

# **Das GTPase-aktivierende Protein Oligophrenin-1 und seine Rolle in der Thrombozytenfunktion**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Anna Fotinos  
aus Tübingen

Tübingen  
2015

Tag der mündlichen Qualifikation:

11.05.15

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Meinrad Gawaz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thilo Stehle

Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen:

**Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften:**

**Fotinos A, Klier M, Gowert N S, Münzer P, Klatt C, Beck S, Borst O, Billuart P, Schaller M, Lang F, Gawaz M, Elvers M.**

(2014) Loss of Oligophrenin1 leads to uncontrolled Rho activation and increased thrombus formation in mice. J Thromb Haemost. Zur Veröffentlichung angenommen.

**Elvers M, Beck S, Fotinos A, Ziegler M, Gawaz M.**

(2012) The GRAF family member oligophrenin1 is a RhoGAP with BAR domain and regulates Rho GTPases in platelets. Cardiovasc Res. 94(3):526-36.

**Kongressbeiträge:**

78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, 2012, Mannheim

**Fotinos A, Elvers M, Beck S, Ziegler M, Gawaz M.**

The GRAF family member Oligophrenin-1 is a RhoGAP with BAR domain and regulates Rho GTPases in platelets.

80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, 2014, Mannheim

**Fotinos A, Gowert N S, Münzer P, Schönberger T, Klatt C, Beck B, Borst O, Billuart P, Schaller M, Lang F, Gawaz M, Elvers M.**

Loss of Oligophrenin1 leads to uncontrolled Rho activation and increased thrombus formation in mice.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1.</b>	<b>Thrombozyten – Funktion und Struktur</b> .....	<b>5</b>
3.1.1.	Plasmamembran.....	6
3.1.2.	Zytoskelett.....	6
3.1.3.	Speichergranula.....	7
3.1.4.	Intrazelluläre Membransysteme.....	8
3.1.5.	Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase.....	9
3.1.6.	Adhäsion und Aktivierung.....	9
<b>3.2.</b>	<b>Aggregation</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3.</b>	<b>Thrombozytäre Rezeptoren und Signaltransduktion</b> .....	<b>11</b>
3.3.1.	GP1b/V/IX-Komplex.....	12
3.3.2.	Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3.....	12
3.3.3.	GPVI-Rezeptor.....	13
3.3.4.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	13
<b>3.4.</b>	<b>Rho-GTPasen und ihre Rolle bei der Zytoskelettdynamik</b> .....	<b>15</b>
3.4.1.	RhoA.....	17
3.4.2.	Cdc42.....	17
3.4.3.	Rac1.....	18
<b>3.5.</b>	<b>Rho-GTPase-aktivierende Proteine (RhoGAPs)</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6.</b>	<b>Oligophrenin-1</b> .....	<b>20</b>
<b>3.7.</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1.</b>	<b>Material</b> .....	<b>24</b>
4.1.1.	Geräte, Verbrauchsmaterial und Software.....	24
4.1.2.	Reagenzien und Lösungen.....	26
4.1.3.	Vektoren und Primer.....	30
4.1.4.	Enzyme und Antikörper.....	31
4.1.5.	A5-CHO-Zellen.....	32
4.1.6.	<i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Maus.....	33
<b>4.2.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>33</b>
4.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	33
4.2.1.1.	Klonierungsstrategien.....	33
4.2.1.2.	RNA-Extraktion aus murinen Plättchen.....	34
4.2.1.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösungen.....	34
4.2.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
4.2.1.5.	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	35
4.2.1.6.	DNA-Isolierung und -Aufreinigung aus Agarose-Gelen und DNA-Lösungen.....	35
4.2.1.7.	Restriktionsverdau.....	36

