetzt. Dargestellt ist für jede Untereinheit ein repräsentativer Blot.
- (D) NO-induzierte cGMP-Bildung in Homogenaten aus Hirn und Lunge von WT- und β_1 -KO Mäusen. Zur Bestimmung der NO-induzierten NO-GC-Aktivität wurden 10 μ g Homogenat mit NO (100 μ M DEA-NO) für 3 min bei 37°C inkubiert und die NO-GC-Aktivität mittels GC-Assay bestimmt. Die Werte für WT-Tiere repräsentieren ein Experiment in Duplikaten. In den Homogenaten aus Hirn und Lunge von drei verschiedenen GC-KO-Mäusen konnte keinerlei NO-stimulierte NO-GC-Aktivität nachgewiesen werden (n.d.; Detektionslimit des GC-Assays: 70 pmol).

Offensichtlich führt das Fehlen der β_1 -Untereinheit über einen noch unbekanntem Regulationsmechanismus dazu, dass die α -Untereinheiten nicht als Protein hergestellt werden. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass in β_1 -defizienten Mäusen keine der bekannten Isoformen der NO-GC ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) exprimiert werden (Abb. 6C).

Aufgrund des Fehlens der NO-GC sollte im Gewebe von β_1 -defizienten Mäusen keine NO-induzierte cGMP-Bildung beobachtet werden. Um die NO-GC-Aktivität zu messen, wurden Lungen- und Hirn-Homogenate aus WT- und KO-Mäusen gewonnen. In Lungen- und Hirn-Homogenaten aus KO-Mäusen zeigte sich keine NO-induzierte cGMP-Bildung (100 μ M DEA-NO; Abb. 6D). Im Gegensatz dazu zeigt sich sowohl in Lungen- als auch in Hirn-Homogenaten aus WT-Mäusen, dass es NO-induziert zu einer cGMP-Bildung kommt (Abb. 6D). Somit konnte das Fehlen der β_1 -Untereinheit sowohl auf DNS- wie auch auf Proteinebene gezeigt werden. Da das Ausschalten der β_1 -Untereinheit zum Fehlen beider NO-GC-Isoformen und daher zu einem Total-Verlust der NO-GC führt, wird im Folgenden der Begriff GC-KO-Mäuse für die β_1 -defizienten Mäusen verwendet.

4.2. *In vitro*-Untersuchung NO-GC-defizienter Thrombozyten

4.2.1. Fehlen der NO-GC in β_1 -defizienten Thrombozyten

Wie in Kapitel 1.7. beschrieben, spielt die NO/cGMP-Signalkaskade in Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Regulation der primären Hämostase. Thrombozyten enthalten keinen Zellkern, der Nachweis des KOs mittels PCR und Southern-Blot ist nicht möglich. Somit ist die Expression der NO-GC in Thrombozyten nur auf Proteinebene nachweisbar. Dazu wurden aus WT- und GC-KO-Mäusen Thrombozyten isoliert und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 7A). Die Analyse mit spezifischen Antikörpern zeigte in den WT-Thrombozyten die Expression von α_1 - und β_1 -Untereinheiten der NO-GC. In Thrombozyten aus GC-KO Mäusen waren weder die β_1 - noch die α_1 -Untereinheit detektierbar. Zudem zeigte sich, dass sowohl in WT- als auch in KO-Thrombozyten die α_2 -Untereinheit nicht exprimiert wird. Als Positivkontrolle wurde WT-Hirn-Homogenat mitgeführt (Abb. 7A). Somit wird in Thrombozyten nur die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform exprimiert, und diese ist in GC-KO-Thrombozyten nicht mehr vorhanden.

Um die NO-GC-Aktivität zu untersuchen, wurden gewaschene Thrombozyten mit DEA-NO (100 μ M) in der Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μ M) inkubiert. Mittels RIA wurde die synthetisierte cGMP-Menge bestimmt. In WT-Thrombozyten führt NO zu einer 150-fachen Steigerung der cGMP-Akkumulation (Abb. 7B). Im Gegensatz dazu kam es in KO-Thrombozyten nicht zu einer NO-induzierten cGMP-Bildung.

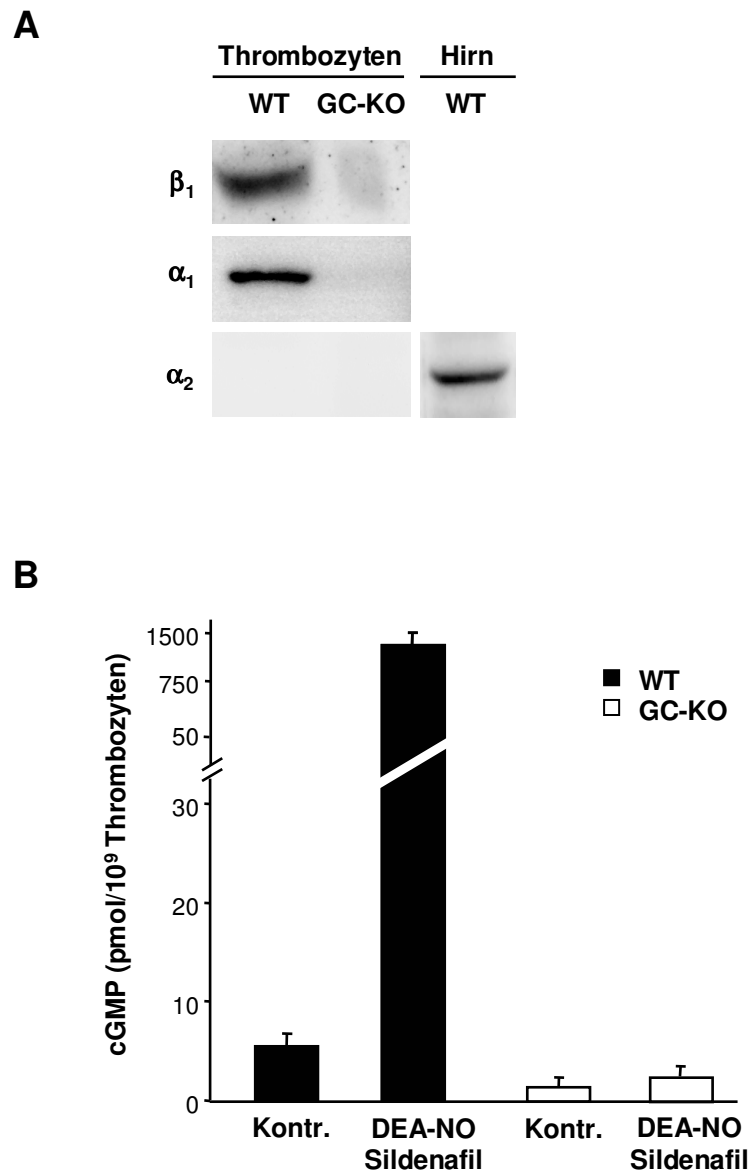


Abb. 7: Expression und Aktivität der NO-GC in Thrombozyten aus WT und GC-KO Mäusen.

- (A)** Western-Blot-Analyse der Expression der β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheiten der NO-GC in WT und NO-GC-defizienten Thrombozyten. Auf ein 9%-iges Gel wurde Thrombozyten-Lysat (5×10^7 Thrombozyten pro Spur) aufgetragen. Zur Positivkontrolle wurden 10 μg Hirn-Homogenat mit aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper gegen die Untereinheiten der NO-GC eingesetzt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot.
- (B)** Gewaschene Thrombozyten wurden mit DEA-NO (100 μM) in der Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μM) inkubiert. Mittels RIA wurde die cGMP-Akkumulation bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten für jeden Genotyp.

Die Stimulation von Thrombozyten mit NO führt über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine. Zwei dieser Proteine sind das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) und die Phosphodiesterase Typ 5 (PDE5). Deren Phosphorylierung kann als Indikator der PKG-Aktivierung herangezogen werden. Unter unstimulierten Bedingungen erkennt man keine Phosphorylierung von VASP in WT-Thrombozyten (Abb. 8A). Die Inkubation mit NO (100 μ M GSNO) führt in WT-Thrombozyten zur Phosphorylierung von VASP. Die Phosphorylierung von VASP wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen, der nur die an Ser-239 phosphorylierte Form detektiert. Dieser Antikörper erkennt zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 46 kDa und 50 kDa. Die 46 kDa schwere Bande entspricht dem nur an Ser-239 phosphorylierten VASP, während die Detektion des 50 kDa Proteins durch eine Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit aufgrund der zusätzlichen Phosphorylierung von VASP an Position Ser-157 resultiert (Halbrügge und Walter, 1989; Halbrügge et al., 1990). Auch durch die direkte Stimulation der PKG mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP kommt es in WT-Thrombozyten zur Phosphorylierung von VASP (Abb. 8A) (Geiger et al., 1992). In Thrombozyten aus GC-KO Mäusen führt die Stimulation mit NO im Gegensatz zu WT-Thrombozyten nicht zu einer Phosphorylierung von VASP (Abb. 8A). Dies zeigt eine vollständige Unterbrechung der NO/cGMP-induzierten Signaltransduktion. Die Signalkaskade unterhalb der NO-GC ist in KO-Thrombozyten hingegen noch intakt, da 8-pCPT-cGMP zu einer Phosphorylierung von VASP führt (Abb. 8A).

Die PDE5 ist neben VASP ein weiteres Substrat der PKG. Die PDE5 liegt unter unstimulierten Bedingungen in WT- und KO-Mäusen nicht-phosphoryliert vor (Abb. 8B). In WT-Thrombozyten führt NO (100 μ M GSNO) zur Phosphorylierung der PDE5. In KO-Thrombozyten zeigte sich im Gegensatz dazu keine NO/cGMP-vermittelte Phosphorylierung der PDE5. Die Phosphorylierung der PDE5 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen, der nur die phosphorylierte Form detektiert.

Somit führt das Ausschalten der NO-GC in Thrombozyten von Mäusen zu einer vollständigen Unterbrechung der NO/cGMP-vermittelten Signalweiterleitung. Im Folgenden sollten die physiologischen Auswirkungen auf die Thrombozytenaggregation, welche sich aus dem Verlust der NO-GC ergeben, untersucht werden.

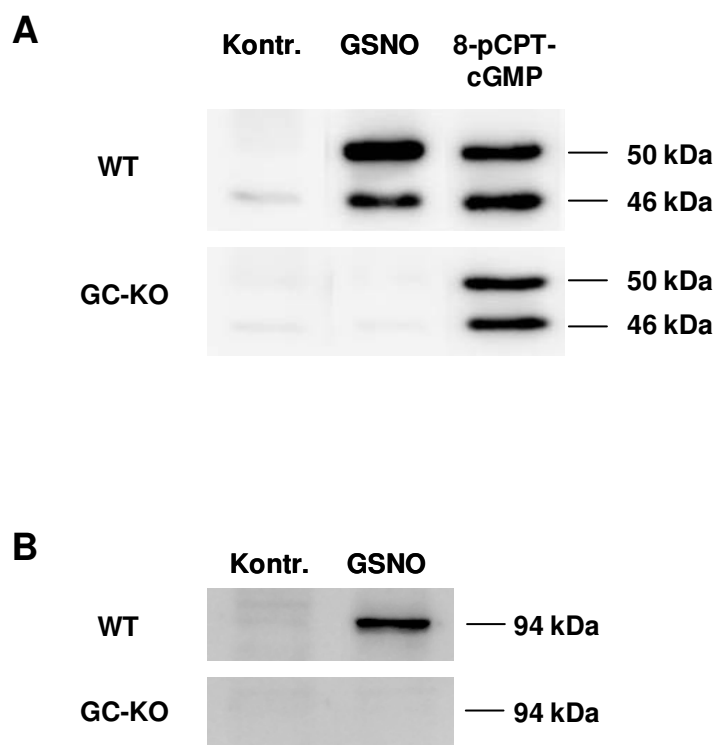


Abb. 8: VASP- und PDE5-Phosphorylierung in Thrombozyten aus WT und GC-KO Mäusen.

- (A)** Gewaschene Thrombozyten wurden in der Anwesenheit des PDE5-Inhibitors Sildenafil (200 μ M) mit GSNO (100 μ M) oder 8-pCPT-cGMP (40 μ M) für 3 min bzw. 20 min bei 37°C inkubiert. Für die Western-Blot-Analyse wurde jeweils Thrombozyten-Lysat (5×10^7 Thrombozyten pro Spur) auf ein 9%-iges Gel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion der Phosphorylierung von VASP wurde ein spezifischer Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot.
- (B)** Detektion der Phosphorylierung von PDE5 mittels spezifischer Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot.

4.2.2. Fehlen der NO-induzierten Hemmung der Aggregation von NO-GC-defizienten Thrombozyten

Das vom Endothel freigesetzte NO ist ein wichtiger Faktor, der zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwände und zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation führt. Obwohl die NO-GC als der wichtigste NO-Rezeptor angesehen wird, der diesen inhibitorischen Effekt vermittelt, sind cGMP-unabhängige NO-Effekte auf die Aggregation postuliert worden (Sogo et al., 2000; Crane et al., 2005; Wanstall et al., 2005). Das vorliegende Mausmodell bietet erstmals die Möglichkeit, cGMP-abhängige bzw. cGMP-unabhängige Wege von NO zu untersuchen.

Die *in vitro*-Untersuchungen der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation und ihre Hemmung durch NO wurde mit Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) im Aggregometer durchgeführt. Als proaggregatorischer Agonist wurde Collagen eingesetzt, als NO-Donator wurde zunächst die Substanz Proli-NO benutzt. Collagen (4 µg/ml) führte zur Aggregation sowohl von WT als auch von GC-defizienten Thrombozyten (Abb. 9A). Der NO-Donator Proli-NO (4 µM) inhibierte die Collagen-induzierte Aggregation von WT-Thrombozyten. In KO-Thrombozyten fehlte diese hemmende Wirkung von NO vollständig (Abb. 9A). Um auszuschließen, dass die eingesetzte NO-Konzentration zu niedrig war, wurde das Aggregationsexperiment mit höheren NO-Konzentrationen wiederholt. Auch extrem hohe Konzentrationen des NO-Donators Proli-NO (4 mM), die wahrscheinlich supraphysiologisch sind, führten nicht zu einer Hemmung der Collagen-induzierten Aggregation von KO-Thrombozyten. (Abb. 9B).

Wie bereits in der Einleitung (siehe Kapitel 1.4.1.) dargestellt, gibt es unterschiedliche NO-Donatoren. Diese unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit und in der Freisetzung der NO-Spezies. Das freigesetzte NO kann als Nitroxylanion (NO^+), als Nitroxylkation (NO^-), oder als NO-Radikal (NO^\bullet) vorliegen. Dies steht im engen Zusammenhang mit dem NO-Trägermolekül und dessen Grundstruktur, an welchem das freizusetzende NO-Molekül angelagert ist (Abb. 2). Um zu zeigen, dass das Ausbleiben des hemmenden NO-Effektes nicht auf die NO-Spezies oder der Kinetik der NO-Freisetzung begründet ist, wurde die Wirkung anderer NO-Donatoren getestet. Zur Untersuchung wurden die NO^+ -freisetzenden Donatoren Natriumnitroprussid (0,8 mM SNP), ein Nitrosyl-Eisen-Komplex, sowie S-Nitrosoglutathion (4 mM GSNO) eingesetzt. Zudem wurde der NO^- -freisetzende Donator Angeli's Salz (0,1 mM) verwendet. Als NO^\bullet -freisetzende Substanzen wurde Proli-NO (4 mM), DEA-NO (4 mM), NOC7 (0,4 mM) und NOC9 (0,4 mM) gewählt. Wie zuvor wurde zur Aggregation Collagen (4 µg/ml) eingesetzt, welches wie bereits gezeigt zur Aggregation sowohl von WT- als auch von GC-KO-Thrombozyten (Abb. 10A-C und 11) führt.

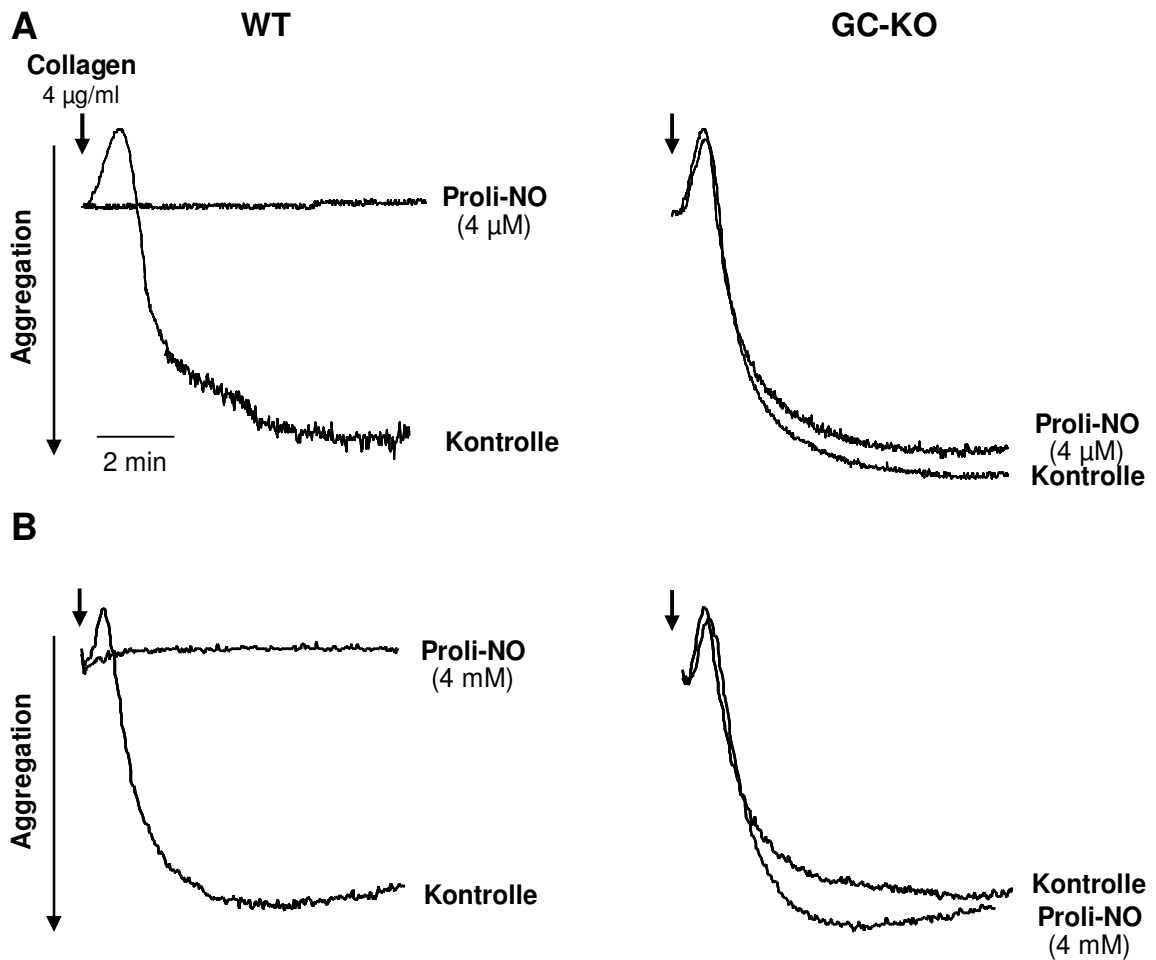


Abb. 9: Prol-NO hemmt nicht die Collagen-induzierte Thrombozytenaggregation in GC-KO-Thrombozyten.

- (A) PRP wurde in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des NO-Donators Prol-NO (4 µM) bei 37°C durch die Zugabe von Collagen (4 µg/ml; Pfeil) stimuliert.
- (B) Wiederholung des Experimentes mit einer höheren Konzentration des NO-Donators Prol-NO (4 mM). Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente von WT- und GC-defizienten Thrombozyten.

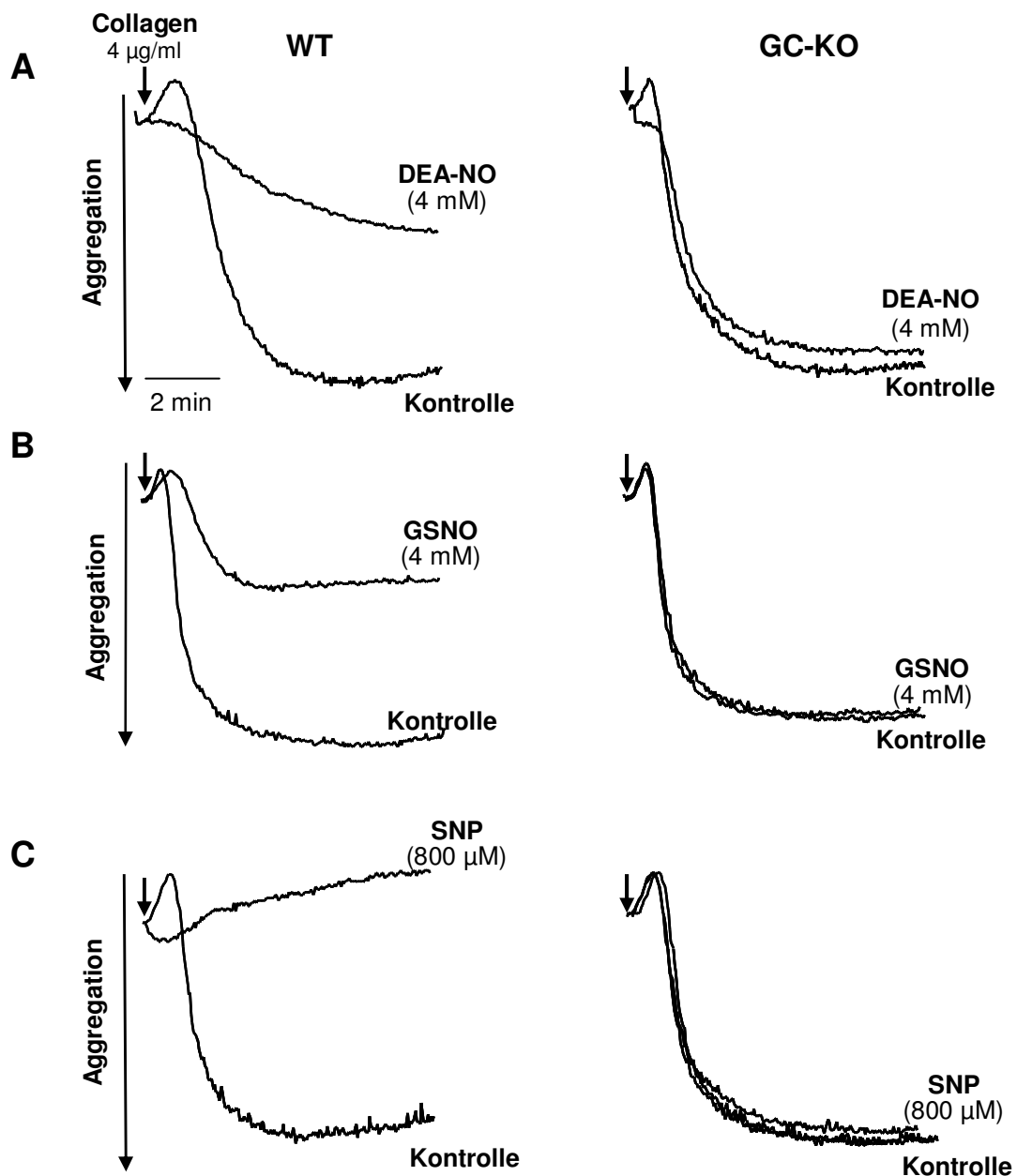


Abb. 10: NO führt nicht zur Hemmung der Collagen-induzierten Aggregation in Thrombozyten von GC-KO-Mäusen.

- (A) PRP aus WT- und GC-KO-Mäusen wurde in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des NO-Donators DEA-NO (4 mM) für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Durch die Zugabe von Collagen (4 µg/ml; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert.
- (B) PRP aus WT- und GC-KO-Mäusen wurde in Ab- bzw. Anwesenheit des NO-Donators GSNO (4 mM) für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Auch hier erfolgte nach der Zugabe von Collagen (4 µg/ml; Pfeil) die Stimulation der Thrombozytenaggregation.
- (C) PRP aus WT- und GC-KO-Mäusen wurde in Ab- bzw. Anwesenheit des NO-Donators SNP (800 µM) für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Durch die Zugabe von Collagen (4 µg/ml; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert. Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente von WT- und GC-defizienten Thrombozyten.

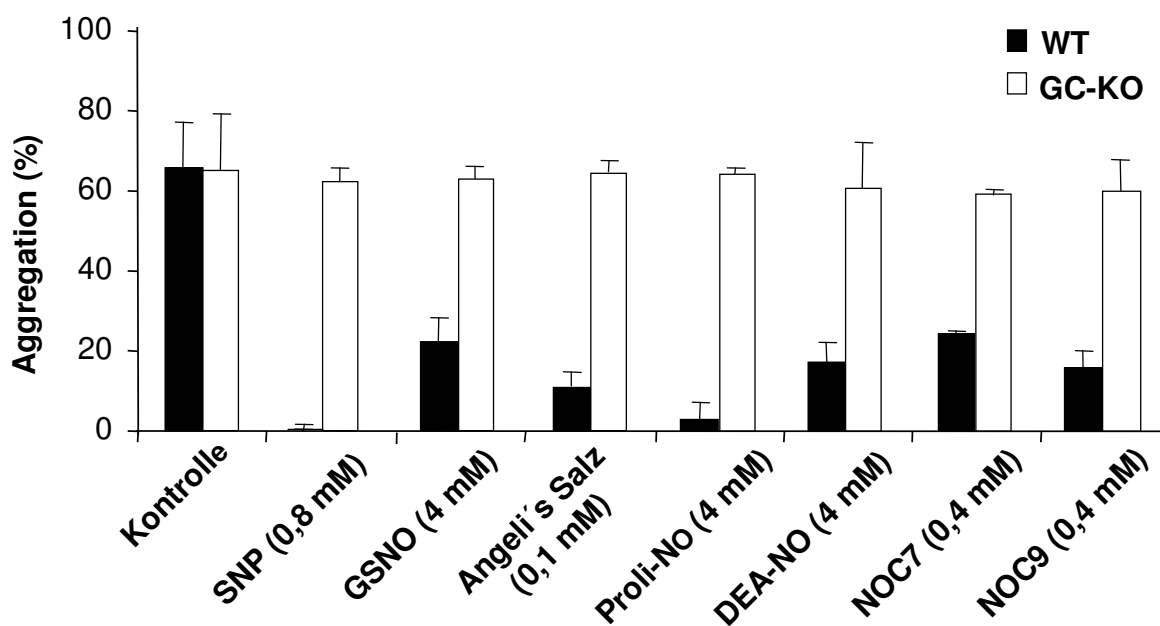


Abb. 11: Statistische Auswertung der NO-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaggregation.

PRP aus WT- und GC-KO-Mäusen wurde für 3 min in Abwesenheit bzw. Anwesenheit der NO-Donatoren (0,8 mM SNP, 4 mM GSNO, 0,1 mM Angeli's Salz, 4 mM Prolin-NO, 4 mM DEA-NO, 0,4 mM NOC7, 0,4 mM NOC9) bei 37°C vorinkubiert. Durch die Zugabe von Collagen (4 µg/ml) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert. Die Werte sind als % Aggregation angegeben und entsprechen Mittelwerten ± SEM (n = 4-8).

Wurden die WT-Thrombozyten mit einem NO-Donator vorinkubiert, so zeigte sich, dass die Collagen-induzierte Aggregation der WT-Thrombozyten in unterschiedlichem Maße durch das von den NO-Donatoren freigesetzte NO gehemmt wird (zwischen 70-90% Hemmung; Abb. 10 und 11). Diese hemmende Wirkung von NO fehlt in KO-Thrombozyten vollständig.

Obwohl die getesteten NO-Donatoren in unterschiedlichem Maße einen hemmenden Einfluss auf die Aggregation von WT-Thrombozyten aufweisen, sind diese selbst in unphysiologischen, hohen Konzentrationen (μM oder mM) nicht in der Lage, die Collagen-induzierte Aggregation von KO-Thrombozyten zu hemmen (Abb. 10 und 11).

Um auszuschließen, dass das Fehlen der Aggregationshemmung durch NO nicht an dem als Agonisten eingesetzten Collagen liegt, wurden auch andere proaggregatorische Agonisten verwendet. Thrombin und U46619 führten zur Aggregation von WT- und KO-Thrombozyten (Daten nicht gezeigt). Jedoch blieb der hemmende NO-Effekt im Gegensatz zu WT-Thrombozyten bei KO-Thrombozyten auch bei Verwendung dieser beiden Agonisten aus. Da keiner der verwendeten NO-Donatoren selbst in hohen Konzentrationen einen hemmenden Einfluss auf die Aggregation der NO-GC-defizienten Thrombozyten hatte, kann man schlussfolgern, dass NO den antiaggregatorischen Effekt in Mäusen ausschließlich über die NO-GC vermittelt.

Um zu überprüfen, ob die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade in Thrombozyten aus den KO-Mäusen intakt ist, wurde 8-pCPT-cGMP eingesetzt. 8-pCPT-cGMP ist ein stabiles, membrangängiges cGMP-Analogon, welches die PKG direkt aktiviert. Wie Abbildung 12 zeigt, führt 8-pCPT-cGMP ($40 \mu\text{M}$) zu einer Hemmung der durch Collagen ausgelösten Aggregation von WT- und GC-KO-Thrombozyten. Daher kann angenommen werden, dass die Signalkaskade unterhalb der NO-GC in GC-KO-Thrombozyten intakt ist.

4.2.3. Die Signaltransduktion in α_1 - und α_2 -defizienten Thrombozyten

Neben der bereits in Kapitel 4.1. beschriebenen Mauslinie (β_1 -KO) wurden zwei weitere Mauslinien generiert, in denen entweder die α_1 - oder die α_2 -Untereinheit der NO-GC deletiert wurde. Diese beiden Mauslinien (α_1 -/ α_2 -KO) sollten dabei helfen, die jeweilige Funktion der einzelnen Isoformen der NO-GC zu untersuchen (Megia et al., 2006) und die erhobenen Daten der β_1 -KO-Mäuse zu bestätigen.

Zunächst wurde, wie bereits bei den β_1 -defizienten Thrombozyten (siehe Kapitel 4.2.1.), die Expression der NO-GC auf Proteinebene untersucht. Der Western-Blot in Abbildung 13A zeigt, dass Thrombozyten aus α_1 -KO Mäusen keine der drei untersuchten Untereinheiten der GC (α_1 , α_2 , β_1) aufweisen. Dies deckt sich mit den Befunden aus den

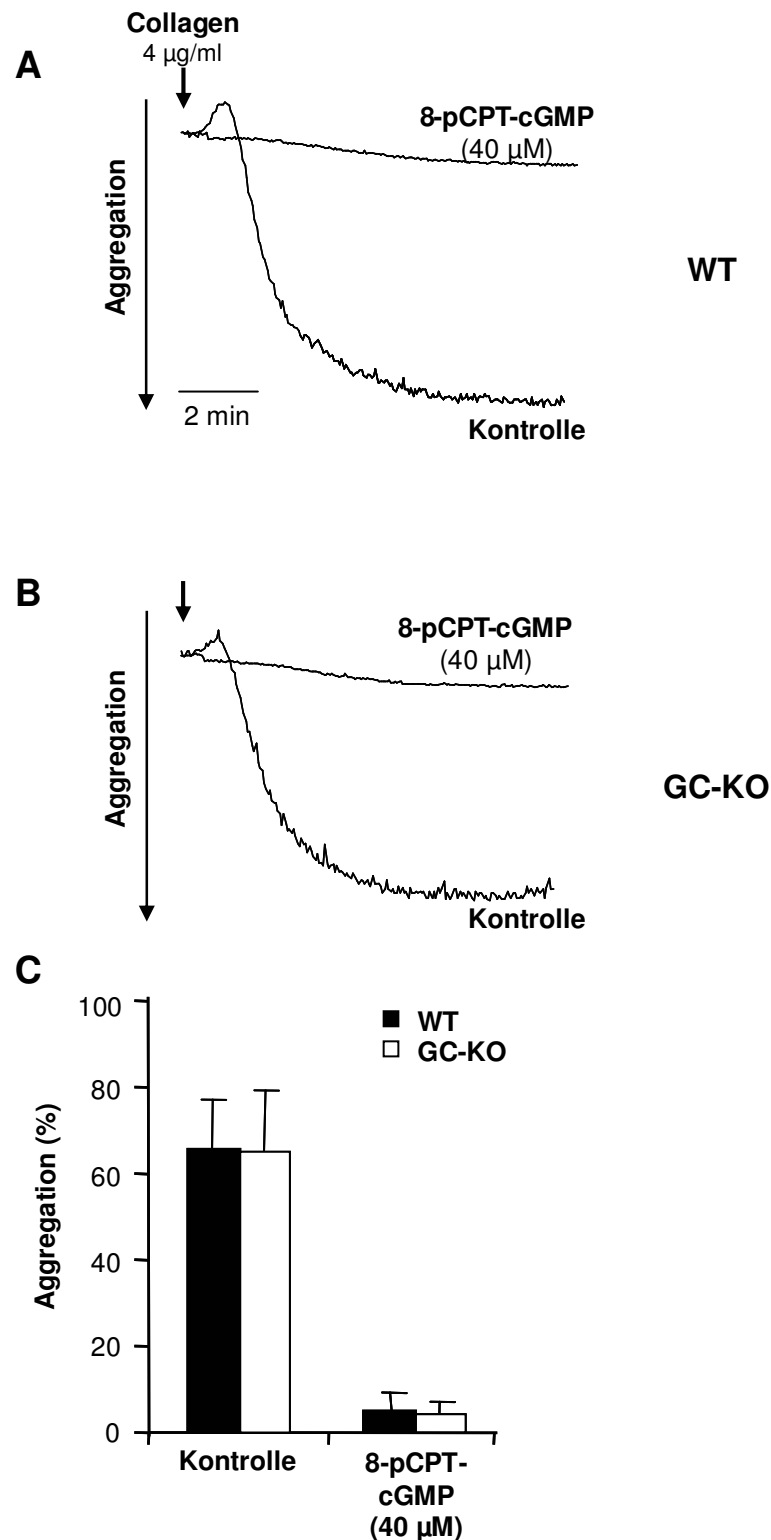


Abb. 12: Die NO/cGMP-Kaskade unterhalb der NO-GC ist in GC-KO-Thrombozyten intakt.