4.2.1.8.	Ligation.....	36
4.2.1.9.	Synthese komplementärer DNA durch reverse Transkription .....	36
4.2.1.10.	Ortsspezifische Mutagenese .....	37
4.2.1.11.	Transformation kompetenter Bakterien (durch Hitzeschock).....	38
4.2.1.12.	Präparation von Plasmid-DNA.....	38
4.2.1.13.	Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseohren .....	39
4.2.1.14.	Sequenzierung .....	39
4.2.2.	Zellbiologische Methoden .....	39
4.2.2.1.	Kultivierung von A5-CHO-Zellen.....	39
4.2.2.2.	Transiente Transfektion von A5-CHO-Zellen .....	39
4.2.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	40
4.2.3.1.	Zelllyse.....	40
4.2.3.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	40
4.2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
4.2.3.4.	Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	41
4.2.3.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	41
4.2.3.6.	Immunpräzipitation .....	42
4.2.3.7.	Untersuchung der Rho-GTPasen-Aktivität (G-LISA®) .....	42
4.2.4.	Funktionelle Untersuchung von murinen Thrombozyten und A5-CHO-Zellen .....	43
4.2.4.1.	Blutentnahme aus der Maus.....	43
4.2.4.2.	Bestimmung der Thrombozytenkonzentration.....	43
4.2.4.3.	Isolierung und Aufreinigung von Thrombozyten.....	43
4.2.4.4.	Durchflusszytometrie.....	43
4.2.4.5.	Untersuchung der Adhäsion und <i>Spreading</i> -Dynamik von murinen Thrombozyten und A5-CHO-Zellen .....	44
4.2.4.6.	Untersuchung der ATP-Freisetzung .....	45
4.2.4.7.	Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten.....	45
4.2.4.8.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	46
4.2.4.9.	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	46
4.2.4.10.	Untersuchung der Thrombusbildung.....	47
4.2.5.	Bestimmung der Schwanzblutungszeit OPHN1-defizienter Mäuse .....	47
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.</b>	<b>Lokalisation von OPHN1 in Thrombozyten .....</b>	<b>48</b>
5.1.1.	OPHN1 ist in Thrombozyten am Zytoskelett lokalisiert.....	48
5.1.2.	OPHN1 interagiert in Thrombozyten mit GP1b $\alpha$ .....	48
<b>5.2.</b>	<b>Charakterisierung der <i>ophn1</i><sup>-/-</sup>-Thrombozyten.....</b>	<b>49</b>
5.2.1.	Zucht und Haltung der <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	49
5.2.2.	Nachweis des OPHN1-Gen- <i>Knockouts</i> auf DNA- und Protein-Ebene.....	49
5.2.3.	Bestimmung der Thrombozytenzahl und des Thrombozytenvolumens .....	50
5.2.4.	Morphologische Charakterisierung der <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten.....	51
5.2.5.	Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten.....	52
5.2.6.	<i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine erhöhte Zytoskelettdynamik auf.....	53
5.2.7.	<i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine normale Verteilung der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 auf .....	57
5.2.8.	OPHN1-Defizienz führt zu verstärkter Thrombozytenaktivierung .....	58
5.2.9.	<i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine normale Aggregation auf .....	60
5.2.10.	Vollblut aus <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen weist unter niedrigen Scherraten eine verstärkte Thrombusbildung auf Kollagen auf .....	61
5.2.11.	<i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse haben eine verkürzte Blutungszeit .....	62
5.2.12.	Die Tyrosin-Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 ist in den <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten nach Stimulation mit CRP verstärkt.....	62
<b>5.3.</b>	<b>Regulation von OPHN1 .....</b>	<b>64</b>

5.3.1.	OPHN1 wird in Thrombozyten durch Aktivierung phosphoryliert.....	64
5.3.2.	OPHN1 interagiert mit der Tyrosinkinase Src in Thrombozyten .....	64
5.3.3.	OPHN1 wird nach Src-Überexpression phosphoryliert.....	65
5.3.4.	Die Phosphorylierung von OPHN1 wird in Thrombozyten durch den Src-Inhibitor PP2 blockiert.....	66
5.3.5.	Herstellung von OPHN1-Konstrukten mit deletierten Tyrosinphosphorylierungsstellen.....	67
5.3.6.	OPHN1 wird hauptsächlich an Tyrosin 370 phosphoryliert.....	68
5.3.7.	Einfluss der Mutation von Tyrosin 370 auf die GAP-Aktivität von OPHN1 .....	68
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1.</b>	<b>OPHN1 ist in Thrombozyten am Zytoskelett lokalisiert.....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.</b>	<b>Analyse der Rolle von OPHN1 in Thrombozyten mithilfe von <i>ophn1</i><sup>-/-</sup>-Mäusen .....</b>	<b>73</b>
6.2.1.	<i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	73
6.2.2.	OPHN1 hemmt RhoA, Rac1 und Cdc42 und beeinflusst die Formumwandlung von Thrombozyten.....	74
6.2.3.	OPHN1 beeinflusst Prozesse der Thrombozytenaktivierung.....	75
6.2.4.	Eine OPHN1-Defizienz führt zu einer verstärkten Thrombusbildung und einer verkürzten Blutungszeit.....	76
6.2.5.	OPHN1 im ITAM-abhängigen GPVI-Signalweg .....	76
6.2.6.	Vergleich - OPHN1 in humanen Thrombozyten .....	77
<b>6.3.</b>	<b>Regulierung von OPHN1 durch Phosphorylierung .....</b>	<b>78</b>
6.3.1.	Tyrosinphosphorylierung von OPHN1 durch Src.....	78
6.3.2.	Die Phosphorylierung von Tyrosin 370 beeinflusst die Aktivität von OPHN1.....	80
<b>6.4.</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>Akademischer Lebenslauf.....</b>	<b>91</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>92</b>
10.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	92
10.2.	Buchstaben-Code der Aminosäuren .....	95
10.3.	Abbildungsverzeichnis.....	96
10.4.	Tabellenverzeichnis.....	98
10.5.	PCR-Protokolle .....	99
10.6.	DNA-Sequenzen.....	102