- (A) WT-PRP wurde in Ab- und Anwesenheit des membrangängigen cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP (40 µM) bei 37°C für 20 min vorinkubiert. Durch Collagen (4 µg/ml; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert.
- (B) Der Versuch wurde ebenfalls mit GC-defizientem PRP durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente.
- (C) Die Werte der statistischen Auswertung sind als % Aggregation angegeben und entsprechen den Mittelwerten ± SEM (n = 5).

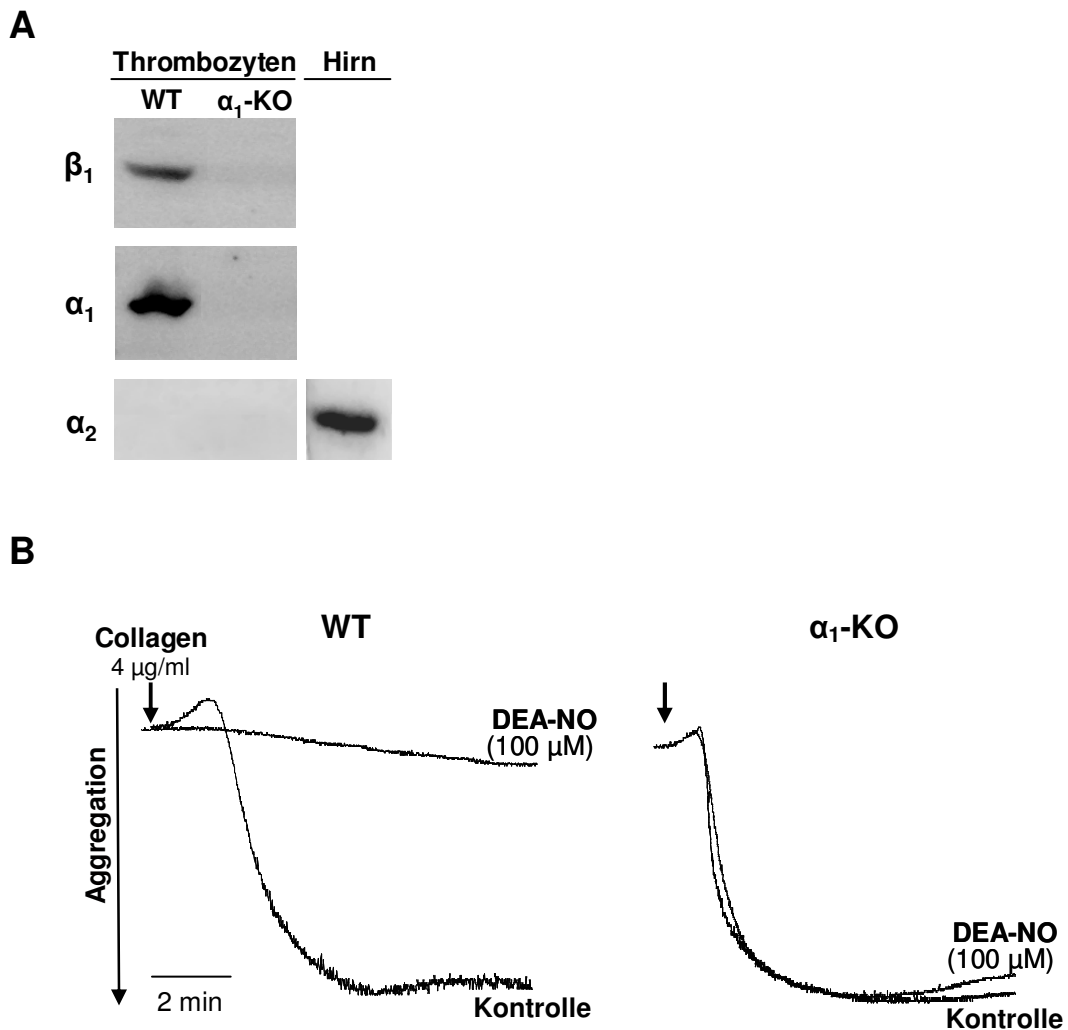


Abb. 13: Untersuchung α_1 -defizienter Thrombozyten.

- (A) Western-Blot-Analyse der Expression der β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheiten der NO-GC in WT und α_1 -defizienten Thrombozyten. Auf ein 9%-iges Gel wurde Thrombozyten-Lysat (5×10^7 Thrombozyten pro Spur) aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden 10 μg Hirn-Homogenat mit aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper gegen die Untereinheiten der NO-GC eingesetzt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot.
- (B) PRP aus WT- und α_1 -defizienten Mäusen wurde für 3 min in Ab- bzw. Anwesenheit des NO-Donators DEA-NO bei 37°C vorinkubiert. Durch die Zugabe von Collagen (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert. Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente von WT- und α_1 -defizienten Thrombozyten.

β_1 -KO Thrombozyten und bestätigte eine gegenseitige Expressionsregulierung zwischen der α_1 - und β_1 -Untereinheit. Thrombozyten aus α_2 -KO Mäusen weisen sowohl die α_1 - als auch die β_1 -Untereinheit der GC auf (Abb. 14A). Die α_2 -Untereinheit der NO-GC wurde nicht detektiert.

Die Konsequenzen, die sich durch das Ausschalten einer der beiden α -Untereinheiten auf die Aggregation bzw. Hemmung der Aggregation auf α_1 - und α_2 -defizienten Thrombozyten ergeben, wurde wieder in Aggregationsexperimenten untersucht. Sowohl α_1 - als auch α_2 -defiziente Thrombozyten lassen sich durch die Zugabe von Collagen (4 μ g/ml) aggregieren (Abb. 13B, 14B). Die Thrombozyten wurden mit dem NO-Donator DEA-NO (100 μ M) für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Es zeigte sich, dass die Collagen-induzierte Aggregation von WT- und α_2 -defizienten Thrombozyten durch NO gehemmt wurde (Abb. 13B, 14B). In α_1 -defizienten Thrombozyten blieb dieser hemmende NO-Effekt jedoch aus (Abb. 13B). Die Ergebnisse der α_1 -defizienten Thrombozyten stimmen also mit denen der β_1 -defizienten Thrombozyten überein. Thrombozyten exprimieren keine α_2 -Untereinheit der NO-GC. Zudem wirkt NO ähnlich antiaggregatorisch auf α_2 -defizienten Thrombozyten, wie auf WT-Thrombozyten. Somit wird die antiaggregatorische Wirkung von NO in Thrombozyten ausschließlich über das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer vermittelt und eine Rolle des $\alpha_2\beta_1$ -Dimers in Thrombozyten kann ausgeschlossen werden.

4.2.4. Die Adhäsion von NO-GC-defizienten Thrombozyten ist durch NO nicht hemmbar

Die Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an subendotheliale Strukturen ist ein wichtiges Ereignis, das der Aggregation der Thrombozyten vorausgeht. Daher stellte sich die Frage, inwieweit das Ausbleiben einer NO-induzierten Inhibierung der Aggregation von α_1 - und β_1 -defizienten Thrombozyten auf eine reduzierte Adhäsion zurückzuführen ist. Da sowohl α_1 - als auch β_1 -defiziente Thrombozyten keine funktionellen Unterschiede aufweisen, wurden die weiteren Experimente nur mit Thrombozyten aus β_1 -defizienten Mäusen durchgeführt.

Die Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten wurde *in vitro* mit Hilfe einer colorimetrischen Methode bestimmt, die auf einer Aktivitätsuntersuchung der in Thrombozyten vorkommenden Sauren Phosphatase basiert (Bellavite et al., 1994). Zunächst wurden Thrombozyten in Fibrinogen-gecoateten Mikrotiterplatten bei 37°C vorinkubiert. Zur Stimulation der Adhäsion wurde ADP eingesetzt, das durch die Bindung an heptahelikale Rezeptoren ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$) in der Thrombozytenmembran zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt.

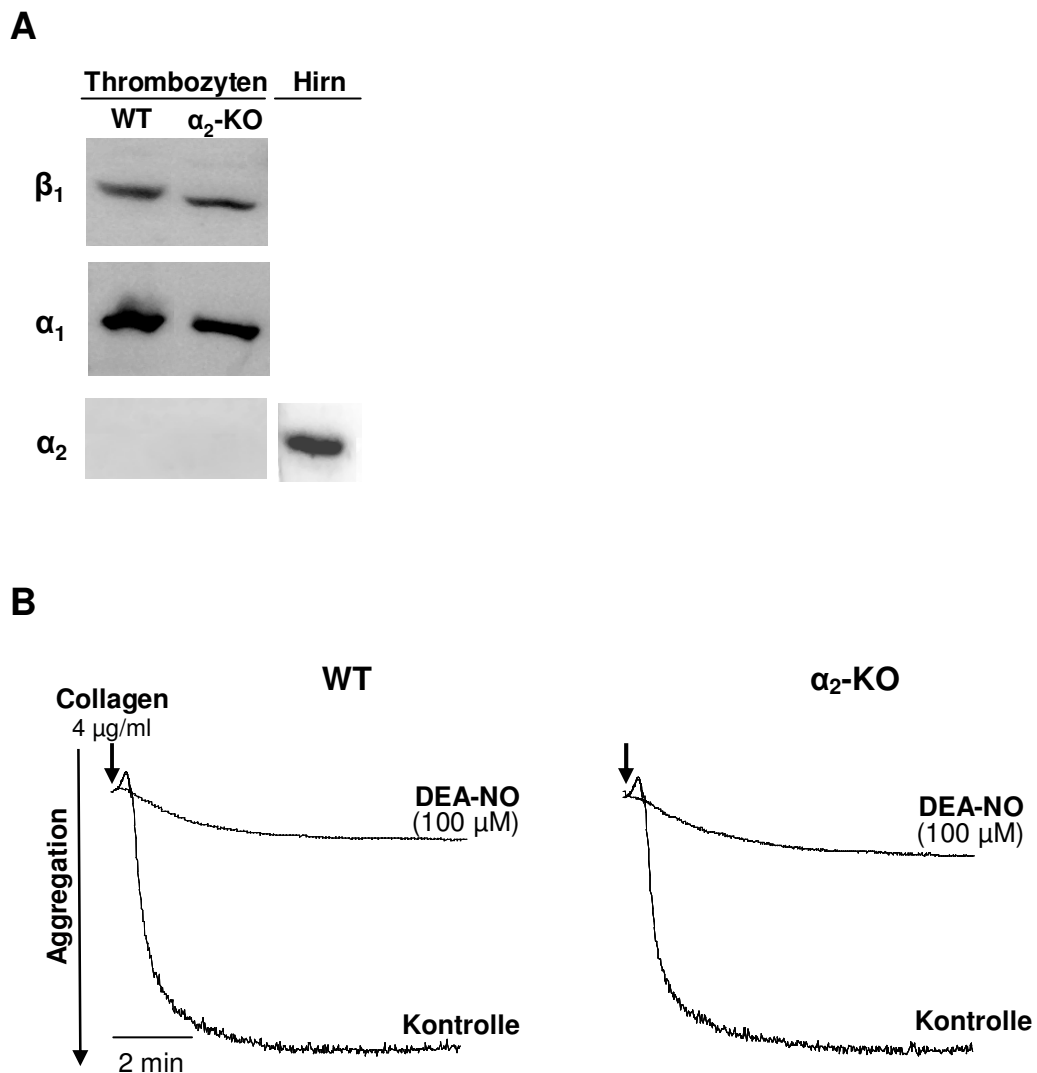


Abb. 14: Untersuchung α_2 -defizienter Thrombozyten.

- (A) Western-Blot-Analyse der Expression der β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheiten der NO-GC in WT und α_2 -defizienten Thrombozyten. Auf ein 9%-iges Gel wurde Thrombozyten-Lysat (5×10^7 Thrombozyten pro Spur) aufgetragen. Zur Positivkontrolle wurden $10 \mu\text{g}$ Hirn-Homogenat mit aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper gegen die Untereinheiten der NO-GC eingesetzt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot.
- (B) PRP aus WT- und α_2 -defizienten Mäusen wurde für 3 min in Ab- bzw. Anwesenheit des NO-Donators DEA-NO bei 37°C vorinkubiert. Durch die Zugabe von Collagen ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert. Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente von WT- und α_2 -defizienten Thrombozyten.

Die Quantifizierung der adhärenenten Thrombozyten erfolgte nach Lyse der Zellen; hierbei wird die enzymatische Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat zum gelben p-Nitrophenol durch die Saure Phosphatase gemessen.

Die unspezifische Adhäsion an die Wand der Mikrotiterplatte war bei WT- und KO-Thrombozyten identisch (14%; Abb. 15A). Die Inkubation mit NO (100 μ M DEA-NO) hatte keinen Einfluss auf die unspezifische Adhäsion.

Die Zugabe von ADP (1 μ M) führte zur Adhäsion von WT- und KO-Thrombozyten (30 %). Die Anwesenheit von DEA-NO (100 μ M) führte zu einer vollständigen Hemmung der ADP-induzierten Adhäsion von WT-Thrombozyten. NO hatte jedoch keinen hemmenden Einfluss auf die Adhäsion von KO-Thrombozyten (Abb. 15A).

Abbildung 15B zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der Adhäsion durch DEA-NO. Der IC_{50} -Wert der Aggregation von WT-Thrombozyten liegt bei ungefähr 3 μ M DEA-NO. In KO-Thrombozyten ist kein inhibitorischer Effekt zu beobachten. Es zeigt sich also insgesamt, dass das Ausbleiben einer NO-induzierten Hemmung der Aggregation von GC-defizienten Mäusen mit einem Ausbleiben der Hemmung der Adhäsion einhergeht.

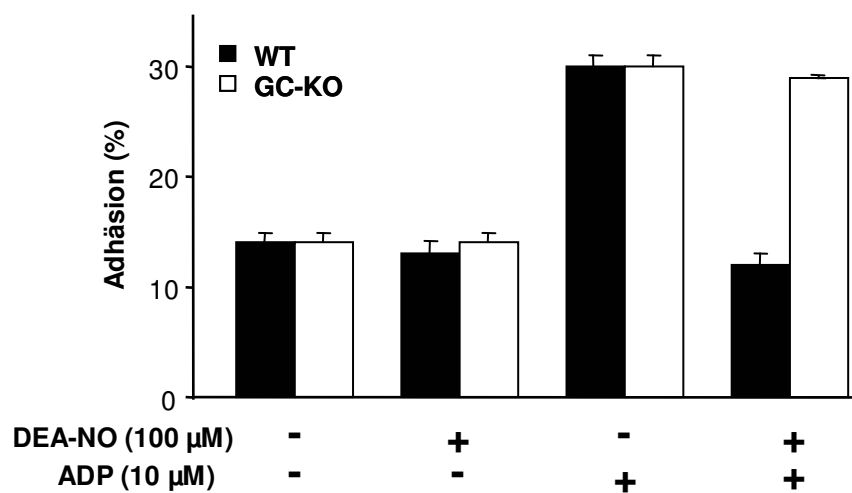
4.2.5. NO führt nicht zur Hemmung der Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung in β_1 -defizienten Thrombozyten

Verschiedene Rezeptor-Agonisten, wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Collagen, Thrombin, Serotonin, oder das Prostanoid Thromboxan A_2 (TXA₂), führen über die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren in der Thrombozytenmembran G-Proteingekoppelt zu einem Anstieg des cytosolischen Calcium-Spiegels. Calcium-abhängig kommt es schließlich zur Formveränderung, Adhäsion, Aggregation und Degranulation der Thrombozyten. NO/cGMP-induziert kommt es zur Hemmung der Calcium-Mobilisierung, wodurch die Thrombozytenfunktionen gehemmt werden (Antl et al., 2007).

Derzeit ist noch nicht geklärt, ob die Hemmung der Calcium-Freisetzung durch NO nur über cGMP und PKG erfolgt oder ob noch andere Effektormoleküle beteiligt sind. Um den Einfluss von NO auf den Calcium-Spiegel zu untersuchen, wurden Thrombozyten aus WT- und β_1 -defizienten Mäusen isoliert und diese mit dem Calcium-sensitiven Fluorochrom Fura-2 beladen. Agonisten-induziert kommt es zu einer Änderung der cytosolische Calcium-Konzentration, die mittels der Fura-2-Methode durch die Ermittlung der Verhältnisses der Emission bei 340 nm und 380 nm bestimmt werden konnten.