# 1. Zusammenfassung

Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle in der Hämostase, indem sie bei Verletzungen der Gefäßwand an diese adhären und durch Aggregatbildung zum Wundverschluss beitragen. Thrombozyten sind aber auch an der Pathogenese von akuten ischämischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall beteiligt. Der gegenwärtige Einsatz antithrombotischer Substanzen verhindert die ungewollte Thrombusbildung, ist jedoch limitiert durch ein erhöhtes Blutungsrisiko. Die Entwicklung neuer antithrombotischer Medikamente mit einer größeren therapeutischen Sicherheit setzt eine genauere Kenntnis der molekularen Mechanismen der Thrombozytenfunktion voraus.

Mit diesem Ziel wurde in der vorliegenden Arbeit das RhoGAP-Protein Oligophrenin-1 (OPHN1) und seine Rolle in der Thrombozytenfunktion untersucht. RhoGAPs (*GTPase-activating proteins*) stimulieren die Hydrolyse von GTP zu GDP der Rho-GTPasen und inhibieren sie dadurch. In Thrombozyten sind die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 an den Umbildungsprozessen des Zytoskeletts während der Aktivierung beteiligt, indem sie u.a. die Aktinpolymerisierung und die Bildung von Zellausläufern beeinflussen. Wenig ist darüber bekannt, wie diese Rho-GTPasen in Thrombozyten reguliert werden. Auch die Funktion von OPHN1 in Thrombozyten ist noch unklar.

Mithilfe von OPHN1-defizienten Mäusen konnte hier gezeigt werden, dass das Fehlen von OPHN1 zu einer drastisch gesteigerten Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in ruhenden als auch in aktivierten Thrombozyten führt. OPHN1 ist demnach ein negativer Regulator dieser drei Rho-GTPasen in Thrombozyten. Die beobachtete veränderte Zytoskelettdynamik in Form einer gesteigerten Adhäsion und einer ausgeprägten Lamellipodienbildung der *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten bei *Spreading*-Experimenten auf Fibrinogen lässt sich durch die hohe Aktivität der Rho-GTPasen erklären. Dabei deutet die verstärkte Lamellipodienbildung darauf hin, dass OPHN1 insbesondere die Aktivität von Rac1 beeinflusst.

Das Fehlen von OPHN1 bewirkte außerdem eine verstärkte Aktivierungsreaktion der Thrombozyten, die sich durch eine gesteigerte Sekretion der alpha- und elektronendichten Granula sowie durch eine erhöhte Fibrinogen-Bindung von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  äußerte. Besonders stark reagierten die *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten auf eine Stimulation des Rezeptors GPVI. Dies lässt darauf schließen, dass OPHN1 in die GPVI-vermittelte Signaltransduktion eingreift. Diese These wurde durch die verstärkte Phosphorylierung

von PLC $\gamma$ 2, einer finalen Reaktion im GPVI-Signalweg, in den OPHN1-defizienten Thrombozyten unterstützt.

Der aktivatorische Effekt durch OPHN1-Defizienz manifestierte sich auch in einer verstärkten Thrombusbildung unter niedrigen Scherraten sowie *in vivo* in einer verkürzten Blutungszeit der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Diese Ergebnisse belegen, dass OPHN1 ein wesentlicher Faktor bei der zytoskeletalen Reorganisation und bei der Aktivierung in murinen Thrombozyten ist.

Um weiterhin die Regulierung von OPHN1 selbst zu klären, wurde die Tyrosinphosphorylierung als potentieller Aktivierungsmechanismus von OPHN1 sowie die Proteinkinase Src als möglicher Regulator untersucht. Dabei ergab sich, dass im Laufe einer Aktivierung der Phosphorylierungsgrad von OPHN1 in murinen Thrombozyten ansteigt. Gleichzeitig nahm die Interaktion zwischen OPHN1 und Src zu. In Überexpressionsstudien mit A5-CHO-Zellen konnte eine Src-vermittelte Phosphorylierung von OPHN1 bestätigt werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Thrombozyten zu einer Src-vermittelten Phosphorylierung von OPHN1 führt.