Um eine Calcium-Freisetzung hervorzurufen, wurden die Thrombozyten mit Thrombin (0,1 U/ml) in An- bzw. Abwesenheit von DEA-NO (100 μ M) stimuliert (Abb. 16). Sowohl WT- als auch KO-Thrombozyten zeigen eine ähnliche Erhöhung des cytosolischen Calcium-Spiegels nach der Stimulation mit Thrombin, welche durch eine Fluoreszenzzunahme

A



B

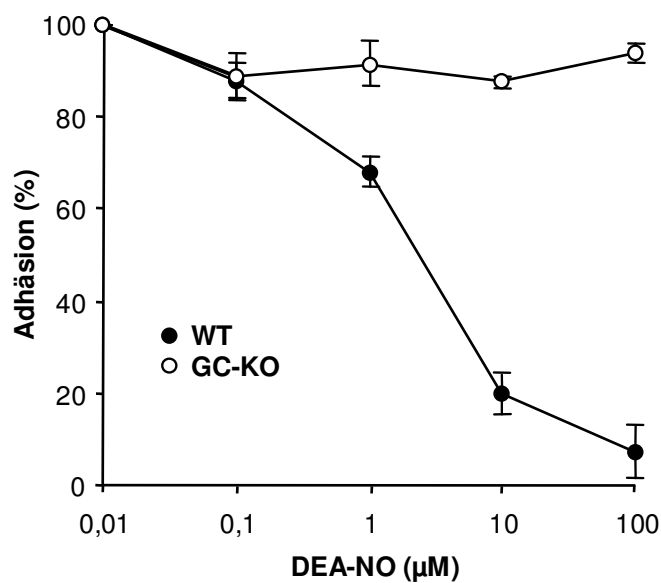


Abb. 15: NO führt nicht zur Hemmung der ADP-induzierten Adhäsion von GC-defizienten Thrombozyten.

- (A) Unspezifische und ADP-stimulierte (10 µM) Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten (5×10^6 Thrombozyten) an Fibrinogen in An- bzw. Abwesenheit von DEA-NO (100 µM).
- (B) Konzentrationsabhängige Hemmung der ADP-induzierten Adhäsion von WT- und GC-KO-Thrombozyten durch NO (0-100 µM DEA-NO). Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten für jeden Genotyp.

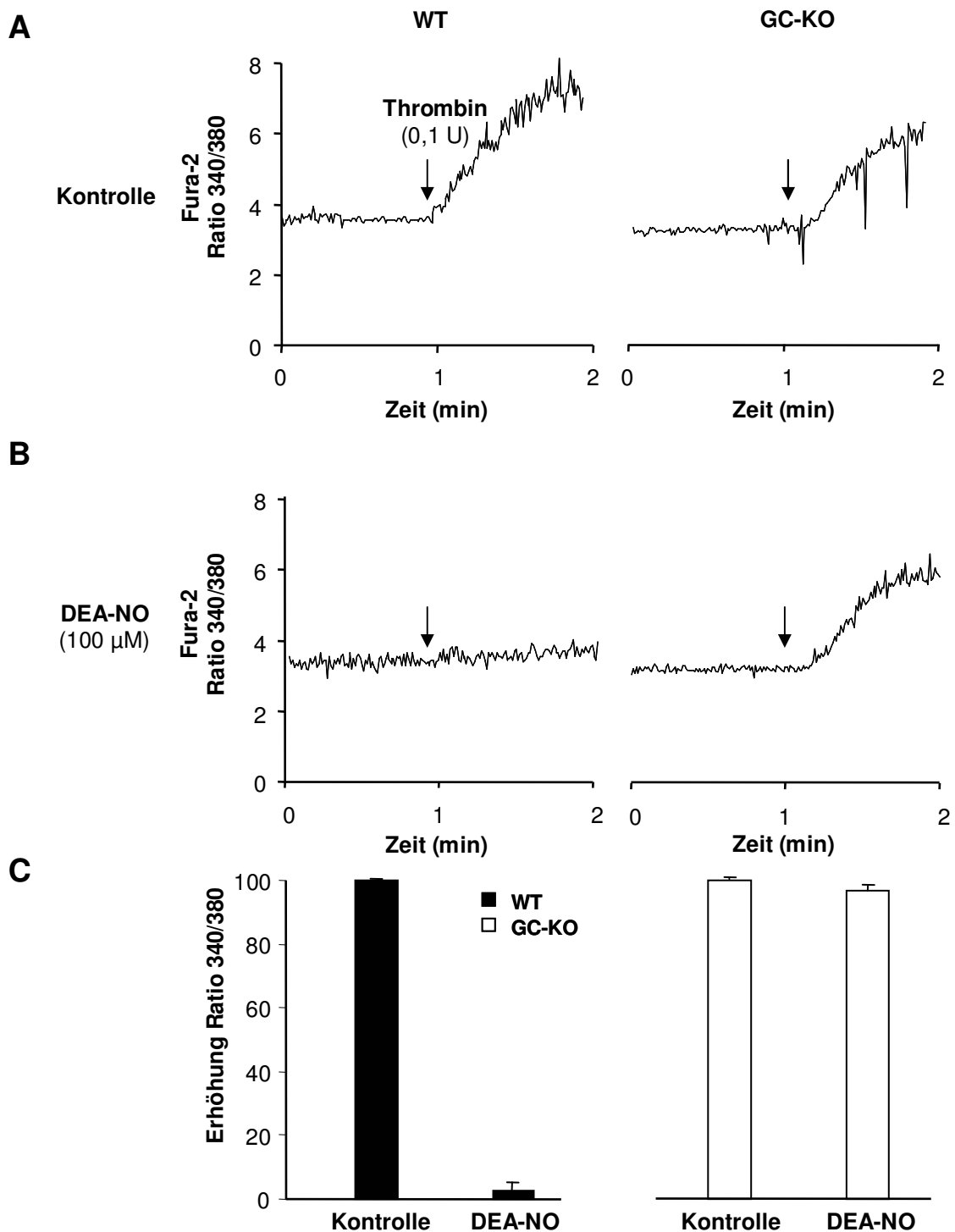


Abb. 16: NO führt nicht zur Hemmung der Thrombin-induzierten Calcium-Freisetzung in GC-KO-defizienten Thrombozyten.

Gewaschene Thrombozyten aus WT- und GC-KO-Mäusen wurden in Ab- und Anwesenheit des NO-Donators DEA-NO vorinkubiert. Durch die Zugabe von Thrombin (0,1 U; Pfeil) wurde die Calcium-Mobilisierung stimuliert.

- (A) Thrombin-induzierte Calcium-Mobilisierung unter Kontrollbedingungen.
 (B) Vorinkubation mit 100 μ M DEA-NO bei 37°C für 3 min und anschließende Stimulation mit Thrombin.
 (C) Statistische Auswertung der NO-vermittelten Hemmung der Thrombin-induzierten Calcium-Freisetzung. Die Werte sind als % der Erhöhung der Ratio 340/380 angegeben und repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n = 6).

angezeigt wird. In β_1 -defizienten Thrombozyten zeigt NO keinen hemmenden Effekt auf die Thrombin-induzierte Calcium-Erhöhung (Abb. 16). Im Gegensatz dazu inhibiert NO in WT-Thrombozyten die Thrombin-induzierte Calcium-Erhöhung komplett. Das Fehlen der NO-vermittelten Hemmung einer Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung kann also das Ausbleiben eines hemmenden Effektes auf die Adhäsion und Aggregation von GC-KO-Thrombozyten erklären.

4.2.6. Die Signaltransduktion über cAMP ist in β_1 -defizienten Thrombozyten intakt

Eine cytosolische cAMP-Erhöhung führt wie eine cytosolische cGMP-Erhöhung zur Hemmung der Adhäsion und Aggregation von stimulierten Thrombozyten. Um die Intaktheit des cAMP/PKA-Signalweges in GC-defizienten Thrombozyten zu untersuchen, wurde das Prostaglandin E_1 (PGE_1) verwendet. Die Bindung von PGE_1 an einen spezifischen Rezeptor in der Thrombozytenmembran führt G-Protein-gekoppelt zur Aktivierung der Adenylyl-Cyclase (AC) und somit zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die Aktivierung der PKA durch cAMP führt wie die Aktivierung der PKG durch cGMP zur Hemmung der Thrombozytenfunktionen.

Sowohl die intrazelluläre cAMP-Konzentration unter nicht-stimulierten Bedingungen, wie auch die zeitlich aufgenommene cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit PGE_1 (10 μ M) ist in WT- und GC-KO-Thrombozyten vergleichbar (17A). Die ermittelten cAMP-Spiegel stimmen mit den durch andere Gruppen gezeigten Werten überein (Halbrügge et al., 1990).

Um die Funktionalität der cAMP/PKA-Kaskade zu überprüfen, wurde zudem die VASP-Phosphorylierung und Thrombozytenaggregation untersucht. Das stabile Prostazyklin-Analogon Iloprost (10 μ M) führt ebenfalls zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die Bindung von cAMP an die PKA führt zur Aktivierung des Enzyms und zu einer Phosphorylierung von VASP an Position Ser-157 in WT- und GC-KO-Thrombozyten, wie anhand der im Western-Blot erhaltenen 50 kDa Bande sichtbar ist. Eine cAMP-vermittelte Aktivierung der PKA durch PGE_1 (40 nM) führt zur Hemmung einer Collagen-induzierten Aggregation sowohl von WT- wie auch von GC-KO-Thrombozyten (Abb. 18). Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass in GC-defizienten Thrombozyten der cAMP-Signalweg von dem Ausschalten der NO-GC unbeeinflusst und intakt ist.

4.3. Verkürzte Blutungszeit in NO-GC-defizienten Mäusen

Wie bereits einleitend beschrieben, nehmen die Thrombozyten eine wichtige Funktion in der primären Hämostase ein (siehe Kapitel 1.7.) und sind an der Bildung eines Thrombus zum Wundverschluss maßgeblich beteiligt. Da NO in GC-defizienten Thrombozyten in

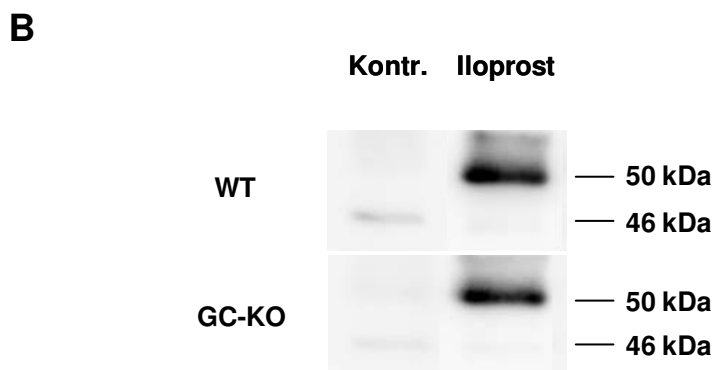
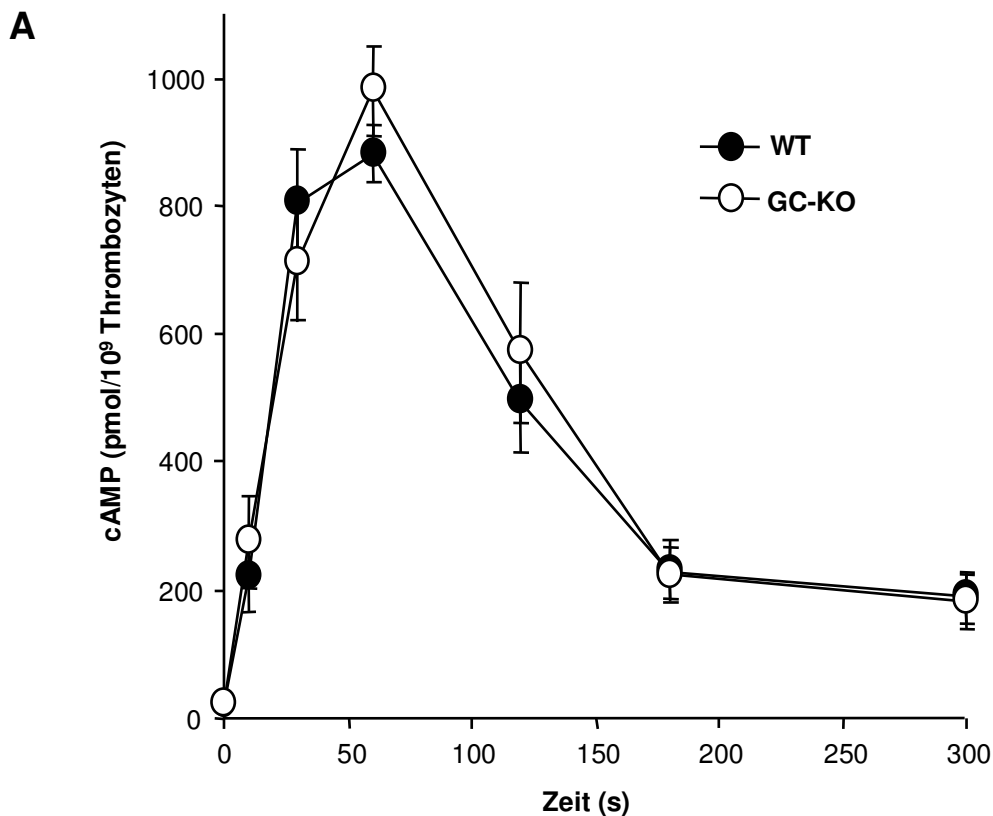


Abb. 17: Der cAMP/PKA-vermittelte Signaltransduktionsweg ist in GC-defizienten Thrombozyten intakt.

- (A)** Gewaschene Thrombozyten wurden mit PGE₁ (10 μM) zeitabhängig bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 200 μl eiskaltem, absoluten Ethanol wurde die Reaktion gestoppt. Mittels RIA wurde die cGMP-Akkumulation bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten für jeden Genotyp.
- (B)** Gewaschene Thrombozyten wurden in der An- bzw. Abwesenheit von Iloprost (10 μM) für 2 min bei 37°C inkubiert. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils Thrombozyten-Lysat (5x10⁷ Thrombozyten pro Spur) auf ein 9%-iges Gel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion der Phosphorylierung von VASP wurde ein spezifischer Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot.

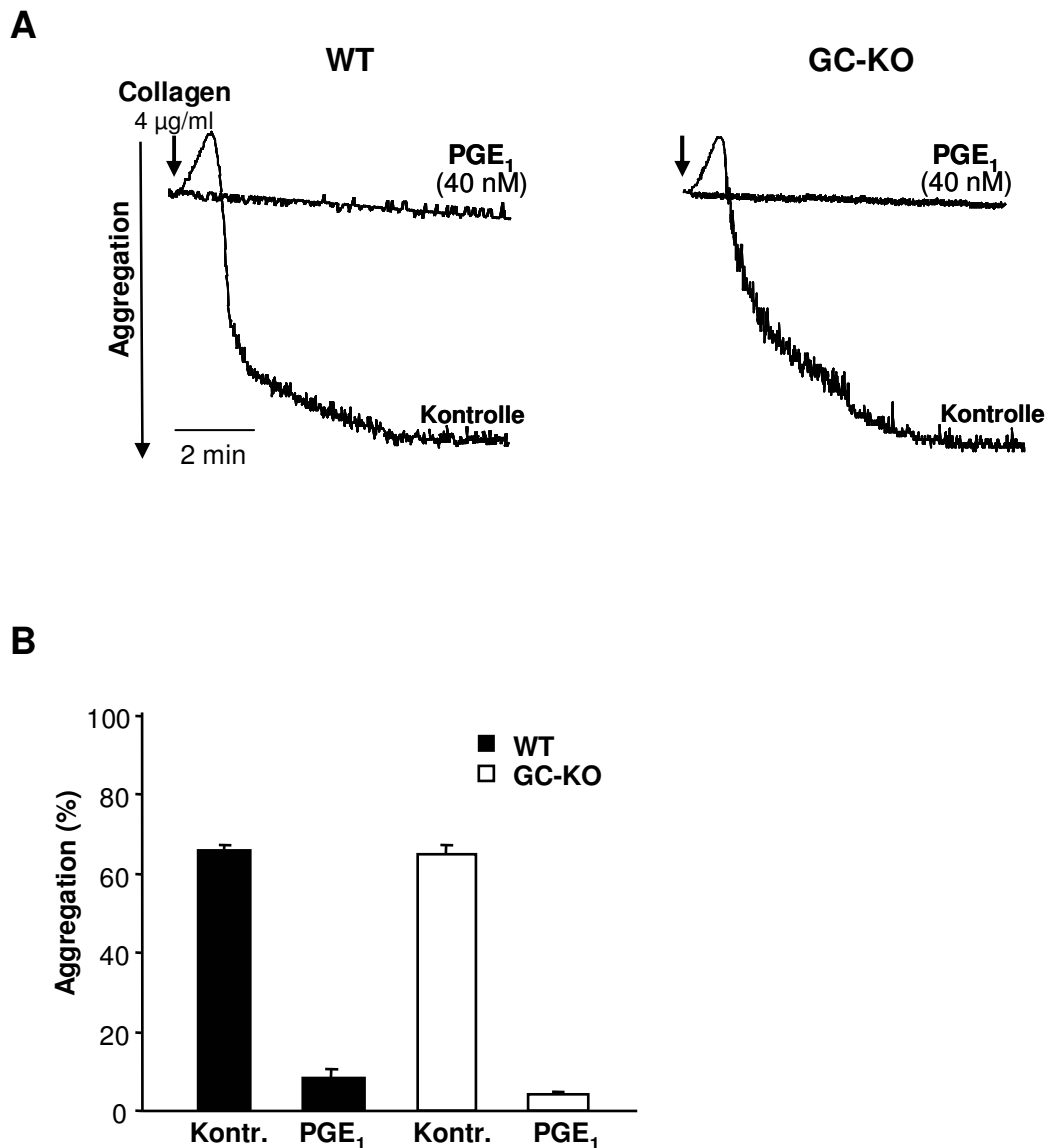


Abb. 18: PGE₁ führt zur Hemmung einer Collagen-induzierten Aggregation von WT- und GC-defizienten Thrombozyten *in vitro*.

- (A) PRP wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von PGE₁ bei 37°C für 3 min vorinkubiert. Durch Collagen (4 µg/ml; Pfeil) wurde die Thrombozytenaggregation stimuliert. Abgebildet sind repräsentative Aggregationsexperimente von WT-Thrombozyten und GC-KO-defizienten Thrombozyten.
- (B) Die Werte der statistischen Auswertung sind als % Aggregation angegeben und repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n = 4).

den bisher beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen weder die Calcium-Mobilisierung noch die Adhäsion und Aggregation beeinflusste, wurde die physiologische Relevanz der fehlenden Hemmung der Thrombozytenfunktion *in vivo* untersucht. Ein einfacher Test zur Thrombozytenfunktion ist die Messung der Schwanzblutungszeit.

Narkotisierten Mäusen wurde ca. 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten. Mit einem Filterpapier wurde alle 10 s der entstandene Blutropfen abgetupft und die Zeit bis zum Stoppen der Blutung ermittelt.

Es zeigt sich, dass die Blutungszeiten bei WT- und Heterozygoten-Mäusen ähnlich sind (Median von 60 s; Abb. 19). Im Gegensatz dazu ist die Blutungszeit bei GC-KO-Mäusen deutlich kürzer und liegt zwischen 0 bis 15 s (Median 10 s). Bei GC-KO-Mäusen kann auf eine schneller ablaufende primäre Hämostase geschlossen werden. Die verkürzten Blutungszeiten ergänzen die *in vitro*-Untersuchungen und bestätigen die Wichtigkeit des NO/cGMP-Signalweges bei der primären Hämostase.

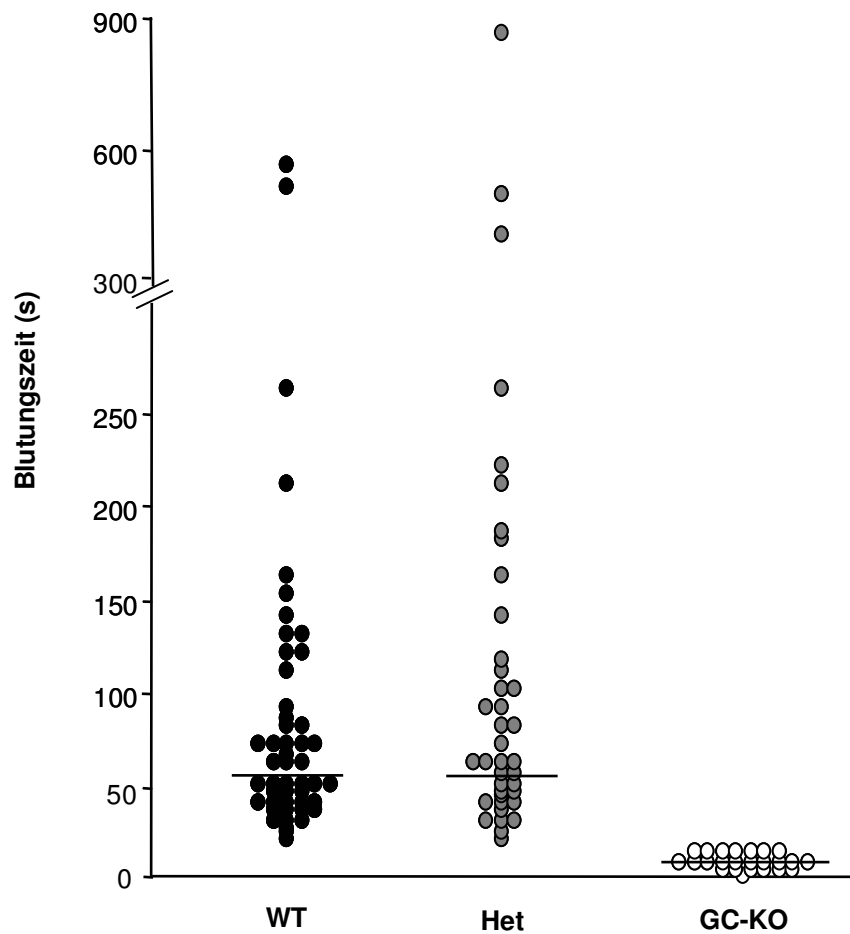


Abb. 19: Bestimmung der Blutungszeit am kupierten Schwanz.

Die Blutungszeit von WT-, heterozygoten (Het)- und GC-KO-Mäusen wurden vor der Genotypisierung gemessen. Hierzu wurde narkotisierten Tieren mit einer scharfen Skalpellklinge ca. 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten. Mit einem Filterpapier wurde alle 10 s der entstandene Blutropfen abgetupft. Die Zeit bis zum Stoppen der Blutung wurde ermittelt. Jedes Symbol repräsentiert eine ca. drei Wochen alte Maus (WT, n=49; het, n=39; GC-KO, n=24) (Markierung = Median).

5. Diskussion

Im Laufe der Evolution haben sich Signaltransduktionswege etabliert, welche es den Zellen eines mehrzelligen Organismus ermöglichen, miteinander zu kommunizieren und sich auf die jeweilig vorherrschenden Umweltbedingungen einzustellen. Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg stellt einen dieser Signalwege dar, der an einer Vielzahl von physiologischen Regulationsprozessen im Säugetierorganismus beteiligt ist. Eine besonders wichtige Rolle nimmt diese Signalkaskade im kardiovaskulären, neuronalen und gastrointestinalen System ein (Waldman und Murad, 1987; Moncada und Higgs, 1993; 1995; Ignarro, 2002). Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) ist als wichtiger Rezeptor für den parakrinen Botenstoff NO akzeptiert. Strukturell handelt es sich bei der NO-GC um ein heterodimeres Hämprotein, welches aus einer α - und einer β -Untereinheit gebildet wird. Bisher wurde das physiologische Vorkommen von zwei Isoformen ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) nachgewiesen. NO führt zur Aktivierung der NO-GC und es kommt zu einer gesteigerten cGMP-Produktion. Dieses cyclische Nukleotid fungiert in Säugetierzellen als wichtiger sekundärer Botenstoff und vermittelt Funktionen, die in Abhängigkeit vom Gewebetyp variieren (Kaupp und Seifert, 2002; Feil et al., 2003; Friebe und Koesling, 2003; Rybalkin et al., 2003).

Trotz intensiver Forschungsarbeit sind die Signalwege, über die NO seine physiologische Wirkung vermittelt, noch nicht ausreichend verstanden. So ist bisher nicht geklärt, welche NO-Effekte über die NO-GC und somit über den sekundären Botenstoff cGMP vermittelt bzw. welche NO-Effekte über alternative, nicht cGMP-vermittelte Signalwege gesteuert werden.

5.1. KO-Mäuse innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade

Die Möglichkeit, einzelne Gene in der Maus selektiv auszuschalten, erlaubt die genaue Analyse der physiologischen und pathophysiologischen Rolle verschiedener Signalmoleküle und Signalkaskaden. Mit bisher generierten KO-Mausmodellen des NO/cGMP-Signalweges konnten die vorhandenen Kenntnisse über die physiologische Funktion von NO bestätigt werden. Mäuse, in denen die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ausgeschaltet wurde, sind hyperten. So konnte die Bedeutung der endothelialen NO-Produktion für die Blutdruckregulation durch selektives Ausschalten der eNOS in Mäusen eindrucksvoll nachgewiesen werden (Huang et al., 1995). Ein auffälliges phänotypisches Merkmal nNOS-defizienter Mäuse ist eine Pylorusstenose (Huang et al., 1993; Gyurko et al., 2002). Dies unterstreicht die wichtige Bedeutung von NO als Signalmolekül im

gastrointestinalen System. Zudem konnte durch das genomische Ausschalten der PKGI in Mäusen bestätigt werden, dass die PKGI im kardiovaskulären System eine wichtige Funktion bei der Regulation des Blutdruckes und bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation hat (Massberg et al., 1999).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Bochum drei NO-GC-KO-Mauslinien (α_1 -, α_2 - und β_1 -KO) generiert (Mergia et al., 2006; Friebe et al., 2007), in denen selektiv eine Untereinheit ausgeschaltet vorliegt. Mit Hilfe dieser NO-GC-defizienten Mauslinien sollten weitere Informationen über die physiologische Rolle der NO-GC in der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion gewonnen werden.

Die Untersuchungen des Phänotyps der Mäuse der α -KO-Mauslinien zeigte zunächst eine normale Lebenserwartung und keine weiteren Auffälligkeiten im Vergleich zu WT-Geschwistertieren (Mergia et al., 2006). In den α -KO-Mäusen kommt es durch den Verlust einer der beiden Isoformen der NO-GC auf Proteinebene nicht zu einer Kompensation durch eine Hochregulierung der jeweils exprimierten Isoform. Mergia et al. (2006) konnten jedoch zeigen, dass die Expression der α -Untereinheit die Expression der β_1 -Untereinheit beeinflusst. So kommt es beim Ausschalten der α_1 -Untereinheit in α_1 -KO-Mäusen zum Verlust der $\alpha_1\beta_1$ -Isoform. Die aus der α_2 - und β_1 -Untereinheit gebildete $\alpha_2\beta_1$ -Isoform wird jedoch weiterhin im Gefäßendothel exprimiert (Mergia et al., 2006). Beim Ausschalten der α_2 -Untereinheit in α_2 -KO-Mäusen verhält es sich genau umgekehrt, so dass in diesen Mäusen die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform weiterhin exprimiert wird. Mit den Mäusen dieser Mauslinien hat man daher die Möglichkeit, gezielt den Einfluss einer der beiden Isoformen zu untersuchen.

Anders als bei den α -defizienten Mäusen zeigten β_1 -defiziente Mäuse eine intestinale Dysmotilität, die ihre Lebenserwartung auf etwa 3-4 Wochen begrenzte (Friebe et al., 2007). Durch eine Ballaststoff-arme Diät konnte bei β_1 -KO-Mäusen jedoch die Lebenserwartung verlängert werden. Die β_1 -defizienten Mäuse sind hyperten. Bemerkenswerterweise unterschieden sich die heterozygoten Geschwister-Mäuse der GC-KO-Mäuse im Phänotyp nicht von WT-Mäusen. Diese Mäuse wiesen gegenüber WT-Mäusen einen unveränderten Blutdruck sowie eine normale Herzfrequenz und eine normale Aktivität der NO-GC auf und zeigten vergleichbare Gefäßreaktionen auf eine Vielzahl von endothelabhängigen und -unabhängigen vasoaktiven Substanzen (Daten nicht gezeigt). Beim Verlust eines NO-GC-Allels ist demnach noch ausreichend NO-GC in den Zellen vorhanden und der Verlust tritt nicht in Erscheinung.

Vergleicht man den bei β_1 -defizienten Mäusen auftretenden Phänotyp mit dem der anderen KO-Maus-Modelle (siehe Kapitel 1.6.), so zeigen sich auffällige Ähnlichkeiten. Eine Hypertonie trat sowohl in eNOS- (Huang et al., 1995), NO-GC- (Friebe et al., 2007)

und PKGI-defizienten Mäusen auf (Pfeifer et al., 1998), was die Bedeutung von NO für die Regulation des Blutdruckes *in vivo* unterstreicht. Zudem zeigten nNOS-defiziente und PKGI-defiziente Mäuse, ähnlich dem bei β_1 -defizienten Mäusen auftretenden Phänotyp, eine intestinale Auffälligkeit, welche zu einer stark verminderten Lebenserwartung der KO-Mäuse führt (ca. 3-6 Wochen; Pfeifer et al., 1998; Gyurko et al., 2002). Dies lässt auf eine wichtige Bedeutung der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion im Gastrointestinaltrakt schließen. Im peripheren Nervensystem wird NO als einer der Neurotransmitter sogenannter nicht-adrenerger nicht-cholinerger (NANC)-Neurone diskutiert. NANC-Neurone kommen verbreitet vor und innervieren die glatte Muskulatur des Gastrointestinal-, Respirations-, und Urogenitaltraktes sowie die bestimmter Blutgefäße. Durch die Bildung und Freisetzung von NO in den Synapsen der NANC-Neurone wird eine Relaxation der glatten Muskulatur hervorgerufen (Bult et al., 1990; Sanders und Ward, 1992). Inhibitorische NANC-Neurone des Darmnervensystems beeinflussen über die Bildung und Freisetzung von NO den Muskeltonus des Gastrointestinaltraktes und den Rhythmus der Kontraktionen. Die genaue Funktion von NO und ob es eine Beteiligung von cGMP an dieser Signalweiterleitung im Gastrointestinaltrakt gibt, ist derzeit noch unklar.

Die Untersuchung β_1 -defizienter Mäuse zeigt, dass der Verlust der β_1 -Untereinheit zu einem vollständigen Verlust beider Enzymisoformen und somit zu einem Total-KO führt (GC-KO; Friebe et al., 2007). Es muß daher einen noch unbekanntem Regulationsmechanismus geben, der durch das Ausschalten der β_1 -Untereinheit auch zum Verlust der α -Untereinheiten führt.

Mit der GC-KO-Maus steht zum ersten Mal ein Tiermodell zur Verfügung, in welchem die NO/cGMP-Signaltransduktion vollständig unterbrochen ist. In den anderen Tiermodellen, in denen Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade ausgeschaltet wurden, wie z.B. die NO-Synthase oder die cGMP-abhängige Proteinkinase, ist zu berücksichtigen, dass es Isoformen und Spleißvarianten der Enzyme gibt (Alderton et al., 2001; Hofmann et al., 2006), die das ausgeschaltete Enzym kompensieren können. Die Tatsache, dass alle NO-GC-Isoformen durch den β_1 -KO ausgeschaltet sind, könnte eine Erklärung für den im Vergleich zu den anderen KO-Tieren wesentlich auffälligeren Phänotyp sein.

5.2. Die NO/cGMP-Kaskade in murinen Thrombozyten

Nach einer Gefäßverletzung kommt es Agonisten-induziert und über die Vermittlung von G-Proteinen zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und schließlich zur Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Der NO/cGMP-Signalweg wirkt hemmend

auf eine Calcium-Konzentrationserhöhung und somit auf die Adhäsion bzw. Aggregation der Thrombozyten ein.

In dieser Arbeit konnte mit Western-Blot-Analysen in Thrombozyten keine α_2 -Untereinheit der NO-GC detektiert werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass in Thrombozyten keine $\alpha_2\beta_1$ -Isoform existiert. Dieser Befund wurde durch die Tatsache gestützt, dass α_2 -defiziente Thrombozyten eine WT-ähnliche NO-induzierte Hemmung der Aggregation aufweisen (siehe unten). Somit vermittelt nur das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer die Effekte von NO innerhalb der NO/cGMP-vermittelten Signalkaskade in murinen Thrombozyten. In der Literatur wird allerdings kontrovers diskutiert, ob das NO-Signal nur über cGMP-abhängige oder auch über cGMP-unabhängige Signalwege weitergeleitet wird. Da es sich beim β_1 -KO-Mausmodell um einen Total-KO (GC-KO) handelt, bietet dieses Modell die Möglichkeit, eine cGMP-abhängige NO-Signalweiterleitung von einer cGMP-unabhängigen zu differenzieren.

Zunächst wurde untersucht, ob NO *in vitro* in der Lage ist, die Agonisten-induzierte Aggregation von Thrombozyten aus den GC-defizienten Mäusen zu hemmen. Es zeigte sich, dass die NO-vermittelte Hemmung der Agonisten-induzierten Aggregation in GC-defizienten Thrombozyten aufgehoben war. Um zu zeigen, dass das Ausbleiben des hemmenden NO-Effektes nicht auf die NO-Spezies oder der Kinetik der NO-Freisetzung begründet ist, wurde die Wirkung einer Reihe verschiedener NO-Donatoren getestet. Diese unterscheiden sich in ihrer chemischen Zusammensetzung der Trägersubstanz (Nitrosothiole, Nitrosyl-Eisen-Komplexe, anorganische Salze, Aminosäuren, primäre oder sekundäre Amine). Zudem unterscheiden sie sich durch die freigesetzte NO-Menge und in der freigesetzten NO-Spezies (NO^\cdot , NO^- , NO^+). Es zeigte sich, dass keiner der getesteten NO-Donatoren die Collagen-induzierte Aggregation von GC-KO-Thrombozyten hemmt. Selbst in hohen, unphysiologischen Konzentrationen, in denen laut Literatur cGMP-unabhängige Effekte auftreten, wurde keine Aggregationshemmung der GC-defizienten Thrombozyten beobachtet. Da für die Untersuchung der Thrombozytenaggregation von β_1 -defizienten Thrombozyten eine Reihe unterschiedlicher NO-Donatoren eingesetzt wurden, kann angenommen werden, dass NO das aktivierende Molekül unter allen getesteten Substanzen ist, welches die anti-thrombotischen Effekte vermittelt. Auch mit Thrombin und U46619 als proaggregatorische Agonisten zeigten sich gleiche Ergebnisse wie mit Collagen. Daher ist die hemmende Wirkung von NO unabhängig von dem eingesetzten proaggregatorische Agonisten.