Mithilfe von OPHN1-Mutanten, bei denen die Tyrosinphosphorylierungsstellen entfernt worden waren, konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung hauptsächlich am Tyrosin 370 zwischen der PH- und der GAP-Domäne stattfindet. WT-OPHN1 verursachte nach der Transfektion in A5-CHO-Zellen einen Adhäsionsdefekt sowie eine reduzierte Pseudopodienbildung. Diese Effekte traten bei der OPHN1-Mutante Y370A, die nicht an Tyrosin 370 phosphoryliert werden kann, in verminderter Form oder gar nicht auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung ein regulierender Faktor für die Aktivität des RhoGAP-Proteins OPHN1 ist.



## 2. Summary

Platelets play a fundamental role in hemostasis. They adhere and aggregate at sites of vascular injury which leads to wound closure. On the other hand platelets are involved in the pathogenesis of acute ischaemic events as myocardial infarction or stroke. At present the use of antithrombotic drugs provides clinical benefit, but is limited by an increased bleeding risk. The development of new antithrombotic drugs with a higher therapeutic safety requires a better understanding of the molecular mechanisms of platelet function.

For that reason the RhoGAP Oligophrenin-1 (OPHN1) and its role in platelet function was investigated in the present study. RhoGAPs (GTPase-activating proteins) stimulate the hydrolysis from GTP to GDP of Rho GTPases and thus cause their inhibition. The Rho GTPases RhoA, Cdc42 und Rac1 are involved in the reorganisation of the cytoskeleton of platelets during activation by regulating actin polymerisation und the formation of cell protrusions. Little is known about how Rho GTPases are regulated in platelets. Also the function of OPHN1 in platelets is yet unclear.

By examining OPHN1-deficient mice it was shown that the loss of OPHN1 leads to a drastically increased activity of the Rho GTPases RhoA, Cdc42 und Rac1 in resting as well as in activated platelets. OPHN1 is thus a negative regulator of these three Rho GTPases in platelets. The observed changed cytoskeleton dynamics in the form of an increased adhesion and a pronounced lamellipodia formation of the *ophn1*<sup>-/-</sup> platelets in spreading experiments on fibrinogen can be explained by the high activity of the Rho GTPases. The enhanced lamellipodia formation suggests that OPHN1 specifically regulates Rac1.

Furthermore, the loss of OPHN1 led to an enhanced platelet activation which could be seen in an increased secretion of alpha- and dense granules as well as an increased fibrinogen binding of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. A particularly strong activation of the *ophn1*<sup>-/-</sup> platelets arose when the receptor GPVI was stimulated. This indicates that OPHN1 acts on the GPVI-mediated signal transduction. This hypothesis was supported by an enhanced phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, a final step in the GPVI signaling pathway, in the OPHN1-deficient platelets.

The platelet activating effect of OPHN1-deficiency led to an enhanced thrombus formation under low shear rates as well as *in vivo* to a shortened bleeding time of *ophn1*<sup>-/-</sup> mice.

These results confirm that OPHN1 is an essential factor for cytoskeletal reorganisation and activation in murine platelets.

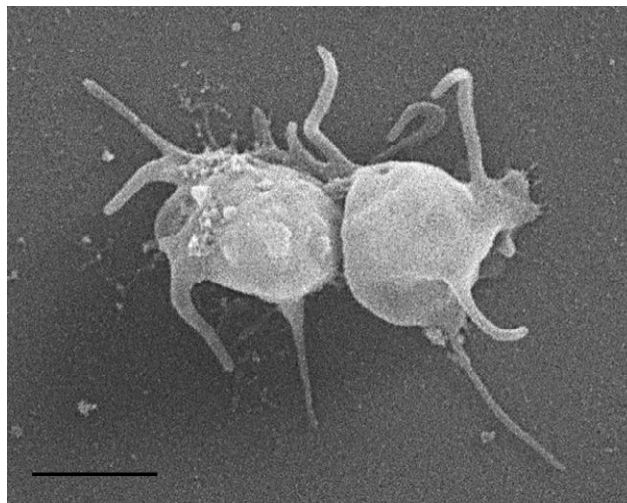
In order to investigate how OPHN1 itself is regulated, tyrosine phosphorylation as a potential mechanism of activation of OPHN1 and the protein kinase Src as a possible regulator were explored. These studies revealed that in the course of activation the degree of phosphorylation of OPHN1 increases. Simultaneously, the interaction of OPHN1 and Src augmented. In overexpression studies with A5-CHO cells a Src-mediated phosphorylation of OPHN1 could be confirmed. These findings give rise to the assumption that the activation of platelets leads to a Src-mediated phosphorylation of OPHN1.

With the aid of OPHN1 mutants, in which the tyrosine phosphorylation sites were deleted, it could be shown that the phosphorylation mainly occurs at tyrosine 370 between the PH- and the GAP-domain. WT-OPHN1 caused an adhesion defect and reduced pseudopodia formation after transfection in A5-CHO cells. These effects did not or only to a minor extent occur with the OPHN1 mutant Y370A that could not be phosphorylated at tyrosine 370. These results indicate that the phosphorylation is a regulating factor for the activity of the RhoGAP OPHN1.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Thrombozyten – Funktion und Struktur

Thrombozyten (Blutplättchen) sind mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  und einem Zellvolumen von 7,5-10 fl (human; murine Thrombozyten ca. 4,7 fl) die kleinsten zellulären Elemente des zirkulierenden Blutes (Gawaz, 1999; Jirouskova, Shet und Johnson, 2007). Eine ihrer zentralen Aufgaben ist die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität. Bei Verletzungen der Gefäßwand adhären sie an das freiliegende Subendothel, was zu ihrer Aktivierung und Akkumulation (Aggregation) führt. Diese Prozesse leiten die Ausbildung eines hämostatischen Pfropfes und somit die Blutstillung ein (Watson und Harrison, 2010). Thrombozyten sind anukleäre Zellen, weisen also keinen Zellkern auf und sind deshalb nur in begrenztem Umfang mittels mRNA aus den Vorläuferzellen zur Proteinbiosynthese fähig (Flaumenhaft, 2011). Thrombozyten entstehen durch Abschnürung langer Zellfortsätze (Proplättchen) aus den polyploiden Megakaryozyten, die sich im Knochenmark befinden. Bei diesem Prozess kann ein einzelner Megakaryozyt ca.  $10^3$  Thrombozyten generieren. Pro Tag werden dadurch etwa  $10^{11}$  Thrombozyten gebildet, was einer täglichen Erneuerungsrate von 20% der Gesamtblut-Thrombozytenzahl entspricht (Hartwig und Italiano, 2003; Gawaz, 1999). Die physiologische Thrombozytenzahl im Blut beträgt beim Menschen  $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ , bei der Maus  $1,1 \times 10^6/\mu\text{l}$  (Watson und Harrison, 2010; Jirouskova, Shet und Johnson, 2007).



**Abbildung 3-1: Thrombozyten (murin) im aktivierten Zustand. Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 1  $\mu\text{m}$  (Rasterelektronenmikroskop, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Oliver Betz).**

Normalerweise wird etwa ein Drittel aller Thrombozyten in der Milz gespeichert und steht in kontinuierlichem Austausch mit dem zirkulierenden Kompartiment (Kehrel, 2008).

Humane Thrombozyten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von bis zu 10 Tagen, bevor sie im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz abgebaut werden; die Lebensdauer muriner Thrombozyten beträgt 5 Tage (Josefsson *et al.*, 2013).

### 3.1.1. Plasmamembran

Im ruhenden Zustand weisen Thrombozyten eine diskoide Form auf. Die Aktivierung führt zu einer drastischen Formveränderung, bei der der Thrombozyt eine sphärische Form annimmt und Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien) ausbildet. Dies hat eine Vergrößerung der Oberfläche von bis zu 420% zur Folge (White, 2013). Die Plasmamembran ist eine klassische Lipiddoppelschicht mit einer geordneten Verteilung der Membranphospholipide, deren Zusammensetzung sich nach Stimulation des Thrombozyten durch „*Transbilayer*-Bewegungen“ verändert. In die Membran ist eine Vielzahl von Glykoproteinen eingebettet. Einige von ihnen sind Rezeptoren für physiologische Agonisten (ADP, Thromboxan (TxA<sub>2</sub>), Thrombin), die Veränderungen des vaskulären Kompartiments erfassen und ins Zellinnere weitergeben. Andere Glykoproteine vermitteln die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel oder an andere Zellen (Morgenstern, 1999).