Ein der Aggregation vorausgehendes Ereignis bei der primären Hämostase ist eine Agonisten-induzierte Adhäsion der Thrombozyten. Daher stellte sich die Frage, ob NO *in*

vitro einen Einfluss auf die ADP-induzierte Adhäsion der NO-GC-defizienten Thrombozyten hat. Die Untersuchung der Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen-coateten Mikrotiterplatten zeigte, dass die Adhäsion von GC-defizienten Thrombozyten nicht durch NO hemmbar war. Somit geht das Ausbleiben einer NO-induzierten Hemmung der Aggregation der GC-defizienten Thrombozyten mit dem Ausbleiben der Hemmung der Adhäsion einher. Eine Agonisten-induzierte Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten führt über die Bindung des Agonisten an einen spezifischen Rezeptor in der Thrombozytenmembran zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und führt schließlich zur Formveränderung, Aggregation und Degranulation der Thrombozyten. Die Untersuchung der Agonisten-induzierten Calcium-Mobilisierung in Fura-2 beladenen Thrombozyten zeigte schließlich, dass die in WT-Thrombozyten gemessene Hemmung der Agonisten-induzierten Calcium-Erhöhung in β_1 -defizienten Thrombozyten ausbleibt. Somit beruht das Ausbleiben einer NO-vermittelten Hemmung von Adhäsion und Aggregation auf dem Ausbleiben einer Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NO ausschließlich über die NO-GC und cGMP die Inhibierung der Agonisten-induzierten Aggregation, Adhäsion und Calcium-Freisetzung in murinen Thrombozyten vermittelt. Im NO-GC-defizienten Mausmodell können wir daher eine cGMP-unabhängige Signaltransduktion von NO bezüglich der betrachteten Thrombozytenfunktionswege ausschließen.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen cGMP-unabhängigen NO-Effekten auf die Thrombozytenfunktion (siehe Kapitel 1.7.5.2.; Sogo et al., 2000; Crane et al., 2005; Wanstall et al., 2005; Marcondes et al., 2006). In diesen Studien wurde die hemmende Wirkung von NO-freisetzenden Substanzen auf die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten untersucht. Um cGMP-abhängige NO-Effekte von cGMP-unabhängigen zu differenzieren, wurde die NO-GC in den Experimenten jeweils durch den selektiven NO-GC-Hemmstoff ODQ inhibiert.

Marcondes et al. (2006) benutzten einen ähnlich aufgebauten Adhäsionsassay, wie er für die Adhäsionsexperimente in dieser Arbeit verwendet wurde. Sie zeigten, dass die Agonisten-induzierte Adhäsion humaner Thrombozyten trotz der Anwesenheit des selektiven Hemmstoffs der NO-GC (10 μ M ODQ) durch das von SNP (1 mM) freigesetzte NO gehemmt wird. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Signalweiterleitung für das von SNP freigesetzte NO über cGMP-unabhängige Signalwege erfolgt. Als möglicher Mechanismus wurde eine Tyrosin-Nitrierung postuliert. Als Zielprotein dieser Nitrierungsreaktion wurde das α -Aktinin 1 identifiziert (Marcondes et al., 2006), welches als Cytoskelett-assoziiertes Protein mit transmembranären Adhäsionsrezeptoren

assoziiert (Otey et al., 1990; Tanaka und Itoh, 1998). Zudem ist bekannt, dass α -Aktinin 1 durch die fokale Adhäsionskinase phosphoryliert werden kann (Izaguirre et al., 2001). Marcondes et al. (2006) gehen davon aus, dass die Phosphorylierung des α -Aktinin 1 durch die Nitrierung verhindert wird, so dass NO cGMP-unabhängig die Thrombozytenadhäsion hemmt.

In den Arbeiten von Sogo et al. (2000) und Crane et al. (2005) wurde die antiaggregatorische Wirkung NO-freisetzender Substanzen auf humane Thrombozyten untersucht. Sogo et al. (2000) konnten zeigen, dass das von den NO-Donatoren GTN (30 μ M), GSNO (30 μ M) und DEA-NO (30 μ M) freigesetzte NO trotz Anwesenheit von ODQ (100 μ M) die Agonisten-induzierte Aggregation hemmt. Die SNP-vermittelte (30 μ M) Hemmung der Agonisten-induzierten Aggregation war durch ODQ allerdings aufgehoben. Daher postulierten sie, dass die Signalweiterleitung für das von SNP freigesetzte NO ausschließlich über cGMP-abhängige Signalwege erfolgt, während die anderen NO-Donatoren über einen cGMP-unabhängigen Weg die Agonisten-induzierte Aggregation beeinflussen.

Auch Crane et al. (2005) zeigten, dass NO (3 μ M DEA-NO, 100 μ M SNVP (S-Nitroso-N-valerylpenicillamin) und 100 μ M SIN-1 (3-Morpholinonydnomin)) eine Agonisten-induzierte Aggregation von Thrombozyten-reichem Plasma trotz der Anwesenheit von ODQ (20 μ M) hemmt. Die cGMP-unabhängige Wirkung von DEA-NO konnte von dieser Arbeitsgruppe auch in gewaschenen Thrombozyten bestätigt werden. Als Wirkungsmechanismus der cGMP-unabhängigen Wirkung der NO-Donatoren benennen sie die S-Nitrosylierung, wobei NO mit einer Thiol-Gruppe reagiert (siehe Kapitel 1.7.5.2.). Derzeit sind jedoch kaum Zielproteine für diesen cGMP-unabhängigen NO-vermittelten Signaltransduktionsweg beschrieben.

Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit und den zitierten Arbeiten sind denkbar. Bislang existierte kein Mausmodell, in welchem die NO-GC selektiv ausgeschaltet wurde. Daher wurde der NO-GC Inhibitor ODQ (siehe Kapitel 1.4.3.) in den oben aufgeführten Studien zur Untersuchung der cGMP-unabhängigen Signalwege eingesetzt. Es wird angenommen, dass ODQ zu einer Oxidation des zentralen Eisen-Atoms der prosthetischen Hämgruppe der NO-GC führt und somit zur Hemmung des Enzyms (Schrammel et al., 1996). Im Falle einer unvollständigen Hemmung durch ODQ käme es durch die restlichen aktiven NO-GC-Moleküle zu einer funktionellen NO/cGMP-Signaltransduktion. Mergia et al. zeigten an Aorten aus α_1 -KO-Mäusen (diese beinhalten noch ca. 6% der gesamten NO-GC in Form der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform; Mergia et al., 2006), dass NO trotz einer stark reduzierten NO-GC-

Expression dennoch eine Relaxation auslösen kann. Diese Daten zeigen, dass selbst geringe Mengen der NO-GC bei erhöhten NO-Konzentrationen zu einer physiologischen Antwort führen können. Zudem zeigte die Arbeitsgruppe um Moncada, dass NO in hohen Konzentrationen die hemmende Wirkung von ODQ zumindest teilweise aufheben kann, wenn 100-mal mehr NO im Verhältnis zu ODQ vorhanden ist (Moro et al., 1996). Die von Marcondes et al. (2006) eingesetzten Konzentrationen von NO (1 mM SNP) und ODQ (10 μ M) lagen in diesem Verhältnis bei der Untersuchung der NO-vermittelten Wirkung auf die Adhäsion der Thrombozyten vor. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ODQ-vermittelte Hemmung der NO-GC durch den Einsatz einer hohen NO-Konzentration reversiert wurde. Die freigesetzte NO-Konzentration ist abhängig von der Grundstruktur des NO-Donators. Vorstellbar ist daher, dass die NO-Freisetzungsraten der einzelnen NO-Donatoren das Verhältnis NO zu ODQ so verändert, dass der ODQ-Effekt durch NO aufgehoben wird, was die durch Sogo et al. (2000) und Crane et al. (2005) gezeigten Befunde erklären könnte.

Eine weitere Möglichkeit die unterschiedlichen Befunde dieser Arbeit im Vergleich zu den anderen Arbeiten zu begründen, liegt bei der Wahl der unterschiedlichen biologischen Modellsysteme. In den Studien wurden humane Thrombozyten aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit, Isolierung und Gewinnung und wegen ihrer direkten medizinischen Relevanz verwendet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass humane und murine Thrombozyten Unterschiede bei der Signaltransduktion, welche regulatorisch auf die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten eingreift, aufweisen und sich somit humane und murine Thrombozyten bei der NO-vermittelten Hemmung der Thrombozytenfunktion unterscheiden. Allerdings gibt es derzeit trotz vieler Veröffentlichungen über murine und humane Thrombozyten keine Hinweise auf eine divergierende NO-vermittelte Regulation von murinen und humanen Thrombozyten.

Die Befunde aus den *in vitro*-Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Thrombozytenfunktion *in vivo* gestört sein könnte. Ein einfacher Test, um die physiologische Relevanz der fehlenden Hemmung der Thrombozytenfunktion *in vivo* zu untersuchen, bietet die Messung der Schwanzblutungszeit der GC-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen. Dazu wurde narkotisierten Tieren mit einer scharfen Skalpellklinge ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und die Zeit bis zum Stoppen der Blutung ermittelt. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Blutungszeit in GC-KO-Mäusen *in vivo*. Diese Reduktion kann durch das Fehlen der antiadhäsiven und antiaggregatorischen Wirkung von NO nach Ausschalten der NO-GC erklärt werden. Zusätzlich fehlt durch die Deletion der NO-GC der NO/cGMP-vermittelte vasodilatatorische Einfluss auf die glatte Muskulatur der Gefäße.

Daher ist es denkbar, dass die primäre Hämostase in GC-KO-Mäusen durch eine gleichzeitige Vasokonstriktion begünstigt wird.

5.3. Thrombozyten in anderen KO-Modellen der NO/cGMP-Kasade

Wie bereits einleitend dargestellt, wird NO im Endothel des Gefäßes freigesetzt und führt durch die Aktivierung der NO-GC zu einer vermehrten cGMP-Bildung. Die Untersuchung der Thrombozyten aus den Mausmodellen, in denen die α_1 - bzw. β_1 -Untereinheiten der NO-GC genomisch ausgeschaltet wurden, zeigte bereits die Bedeutung von NO und cGMP bei der Hemmung der Thrombozytenfunktion (Mergia et al., 2006; Friebe et al., 2007). Innerhalb der NO/cGMP-Kaskade wurden mehrere andere Enzyme auf genomischer Ebene ausgeschaltet:

Es existieren zwei Isoformen der PKG, PKGI und PKGII. In Thrombozyten wird nur die PKGI exprimiert, sie ist dort das wichtigste cGMP-Effektorprotein. PKGI-defiziente Mäuse wurden von Massberg et al. (1999) generiert. Membrangängige cGMP-Analoga hatten in PKGI-defizienten Thrombozyten keine antiaggregatorische Wirkung mehr. Diese Ergebnisse zeigen, dass cGMP ausschließlich über die PKGI und nicht über andere cGMP-Effektorproteine wirkt. In Übereinstimmung bleibt sowohl in PKGI-defizienten als auch in NO-GC-defizienten Mäusen die hemmende Wirkung von NO auf eine Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation aus.

Das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist ein Substrat der PKGI und wird durch die PKGI phosphoryliert. Untersuchungen an Thrombozyten aus PKGI-defizienten und NO-GC-defizienten Mäusen zeigen, dass es NO/cGMP-vermittelt nicht zur Phosphorylierung von VASP kommt, da die NO/cGMP-vermittelte Signalweiterleitung oberhalb von VASP unterbrochen war. Alternativ dazu war die cAMP/PKA-Signaltransduktion in beiden Thrombozytenmodellen jedoch intakt und es zeigte sich keine Kompensation durch den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg.

Man geht davon aus, dass die VASP-Phosphorylierung durch die PKGI in einem engen Zusammenhang mit der Hemmung der Thrombozytenfunktion steht. Die Untersuchung von VASP-defizienten Thrombozyten zeigte, dass NO keine hemmenden Eigenschaften auf die Agonisten-induzierte Thrombozytenadhäsion hat (Massberg et al., 2004). Somit ist die NO/cGMP-vermittelte Hemmung der Agonisten-induzierten Adhäsion von VASP-defizienten Thrombozyten, wie die der NO-GC-defizienten Thrombozyten, gestört.

Ein weiteres Substrat der PKGI ist IRAG (Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat), das in Thrombozyten exprimiert wird und dort in einem Makro-Komplex aus PKGI und dem Rezeptor für Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) vorliegt (Antl et al., 2007).

Die Phosphorylierung von IRAG führt zu einer Hemmung der IP₃-induzierten Calcium-Freisetzung. Ähnlich wie bei NO-GC- und PKGI-defizienten Thrombozyten führen weder NO noch cGMP-Analoga bei IRAG-defizienten Thrombozyten zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation (Massberg et al., 1999; Mergia et al., 2006; Antl et al., 2007; Friebe et al., 2007). Diese Befunde weisen daraufhin, dass die NO/cGMP-vermittelte Signalweiterleitung innerhalb der Kaskade von NO über die NO-GC, die PKGI und IRAG cGMP-abhängig und ohne weitere Verzweigungen abläuft.

6. Zusammenfassung

Die NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen im Säugerorganismus. Eine besonders wichtige Rolle nimmt diese Signalkaskade im kardiovaskulären System ein.

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) stellt den wichtigsten Rezeptor für das aus dem Endothel des Blutgefäßes freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO) dar. NO führt nach Bindung an die prosthetische Häm-Gruppe zur Aktivierung des Enzyms und vermittelt eine gesteigerte cGMP-Bildung. Strukturell handelt es sich bei der NO-GC um ein heterodimeres Hämprotein, welches aus einer α - und einer β -Untereinheit gebildet wird. Bisher wurde das physiologische Vorkommen von zwei Isoformen ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) nachgewiesen. Das von der NO-GC gebildete cGMP fungiert in Säugetierzellen als wichtiger sekundärer Botenstoff und vermittelt Funktionen, die in Abhängigkeit vom Gewebetyp variieren. So stimuliert cGMP beispielsweise in glatter Gefäßmuskulatur und in Thrombozyten die cGMP-abhängige Proteinkinase I und führt zur Phosphorylierung von weiteren Effektorproteinen. Letztlich kommt es zur Reduktion der freien intrazellulären Calcium-Konzentration in den Zellen. NO/cGMP-vermittelt kommt es so zur Gefäßrelaxation und zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

Mausmodelle, in denen entweder die α_1 -, α_2 - (Mergia et al., 2006) oder die β_1 -Untereinheit (Friebe et al., 2007) der NO-GC auf genomischer Ebene ausgeschaltet wurden, bieten die Möglichkeit, die physiologische Rolle der NO-GC genauer zu untersuchen. Da es sich bei β_1 -KO-Mäusen um einen Total-KO handelt, steht mit diesen Mäusen zum ersten Mal ein Tiermodell zur Verfügung, in welchem der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg vollständig ausgeschaltet ist. Zudem bietet dieses Tiermodell die Möglichkeit, cGMP-abhängige NO-Effekte von den in der Literatur beschriebenen cGMP-unabhängigen zu differenzieren.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der NO-GC in Thrombozyten aus KO-Mäusen untersucht. Unklar war, ob beide Isoformen der NO-GC an der Regulation der Thrombozyten beteiligt sind, oder ob es eine Isoform-spezifische Funktion gibt. Mittels Western-Blot konnte zunächst gezeigt werden, dass nur das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer in Thrombozyten exprimiert wird und für die Weiterleitung des NO-Signals verantwortlich ist.