### 3.1.2. Zytoskelett

Das thrombozytäre Zytoskelett hat hauptsächlich die Funktion, die Morphologie des Thrombozyten zu gestalten. Im Ruhezustand hält es die diskoide Form aufrecht, im Laufe des Aktivierungsprozesses ist es aktiv an Prozessen der Formveränderung beteiligt (Hartwig, 2013). Außerdem dient es als Matrix, um Signalmoleküle in spezifischen Kompartimenten zu lokalisieren, bis sie bei einer Aktivierung an ihren Wirkungsort rekrutiert werden (Fox, 2001). Weiterhin schützt es gegen die Fusion von sekretorischen Organellen mit der Plasmamembran und stellt somit eine Exozytosebarriere dar (Morgenstern, 1999).

Das Zytoskelett besteht hauptsächlich aus Aktin (15-20% der Gesamtproteinmasse) und Tubulin sowie mit diesen assoziierten Proteinen (Gawaz, 1999; Hartwig, 2013). Im nicht-aktivierten Thrombozyten verlaufen zirkuläre Mikrotubuli-Bündel unterhalb der Membran entlang des diskoiden Perimeters. Der zytoplasmatische Raum ist von einem rigiden Netzwerk von Aktinfilamenten ausgefüllt (Hartwig, 2013; Morgenstern, 1999). Die Aktinfilamente sind über das Zytoskelettprotein Filamin mit dem Glykoprotein 1b (GP1b) der Plasmamembran verbunden, was letzterer Stabilität verleiht (Kehrel, 2008).

Im aktivierten Zustand werden diese Verbindungen durch eine Protease (Calpain) gespalten, so dass sich der Thrombozyt abrundet (Kehrel, 2008). Zudem wird durch die

Aktivierung eine Reorganisation des Zytoskelets initiiert. Es werden neue Aktinfilamente gebildet, so dass der Anteil des polymerisierten Aktins von etwa 40% auf das Doppelte ansteigt (Barkalow *et al.*, 1996). Durch Assoziation mit Myosin entstehen kontraktile Filamente (Stressfasern), die den peripheren Mikrotubuli-Ring abschnüren und zusammen mit den thrombozytären Speichergranula (s. Abschnitt 3.1.3) in das Zentrum des aktivierten Thrombozyten drängen. Dort erfolgt die Freisetzung der granulären Inhaltstoffe über das offene kanalikuläre System (White, 2013; s. Abschnitt 3.1.4). Durch Bündelung von Aktinfilamenten entstehen lange, schmale, Filopodien genannte Membranausläufer. Im weiteren Verlauf der Aktivierung wird durch die fortlaufende Reorganisation von Aktinfilamenten auch der freie Raum zwischen den Filopodien durch flache Ausläufer, den Lamellipodien, aufgefüllt (Barkalow *et al.*, 1996). Dieser Prozess der Pseudopodienbildung und der Ausbreitung von Thrombozyten auf Oberflächen wird als *Spreading* bezeichnet (s. Abbildung 3-2). Eine kritische, regulatorische Rolle bei diesen Prozessen der zytoskeletalen Reorganisation spielen die Mitglieder der Proteinfamilie der Rho-GTPasen, darunter vor allem RhoA, Rac1 und Cdc42 (Fox, 2001; s. Abschnitt 3.4).



**Abbildung 3-2: Aktivierungs-bedingte Ausbildung von Stressfasern (links), Filopodien (Mitte) und Lamellipodien (rechts) bei Thrombozyten (murin; Lichtmikroskop, DIC, eigene Aufnahme).**

### 3.1.3. Speichergranula

Wie andere eukaryotische Zellen enthält das Zytoplasma von Thrombozyten Organellen wie Mitochondrien, Speichergranula und Lysosomen. Die Speichergranula werden in alpha-Granula und elektronendichte Granula ( $\delta$ -Granula) unterteilt (s. Abbildung 3-3). Sie enthalten Proteine und weitere für die Thrombozytenfunktion essentielle Substanzen (White, 2013). Die  $\alpha$ -Granula, die etwa 10% des Thrombozytenvolumens ausmachen (50-80 Granula pro Thrombozyt), enthalten ein breites Spektrum an Proteinen, die nach ihrer Freisetzung an einer Vielzahl von Reaktionen des Thrombozyten beteiligt sind. Dazu zählen Fibrinogen und der von-Willebrand-Faktor (vWF), die die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten vermitteln, außerdem Gerinnungsfaktoren und Faktoren der Fibrinolyse, z.B. Plasminogen (Morgenstern, 1999). Viele dieser Proteine werden *de*

*novo* in Megakaryozyten produziert (vWF), während andere Proteine, wie z.B. Fibrinogen über Rezeptor-vermittelte Endozytose aus dem umgebenden Blutplasma aufgenommen werden (Watson und Harrison, 2010).