Weiterhin wurde *in vitro* die Agonisten-induzierte Aggregation von Thrombozyten untersucht. An isolierten Thrombozyten aus β_1 -defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Agonisten-induzierte Aggregation durch NO nicht mehr hemmbar ist. Selbst in hohen, unphysiologischen Konzentrationen (mM) führte keiner der getesteten NO-Donatoren zu einer Inhibierung der Collagen-induzierten Aggregation der NO-GC-defizienten Thrombozyten. Die Ergebnisse wurden an Thrombozyten aus α_1 -defizienten

Mäusen bestätigt. Auch in diesen Thrombozyten wurde die Aggregation durch NO nicht gehemmt. Übereinstimmend mit dem Befund, dass in Thrombozyten nur das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer zur Weiterleitung des NO-Signals führt, zeigten Thrombozyten aus α_2 -defizienten Mäusen eine WT-ähnliche Hemmung der Aggregation durch NO.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei der Thrombozytenaktivierung zunächst zur Agonisten-induzierten Adhäsion bevor die Thrombozyten aggregieren. Daher stellte sich die Frage, ob NO einen Einfluss auf die Agonisten-vermittelte Adhäsion in β_1 -defizienten Thrombozyten hat. Die Untersuchung der Adhäsion von NO-GC-defizienten Thrombozyten an Fibrinogen-gecoateten Mikrotiterplatten zeigte, dass diese nicht durch NO hemmbar war. Somit geht das Ausbleiben einer NO-induzierten Hemmung der Aggregation der NO-GC-defizienten Thrombozyten mit dem Ausbleiben der Hemmung der Adhäsion einher. Die NO-induzierte Hemmung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten soll über die Reduktion der freien intrazellulären Calcium-Konzentration in der Zelle vermittelt werden. Daher stellte sich die Frage, ob NO einen Einfluss auf die Agonisten-vermittelte Calcium-Mobilisierung in β_1 -defizienten Thrombozyten hat. Die Untersuchung der Calcium-Mobilisierung in Fura-2 beladenen Thrombozyten zeigte schließlich, dass auch die Hemmung der Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung durch NO in β_1 -defizienten Thrombozyten aufgehoben ist. Das Ausbleiben einer NO-vermittelten Hemmung von Adhäsion und Aggregation beruht somit auf dem Ausbleiben einer Agonisten-induzierten Calcium-Freisetzung. Der alternativ zu cGMP/PKG ablaufende cAMP/PKA-Signalweg ist in NO-GC-defizienten Thrombozyten hingegen intakt.

Die Befunde aus den *in vitro*-Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Thrombozytenfunktion *in vivo* gestört sein könnte. Daher wurde die physiologische Relevanz der fehlenden Hemmung der Thrombozytenfunktion *in vivo* untersucht. Die Messung der Schwanzblutungszeit bietet einen einfachen Test zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion *in vivo* und es zeigte sich eine ausgeprägte Reduktion der Blutungszeit. Diese Reduktion kann durch das Fehlen der antiadhäsiven und antiaggregatorischen Wirkung von NO erklärt werden.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform der NO-GC den einzigen NO-Rezeptor in murinen Thrombozyten darstellt, welcher die Inhibierung der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation durch NO vermittelt. Für die in dieser Arbeit untersuchten physiologischen Funktionen von murinen Thrombozyten können cGMP-unabhängige NO-Effekte daher ausgeschlossen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges, N., Hove-Madsen, L., Fischmeister, R. und Mery, P.F..**
(1997) A comparative study of the effects of three guanylyl cyclase inhibitors on the L-type Ca²⁺ and muscarinic K⁺ currents in frog cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* **121(7)**: 1369-77.
- Ahern, G.P., Klyachko, V.A. und Jackson, M.B..**
(2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* **25(10)**: 510-7.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. und Knowles, R.G..**
(2001) Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357(Pt3)**: 593-615.
- Ammendola, A., Geiselhoring, A., Hofmann, F. und Schlossmann, J..**
(2001) Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J. Biol. Chem.* **276**: 24153-9.
- Antl, M., von Bruhl, M.L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., Wilm M, Hofmann, F., Massberg, S. und Schlossmann, J..**
(2007) IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood.* **109(2)**: 552-9.
- Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. und Price, T.D..**
(1963) Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* **11**: 330-4.
- Axelsson, K. L., Wikberg, J. E. und Andersson, R. G..**
(1979) Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci.* **24**: 1779-86.
- Barrett, D.M., Black, S.M., Todor, H., Schmidt-Ullrich, R.K., Dawson, K.S. und Mikkelsen, R.B..**
(2005) Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. *J Biol Chem.* **280(15)**: 14453-61.
- Behrends, S. und Vehse, K..**
(2000) The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* **271(1)**: 64-9.
- Bellavite, P. Andrioli, G., Guzzo, P., Arigliano, P., Chirumbolo, S., Manzato, F. und Santonastaso, C..**
(1994) A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem.* **216(2)**: 444-50.
- Bender, A.T. und Beavo, J.A..**
(2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* **58(3)**: 488-520.
- Biel, M., Zong X., Ludwig, A., Sautter, A. und Hofmann, F..**
(1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Re. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 151-171.

- Birschmann, I. und Walter, U.,**
(2004) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim Pol.* **51(2)**: 397-404.
- Blaise, G.A., Gauvin, D., Gangal, M. und Authier, S..**
(2005) Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology.* **208(2)**: 177-92.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. und Cohen, R.A..**
(1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* **368**: 850-3.
- Böhme, E., Jung, R. und Mechler, I..**
(1974) Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol.* **38**: 199-202.
- Böhme, E., Grossmann, G., Herz, J., Mulsch, A., Spies, C. und Schultz, G..**
(1984) Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase: stimulation by NO-containing compounds. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **17**: 259-66.
- Bradford, M.M..**
(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia H., Peters, M.F., Froehner, S.C. und Brecht, D.S..**
(1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* **84**: 757-767.
- Brecht, D. S. und Snyder, S. H..**
(1991) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 682-5.
- Brune, B. und Lapetina, E.G..**
(1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem.* **264(15)**: 8455-8458.
- Brunner, F., Stessel, H. und Kukovetz, W.R..**
(1995) Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Lett.* **376(3)**: 262-6.
- Brunner, F., Schmidt, K., Nielsen, E.B. und Mayer, B..**
(1996) Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *Pharmacol Exp Ther.* **277(1)**: 48-53.
- Buechler, W. A., Nakane, M. und Murad, F..**
(1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 351-7.
- Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M. und Herman, A.G..**
(1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345(6273)**: 346-7.
- Burnett, A.L., Chang, A.G., Crone, J.K., Huang, P.L. und Sezen, S.E.**
(2002) Noncholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *J. Androl.* **23**: 92-97.

- Burnett A.L..**
(2006) The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **8(12 Suppl 4)**: 53-62.
- Butt, E., Nolte, C., Schulz, S., Beltman, J., Beavo, J.A., Jastorff, B. und Walter U..**
(1992) Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol.* **43(12)**: 2591-600.
- Capecchi, M.R..**
(1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* **5(3)**: 70-6.
- Capecchi, M.R..**
(1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-92.
- Capecchi, M. R..**
(1994) Targeted gene replacement. *Sci Am* **270**: 52-9.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S. und Schapira, A.H..**
(1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **345(1)**: 50-4.
- Corbin, J. D. und Francis, S. H..**
(1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J.Biol.Chem.* **274**: 13729-32.
- Corbin, J. D., Turko, I. V., Beasley, A. und Francis, S. H..**
(2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2760-7.
- Crane, M.S., Rossi, A.G. und Megson I.L..**
(2005) A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 849-859.
- De Belder, A.J., MacAllister, R., Radomski, M.W., Moncada, S. und Vallance, P.J..**
(1994) Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res.* **28(5)**: 691-4.
- Denninger, J.W. und Marletta, M.A..**
(1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* **1411(2-3)**: 334-50.
- Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V. und Hofmann F..**
(1994) Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology.* **33(11)**: 1275-82.
- Drago, R.S. und Paulik, F.E..**
(1960) The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Diethylamine. *JACS* **82**: 96.
- Eigenthaler M, Ullrich H, Geiger J, Horstrup K, Honig-Liedl P, Wiebecke D, Walter U.**
(1993) Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem.* **268(18)**: 13526-31.

- Eliasson, M.J., Blackshaw, S., Schell, M.J. und Snyder, S.H.**
(1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(7)**: 3396-401.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. und Schmidt, H.H.**
(1999) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Mol Pharmacol.* **56(2)**: 243-53.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.**
(1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132(1)**: 6-3.
- Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U. und Hofmann, F.**
(2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res.* **93(10)**: 907-16.
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. und Lyubarsky, A. L.**
(1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature.* **313**: 310-3.
- Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F. und Vandecasteele, G.**
(2005) Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **142(2)**: 136-43.
- Foerster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G. und Koesling, D.**
(1996) A functional heme-binding site of soluble Guanylyl-Cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.* **240**: 380-6.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. und Kleinert, H.**
(1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* **23(6 Pt 2)**: 1121-31.
- Friebe, A., Schultz, G. und Koesling, D.**
(1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* **15(24)**: 6863-8.
- Friebe, A., Müllershausen, F., Smolenski, A., Walter, U., Schultz, G. und Koesling, D.**
(1998) YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol.* **54(6)**: 962-7.
- Friebe, A. und Koesling, D.**
(2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* **93(2)**: 96-105.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D.**
(2007) Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104(18)**: 7699-7704.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B. und Keef, K. D.**
(1999) Cyclic GMPdependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J. Biol. Chem.* **274**: 10927-35.
- Furchgott, R. F. und Zawadzki, J. V.**
(1980) The obligatory role of endothelial cells in the Relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-6.
- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C. und Schmidt, H.H.**
(1999) Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol.* **127(1)**: 195-203.

- Galli-Taliadoros, L.A., Sedgwick, J.D., Wood S.A. und Korner, H..**
(1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods*. **181(1)**: 1-15.
- Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegn, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B, Redfield, M.M. und Burnett, J.C. Jr..**
(2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab*. **17(6)**: 251-8.
- Garthwaite, J. und Boulton, C.L..**
(1995) Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*; **57**: 683-706.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K. und Mayer, B.**
(1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive Guanylyl-Cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol*. **48**: 184-8.
- Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J.M., Fackler, J., Ramdev, P., Arnelle, D., Mullins, M.E., Sugarbaker, D.J., Chee, C. und Singel, D.J..**
(1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90(23)**: 10957-61.
- Gaston, B., Drazen, J.M., Jansen, A., Sugarbaker, D.A., Loscalzo, J., Richards, W. und Stamler, J.S..**
(1994) Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. **268(2)**: 978-84.
- Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S.O. und Walter, U..**
(1992) Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(3)**: 1031-5.
- Geiger, J..**
(2001) Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**: 865-890.
- Gerzer, R., Hofmann, F. und Schultz, G..**
(1981) Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur. J. Biochem*. **116**: 479-86.
- Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F. und Schultz, G..**
(1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS. Lett*. **132**: 71-4.
- Gibaldi, M..**
(1993). What is nitric oxide and why are so many people studying it. *J Clin Pharmacol* **33(6)**: 488-496.
- Gibbins, J.M..**
(2004) Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci*. **117 (Pt16)**: 3415-25.
- Goldberg, N.D., Dietz, S.B. und O'Toole, A.G..**
(1969) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem*. **244(16)**: 4458-66.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y..**
(1985) A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem*. **260**: 3440-3450.

- Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M.C. und Huang, P.L..**
(2000) Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **278(3)**: 971-81.
- Gyurko, R., Leupen, S. und Huang, P.L..**
(2002) Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology.* **143(7)**: 2767-74.
- Haghikia, A., Mergia, E., Friebe, A., Eysel, U.T., Koesling, D. und Mittmann, T..**
(2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci.* **27(4)**: 818-23.
- Halbrügge, M. und Walter, U..**
(1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem.* **185(1)**: 41-50.
- Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. und Walter, U..**
(1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem.* **265(6)**: 3088-93.
- Hansen, T.J., Croisy, A.F. und Keefer, L.K..**
(1982) N-nitrosation of secondary amines by nitric oxide via the 'Drago complex'. *IARC Sci Publ.* **41**: 21-9.
- Hardman, J.G. und Sutherland, E.W..**
(1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* **244(23)**: 6363-70.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G. und Böhme, E..**
(1990) Expression of soluble Guanylyl-Cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS. Lett.* **272**: 221-3.
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E. und Schultz, G..**
(1991) Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble Guanylyl-Cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* **292**: 217-22.
- Harper, J.F. und Brooker, G..**
(1975) Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J Cyclic Nucleotide Res.* **1(4)**: 207-18.
- Haslam, R. J., Davidson, M. M., Davies, T., Lynham, J. A. und McClenaghan, M. D.**
(1978) Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **9**: 533-52.
- Haslam, R. J., Dickinson, N. T. und Jang, E. K..**
(1999) Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb. Haemost.* **82**: 412-23.
- Haug, L. S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S. I. und Ostvold, A. C..**
(1999) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* **274**: 7467-73.
- Hauser, W., Knobloch, K.P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U. und Zimmer, M..**
(1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 8120-25.

- Hedlund, P., Aszodi, A., Pfeifer, A., Alm, P., Hofmann, F., Ahmad, M., Fassler, R. und Andersson, K. E..**
(2000) Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2349-54.
- Hevel, J.M., White, K.A., und Marletta, M.A..**
(1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* **266(34)**: 22789-91.
- Hoffmüller, U., Russwurm, M., Kleinjung, F., Ashurst, J., Oschkinat, H., Volkmer-Engmert, R., Koesling, D. und Schneider-Mergener, J..**
(1999) Interaktion einer PDZ-Proteindomäne mit einer synthetischen Bibliothek aller C-termini humaner Proteine: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**: 2000–2004.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J..**
(2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* **113**:1671-1676.
- Hofmann, F..**
(2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* **280(1)**: 1-4.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. und Schlossmann, J..**
(2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* **86(1)**: 1-23.
- Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R. und Morgan, K.G..**
(1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* **76(4)**: 967-1003.
- Houdebine, L.M..**
(2007) Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol.* **360**: 163-202.
- Hrabie, J.A., et al.**
(1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *JOC* **58**: 1472.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. und Fishman, M.C..**
(1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* **75(7)**: 1273-86.
- Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A. und Fishman, M.C..**
(1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* **377**: 239-242.
- Huang, P.L..**
(2000) Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J Am Soc Nephrol.* **11 Suppl 16**: 120-3.
- Hunter, W.M. und Greenwood, F.C..**
(1964) A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem J.* **91(1)**: 43-56.
- Hurt, K.J., Musicki, B., Palese, M.A., Crone, J.K., Becker, R.E., Moriarity, J.L., Snyder, S.H. und Burnett, A.L.**
(2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4061-4066.
- Hurt, K.J., Sezen, S.F., Champion, H.C., Crone, J.K., Palese, M.A., Huang, P.L., Sawa, A., Luo, X., Musicki, B., Snyder, S.H. und Burnett, A.L..**
(2006) Alternatively spliced neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103(9)**: 3440-3.

- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. und Chaudhuri, G..**
(1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 9265-9.
- Ignarro, L.J., Ross, G. und Tillisch, J..**
(1991) Pharmacology of endothelium-derived nitric oxide and nitrovasodilators. *West J Med.* **154(1)**: 51-62.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. und Napoli, C..**
(1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**: 879-886.
- Ignarro, L.J..**
(2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* **53(4 Pt 1)**: 503-14.
- Ishikawa, E., Ishikawa, S., Davis, J.W. und Sutherland, E.W..**
(1969) Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J Biol Chem.* **244(23)**: 6371-6.
- Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y.P., Lee, H.Y., Schlaepfer, D.D., Aneskievich, B.J. und Haimovich B.**
(2001) The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* **276(31)**: 28676-85.
- Jaenisch, R..**
(1988) Transgenic animals. *Science* **240**: 1468-74.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H. R., Lohmann, S. M. und Walter, U..**
(1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9426-30.
- Kantor, D.B., Lanzrein, M., Stary, S.J., Sandoval, G.M., Smith, W.B., Sullivan, B.M., Davidson, N. und Schuman, E.M..**
(1996) A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science.* **274(5293)**: 1744-8.
- Kaupp, U.B. und Seifert, R..**
(2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* **82(3)**: 769-824.
- Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F..**
(1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* **208**: 467-73.
- Kimura, H. und Murad, F..**
(1974) Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem.* **249(21)**: 6910-6.
- Kimura, H. und Murad, F..**
(1975) Increased particulate and decreased soluble guanylate cyclase activity in regenerating liver, fetal liver, and hepatoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72(5)**: 1965-9.
- Kimura, H. und Murad, F..**
(1975) Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation. *Metabolism.* **24(3)**: 439-45.

- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M. und Moncada, S..**
(1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86(13)**: 5159-62.
- Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K. D., Mülsch, A., Böhme, E., Schultz, G. und Frank, R..**
(1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS. Lett.* **239**: 29-34.
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E..**
(1990) The primary structure of the larger subunit of soluble Guanylyl-Cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS. Lett.* **266**: 128-32.
- Koesling, D. und Friebe, A..**
(1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 41-65.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. und Seeburg, P.H..**
(1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* **269**: 1737-1740.
- Laemmli, U. K..**
(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-5.
- Laubach, V.E., Shesely, E.G., Smithies, O. und Sherman, P.A..**
(1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92(23)**: 10688-92.
- Lev-Ram, V., Nebyelul, Z., Ellisman, M.H., Huang, P.L. und Tsien, R.Y..**
(1997) Absence of cerebellar long-term depression in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Learn Mem.* **4(1)**: 169-77.
- Lin, C.S., Lau, A., Tu, R. und Lue, T.F..**
(2000) Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **268(2)**: 596-602.
- Liochev, S.I. und Fridovich I..**
(2003) The mode of decomposition of Angeli's salt (Na₂N₂O₃) and the effects thereon of oxygen, nitrite, superoxide dismutase, and glutathione. *Free Radic Biol Med.* **34(11)**: 1399-404.
- Lipton S.A. und Stamler J.S..**
(1994) Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacology* **33(11)**: 1229-33.
- Loesch, A. und Burnstock, G..**
(1995) Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell Tissue Res.* **279(3)**: 475-83.
- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H. R..**
(1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 307-12.
- Loscalzo, J..**
(2001) Inducible NO Synthesis in the Vasculature: Molecular Context Defines Physiological Response. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* **21**:1259-1260.

- Loskove, J. A. und Frishman, W. H. .**
(1995) Nitric oxide donors in the treatment of cardiovascular and pulmonary diseases. *Am Heart J* **129(3)**: 604-613.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P. und Waldman, S.A..**
(2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* **52(3)**: 375-414.
- MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N., et al.**
(1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* **81(4)**: 641-50.
- Marcondes, S., Cardoso, M.H., Morganti, R.P., Thomazzi, S.M., Lilla, S., Murad, F., De Nucci, G. und Antunes, E..**
(2006) Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103(9)**:3434-9.
- Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A., Bove, A.A., Isaac, L., Hrabie, J.A. und Keefer, L.K..**
(1991) Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem.* **34(11)**: 3242-7.
- Marletta, M.A..**
(1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* **268(17)**: 12231-4.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., et al.**
(1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* **189**: 1255-1264.
- Massberg, S., Gruner, S., Konrad, I., Garcia, Arguinzonis, M.I., Eigenthaler, M., Hemler, K., Kersting, J., Schulz, C., Muller, I., Besta, F., Nieswandt, B., Heinzmann, U., Walter, U. und Gawaz, M..**
(2004) Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood.* **103(1)**: 136-42.
- Mayer, B., John, M. und Böhme, E..**
(1990) Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS. Lett.* **277**: 215-9.
- Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L. und Kadowitz, P. J..**
(1981) Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**: 946-55.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. und Koesling, D..**
(2003) Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal.* **15(2)**:189-95.
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M. und Koesling, D..**
(2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J. Clin. Invest.* **116**: 1731-1737.
- Merril, C.R..**
(1990) Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* **182**: 477-88.

- Moncada, S. und Higgs, A..**
(1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* **329(27)**: 2002-12.
- Moncada, S. und Higgs, A..**
(1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9(13)**: 1319-30.
- Moncada, S. und Liew, F.Y..**
(1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* **375(6530)**: 408-11.
- Morishita, T., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Sabanai, K., Tasaki, H., Suda, O., Nakata, S., Tanimoto, A., Wang, K.Y., Ueta, Y., Sasaguri, Y., Nakashima, Y. und Yanagihara, N..**
(2005) Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(30)**: 10616-21.
- Morgenstern, E.**
(1997) Human platelet morphology/ultrastructure. In *Platelets and their Factors.* Herausgeber F. Bruchhausen und U. Walter. Springer-Verlag, Berlin, Deutschland. 27-60.
- Moro, M.A., Russel, R.J., Cellek, S., Lizasoain, I., Su, Y., Darley-USmar, V.M., Radomski, M.W. und Moncada, S..**
(1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(4)**: 1480-5.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H.K., Fishman, M.C. und Huang, P.L..**
(1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J. Clin. Invest.* **101**: 1225-1232.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A..**
(1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 33-50.
- Mülsch, A., Bauersachs, J., Schafer, A., Stasch, J.P., Kast, R. und Busse, R..**
(1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol.* **120(4)**: 681-9.
- Murad, F..**
(1994) Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Adv Pharmacol.* **26**: 1-5.
- Murad, F..**
(1996) Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* **276(14)**: 1189-92.
- Nakamura, T. und Gold, G.H..**
(1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature.* **325**: 442-444.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. und Nakano, T..**
(1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell. Signal.* **11**: 671-6.
- Nakane, M., Saheki, S., Kuno, T., Ishii, K. und Murad, F..**
(1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 1139-47.

- Nakane, M., Arai, K., Saheki, S., Kuno, T., Buechler, W. und Murad, F..**
(1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* **265**: 16841-5.
- Nathan, C.F. und Hibbs, J.B..**
(1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* **3**(1): 65-70.
- Nathan, C. und Xie, Q.W..**
(1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* **78**(6): 915-8.
- Nelson, R.J., Demas, G.E., Huang, P.L., Fishman, M.C., Dawson, V.L., Dawson, T.M. und Snyder, S.H..**
(1995) Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature.* **378**(6555): 383-6.
- Nguyen, B.L., Saitoh, M. und Ware, J.A..**
(1991) Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am J Physiol.* **261**(4):1043-52.
- Niethammer, M., Kim, E. und Sheng, M..**
(1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* **16**: 2157-2163.
- Nilius, B. und Droogmans, G..**
(2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* **81**(4): 1415-59.
- Offermanns, S..**
(2000) The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem.* **381**(5-6): 389-96.
- Otey, C.A., Pavalko, F.M. und Burridge, K..**
(1990) An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol.* **111**(2): 721-9.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. und Moncada, S..**
(1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-6.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. und Fassler, R..**
(1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* **274**: 2082-2086.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. und Hofmann, F..**
(1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* **17**: 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F..**
(1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 105-49.
- Poenie, M. und Tsien, R..**
(1986) Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging [Ca²⁺]_i in single cells. *Prog Clin Biol Res.* **210**: 53-6.

- Pryzwansky, K.B., Kidao, S., Wyatt, T.A., Reed, W. und Lincoln, T.M..**
(1995) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* **57(4)**: 670-8.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M. und Moncada, S..**
(1987) Endogenous nitric-oxide inhibits human-platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**: 1057-1058.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M. und Moncada, S..**
(1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* **148(3)**: 1482-9.
- Radomski, M.W., Vallance, P., Whitley, G., Foxwell, N. und Moncada, S..**
(1993) Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res.* **27(7)**: 1380-2.
- Rall, T.W. und Sutherland, E.W..**
(1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* **232(2)**: 1065-76.
- Reinhard, M., Jarchau, T. und Walter, U..**
(2001) Actin-based motility: Stopp and go with ENA/VASP proteins. *Trends Biochem Sci.* **26**: 243-9.
- Rink, T.J. und Sage, S.O..**
(1990) Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol.* **52**: 431-49.
- Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S. und Sessa W.C..**
(1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* **101**: 731-736.
- Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C. und Koesling, D..**
(1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J.* **335 (Pt 1)**: 125-30.
- Russwurm, M., Wittau, N. und Koesling, D..**
(2001) Guanylyl-Cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 Guanylyl-Cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* **276**: 44647-52.
- Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E. und Beavo, J.A..**
(2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* **93(4)**: 280-91.
- Saiki, R.K., Chang, C.A., Levenson, C.H., Warren, T.C., Boehm, C.D., Kazazian, H.H. und Erlich, H.A..**
(1988) Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med.* **319(9)**: 537-41.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T..**
(1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanders, K.M. und Ward, S.M..**
(1992) Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol.* **262(3 Pt 1)**: 379-92.

- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. und Hofmann, F..**
(2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* **87**: 825-30.
- Schini-Kerth, V.B..**
(1999) Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol.* **6(6)**: 355-63.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P.**
(2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**: 197-201.
- Schmidt, H.H. und Murad, F..**
(1991) Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* **181(3)**: 1372-7.
- Schmidt, H.H. und Walter, U..**
(1994) NO at work. *Cell.* **78(6)**: 919-25.
- Schmidt, P.M., Rothkegel, C., Wunder, F., Schroder, H. und Stasch, J.P..**
(2005) Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol.* **513(1-2)**: 67-74.
- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D. und Mayer, B..**
(1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive Guanylyl-Cyclase. *Mol. Pharmacol.* **50**: 1-5.
- Schultz, G., Böhme, E. und Munske, K..**
(1969) Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* **8(24)**: 1323-32.
- Schultz, G. und Böhme, E..**
(1984) Guanylate Cyclase. GTP pyrophosphatase-lyase (cyclizing), E.C.4.6.1.2. In: *Methods of enzymatic analysis IV* (ed. H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl). Verlag Chemie, Weinheim, New York, pp. 379-389.
- Shastry, B.S..**
(1994) More to learn from gene knockouts. *Mol Cell Biochem.* **136(2)**: 171-82.
- Shibuki, K. und Okada, D..**
(1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature.* **349(6307)**: 326-8.
- Sinha, S.C. und Sprang, S.R..**
(2006) Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **157**: 105-40.
- Sixma, J.J. und Wester, J..**
(1977) The hemostatic plug. *Semin Hematol.* **14(3)**: 265-99.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C..**
(1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150(1)**: 76-85.
- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. und Walter, U..**
(1998) Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **273**: 20029-35.

- Sogo, N, Magid K.S., Shaw, C.W., Webb, D.J. und Megson, I.L..**
(2000) Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of cGMP-independent mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**: 412-419.
- Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman M.C. und Kandel E.R..**
(1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell.* **87**: 1015-1023.
- Stasch, J.P., Becker, E.M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schroder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A. und Schramm, M..**
(2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* **410(6825)**: 212-5.
- Stasch, J.P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schroder, H., Stahl, E., Steinke, W. und Wunder, F..**
(2002) NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol.* **136(5)**: 773-83.
- Steiner, A.L., Wehmann, R.E., Parker, C.W. und Kipnis, D.M..**
(1972) Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* **2**: 51-61.
- Stone, J. R. und Marletta, M. A..**
(1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **33**: 5636-40.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. und Nathan, C.F..**
(1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(17)**: 7773-7.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M. und Mendelsohn, M. E..**
(1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science.* **286**: 1583-7.
- Sutherland, E.W. und Rall, T.W..**
(1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem.* **232(2)**: 1077-91.
- Tanaka, K. und Itoh, K..**
(1998) Reorganization of stress fiber-like structures in spreading platelets during surface activation. *J Struct Biol.* **124(1)**: 13-41.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J..**
(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76(9)**: 4350-4.
- Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM.**
(1999) Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ -ATPase-dependent refilling of Ca $^{2+}$ stores. *Circ Res.* **84(2)**: 201-9.

- Tsien, R.Y., Rink, T.J. und Poenie, M..**
(1985) Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*. **6(1-2)**: 145-57.
- Turko, I. V., Francis, S. H. und Corbin, J. D..**
(1998) Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem. J.* **329**: 505-10.
- Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H. und Corbin, J. D.**
(1999) Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol. Pharmacol.* **56**: 124-30.
- Vaandrager, A. B., Edixhoven, M., Bot, A. G., Kroos, M. A., Jarchau, T., Lohmann, S., Genieser, H. G. und de Jonge, H. R..**
(1997) Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *J. Biol. Chem.* **272**: 11816-23.
- Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Tilly, B. C., Houtsmuller, A. B., Ehlert, E. M., Bot, A. G., Edixhoven, M., Boomaars, W. E., Lohmann, S. M. und de Jonge, H. R..**
(1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1466-71.
- Wagner, C., Russwurm, M., Jager, R., Friebe, A. und Koesling, D..**
(2005) Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J Biol Chem.* **280(18)**: 17687-93.
- Waldman, S.A. und Murad, F..**
(1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* **39**: 163-196.
- Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J. und Reinhard, M..**
(1993) Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv. Exp. Med. Biol.* **344**: 237-49.
- Walter, U. und Gambaryan, S..**
(2004) Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood.* **104(8)**: 2609.
- Wang, J., Lu, S., Moenne-Loccoz, P. und Ortiz de Montellano, P.R..**
(2003) Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1. *J Biol Chem.* **278(4)**: 2341-7.
- Wanstall, J.C., Homer, K.L. und Doggrell, S.A..**
(2005) Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **3**: 41-53.
- Wedel, B., Humbert, P., Harteneck, C., Foerster, J., Malkewitz, J., Bohme, E., Schultz, G. und Koesling, D..**
(1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(7)**: 2592-6.
- Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. und Liew, F.Y..**
(1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375(6530)**: 408-11.

- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F. und Durner, J..**
(2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6(4)**:177-83.
- Wernet, W., Flockerzi, V. und Hofmann, F..**
(1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMPdependent protein kinase. *FEBS. Lett.* **251**: 191-6.
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Muller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. und Kaupp, U.B..**
(1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature.* **368(6474)**: 859-63.
- White, A.A. und Aurbach, G.D..**
(1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* **191(3)**: 686-97.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U.B. und Weyand, I..**
(1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol.* **142(2)**: 473-84.
- Wu, C.C., Ko, F.N., Kuo, S.C., Lee, F.Y. und Teng, C.M..**
(1995) YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol.* **116(3)**: 1973-8.
- Yau, K.W. und Nakatani, K..**
(1985) Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature.* **317**: 252-255.
- Yogo, K., Shimokawa, H., Funakoshi, H., Kandabashi, T., Miyata, K., Okamoto, S., Egashira, K., Huang, P., Akaike, T. und Takeshita, A..**
(2000) Different vasculoprotective roles of NO synthase isoforms in vascular lesion formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20(11)**: 96-100.
- Yuen, P. S., Potter, L. R. und Garbers, D. L..**
(1990) A new form of Guanylyl-Cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry.* **29**: 10872-8.
- Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K. und Kawai, C..**
(1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem.* **266(19)**: 12544-7.
- Zhang, P., Ohara, A., Mashimo, T., Sun, J., Shibuta, S., Takada, K., Kosaka, H., Terada, M. und Yoshiya, I..**
(1996) Cardiovascular effects of an ultra-short-acting nitric oxide-releasing compound, zwitterionic diamine/NO adduct, in dogs. *Circulation.* **94(9)**: 2235-40.
- Zhao, Y., Schelvis, J. P., Babcock, G. T. und Marletta, M. A..**
(1998) Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry.* **37**: 4502-9.
- Zhao, Y., Brandish, P.E., Di Valentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T. und Marletta, M.A..**
(2000) The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Biochemistry.* **39(35)**: 10848-54.

8. Eigene Publikationen

8.1. Originalarbeiten

Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M. und Koesling, D..
(2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J. Clin. Invest.* 116:1731-1737.

Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D..
(2007) Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(18): 7699-7704.

Dangel, O., Mergia, E., Koesling, D. und Friebe, A..
(2007) NO-sensitive guanylyl cyclase ist the only NO receptor mediating platelet inhibition. *Blood.* In Vorbereitung.

Lange, A., Dangel, O., Mullershausen, F., Koesling, D. und Friebe, A..
(2007) The new PDE2-specific inhibitor BAY60-7550 activates NO-sensitive guanylyl-cyclase. In Vorbereitung.

8.2. Kongressbeiträge

Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M. und Koesling, D..
(2005) Conditional inactivation of the NO-sensitive guanylyl cyclase isoforms ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) in mice. *cGMP-meeting, Potsdam Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371: 38 Suppl. 1.

Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D..
(2005) Gene inactivation of the β_1 subunit of the NO-sensitive guanylyl cyclase in mice. *cGMP-meeting, Potsdam Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371: 38 Suppl. 1.

Dangel, O., Mergia, E., Koesling, D. und Friebe, A..
(2006) Impaired NO-dependent function of platelets from mice deficient in NO-sensitive guanylyl cyclase. 47. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, 12.-14.03. 2006, Mainz. *Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372: 46 Suppl. 1.

Dangel, O., Koesling, D. und Friebe, A..
(2007) NO hemmt die Thrombozytenadhäsion und -aggregation in Mäusen ausschließlich über die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase. 48. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, 13.-15.03. 2007, Mainz. *Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* In Vorbereitung.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ich danke Frau Prof. Dr. Doris Koesling für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für die fachliche Unterstützung.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Hanns Hatt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn HD Dr. Andreas Friebe für seine fachliche Betreuung und Beratung dieser Arbeit sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmakologie und Toxikologie, die mir durch umfangreiche Hilfe bei den alltäglichen Problemen im Labor geholfen haben und für das angenehme Arbeitsklima. Mein besonderer Dank für die stets freundliche Unterstützung geht an Frau Ursula Krabbe, Frau Erika Mannheim, Herrn Fred Eichhorst und Herrn Arkadius Pacha.

Mein persönlicher Dank richtet sich an meine Eltern und meine Großmutter für die stetige Unterstützung und Ermöglichung meines Studiums. Außerdem danke ich meinen Freunden, die nie an mir gezweifelt haben und immer für mich da waren. Steffi, Anke, Alex und Chris danke ich für die Korrektur und kritische Durchsicht der Arbeit. Ronald und Dieter danke ich für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit und den hilfreichen Tipps rund um den PC.

Herrn Dr. Alexander Lange, Herrn Ronald Jäger und Herrn Dieter Groneberg danke ich für eine schöne gemeinsame Zeit, die wir gemeinsam während des Studiums und der Arbeit verbracht haben.

10. Lebenslauf

Name: Oliver Dangel
Geburtstag: 25. April 1978
Geburtsort: Herne
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Gustav Dangel
Ingrid Dangel, geb. Wespenhöfer

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule an der Michaelstrasse (Herne)
1988 – 1994 Realschule Crange (Herne)
1994 – 1997 Gymnasium-Wanne (Herne)
Juli 1997 Allgemeine Hochschulreife

1997 – 1998 Zivildienst

Hochschulstudium

1998 – 2003 Studium der Biologie
2002 – 2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum
2003 – 2007 Promotion in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe und dass es sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um fünf in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare handelt. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.