Die elektronendichten Granula sind kleiner als  $\alpha$ -Granula und mit 5-9 Granula pro Thrombozyt weniger häufig (Watson und Harrison, 2010). Die Elektronendichte wird auf Kalzium- und Magnesium-Ionen sowie anorganisches Phosphat zurückgeführt. Sie enthalten eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen wie ADP, ATP, Serotonin und  $\text{Ca}^{2+}$ , die die Aktivierung des Thrombozyten fördern (Morgenstern, 1999).



**Abbildung 3-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ruhenden Thrombozyten (murin) zur Darstellung der Speichergranula und des offenen kanalikulären Systems (OCS) (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Martin Schaller).**

### 3.1.4. Intrazelluläre Membransysteme

Neben den Zellorganellen und dem Zytoskelett befindet sich im Zytosol ein für Thrombozyten charakteristisches Membransystem, das offene kanalikuläre System (*open canicular system*, OCS), das aus verzweigten Kanälen besteht, die mit der Plasmamembran verbunden und durch Porenöffnungen vom Extrazellulärraum aus zugänglich sind (s. Abbildung 3-3). Das OCS dient zum einen als Transportweg für die Aufnahme von Produkten aus dem Blutplasma in die Speicherorganellen zum anderen zur Freisetzung dieser Inhaltsstoffe nach der Aktivierung des Thrombozyten (White, 2013). Zudem stellt das OCS ein Membranreservoir dar. Im Laufe der Aktivierung wird es in die Plasmamembran integriert und führt so zur Oberflächenvergrößerung und zum Formwandel des Thrombozyten (Morgenstern, 1999).

Neben dem offenen Kanalsystem existiert in Thrombozyten noch ein geschlossenes Membransystem, das dichte tubuläre System (*dense tubular system*, DTS), das ein

Abkömmling des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten ist. Es ist der Hauptspeicherort für Kalzium-Ionen und spielt dadurch eine zentrale regulative Rolle bei der Thrombozytenaktivierung, in deren Verlauf Kalzium als Antwort auf den sekundären Botenstoff Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) in das Zytosol freigesetzt wird (Gawaz, 1999; Watson und Harrison, 2010). Zudem werden im DTS ausgehend von Arachidonsäure die für die Thrombozytenfunktion wichtigen Signalstoffe Prostaglandin und Thromboxan gebildet (Gerrard *et al.*, 1976).

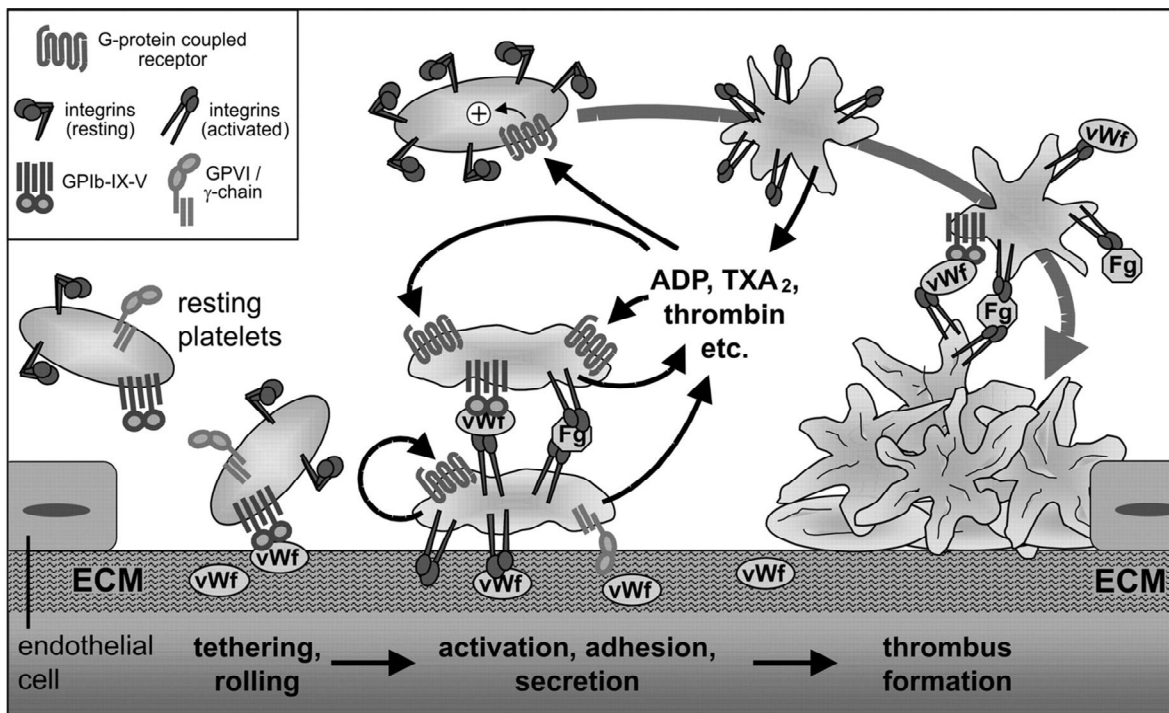
### **3.1.5. Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase**

Im ihrem Ruhezustand zirkulieren Thrombozyten im geschlossenen Blutgefäßsystem, ohne dass es zu einer Interaktion mit der Gefäßwand kommt. Bei Verletzung des Endothels und durch Freilegung von thrombogenen Komponenten des Subendothels werden Thrombozyten aus dem zirkulierenden Blut angelockt und bilden zusammen mit löslichen Plasmakomponenten einen hämostatischen Pfopf (Thrombus). Dieser dichtet die Gefäßwand ab, so dass eine Blutung innerhalb von wenigen Minuten zum Stillstand kommt. Die Hämostase lässt sich in zwei Phasen einteilen - die primäre und die sekundäre Hämostase. Während der primären Hämostase adhären die Thrombozyten über Glykoproteine an ihrer Zelloberfläche an die Gefäßwandläsion und werden dadurch aktiviert. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von Signalmolekülen, die zusammen mit lokal im Plasma generiertem Thrombin die Anlagerung weiterer Thrombozyten aus dem Blutstrom (Aggregation) zur Folge hat. Es entsteht ein primärer Thrombus, der die Blutung zwar vorübergehend stillt, jedoch fragil ist und sich leicht von der Gefäßwand lösen kann. Erst in der sekundären Hämostase verfestigt sich das Aggregat durch Bildung eines Fasernetzes aus Fibrin, in das die Thrombozyten sowie auch Erythrozyten eingebettet sind, zum sekundären hämostatischen Thrombus. Im Rahmen der Heilungsphase erfolgt der Abbau des Fibringerüsts durch die Fibrinolyse (Gawaz, 1999; Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008).

### **3.1.6. Adhäsion und Aktivierung**

Der initiale Kontakt der Thrombozyten mit der Gefäßwand findet durch die Bindung des thrombozytären Rezeptorkomplexes Glykoprotein-1b/V/IX an den von-Willebrand-Faktor (vWF) statt, der auf der subendothelialen Oberfläche mit dem Bindegewebsprotein Kollagen assoziiert ist (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008; s. Abbildung 3-4). Diese Interaktion ist einerseits durch eine hohe Affinität charakterisiert, die selbst unter hohen, arteriellen Scherkräften eine schnelle Kontaktaufnahme zwischen Thrombozyt und Endothel ermöglicht (Gawaz, 1999). Andererseits ist sie aufgrund einer hohen

Dissoziationsrate instabil und reversibel. Eine stabile Adhäsion wird erst durch zusätzliche Bindungen von membranständigen Rezeptoren der Thrombozyten, hauptsächlich Integrine, sichergestellt (Reininger, 2007). Durch die kurze Bindung an vWF werden die Thrombozyten gebremst, so dass sie in einer rollenden Bewegung über die Gefäßwand gleiten. Dies ermöglicht es dem Rezeptor GPVI, direkt an Kollagenfasern des Subendothels zu binden, die im Gegensatz zu vWF hoch-thrombogen sind und so zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten führen (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008).



**Abbildung 3-4: Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten im Bereich einer Gefäßwandsverletzung.**

Der initiale Kontakt entsteht über die Interaktion zwischen dem GPIb/IX-Komplex und vWF im Subendothel. Im Anschluss erfolgt die Stabilisierung der Adhäsion sowie die Aktivierung der Thrombozyten über die Bindung von GPVI an Kollagen. Dies bewirkt die Aktivierung von Integrin αIIbβ3 und die Freisetzung von Mediatoren, die weitere Thrombozyten aus dem Blutstrom rekrutieren und die Aktivierung fördern. Es entsteht ein Thrombus, der die Läsion abdichtet (ECM = extrazelluläre Matrix, Fg = Fibrinogen). Abbildung aus Offermanns, 2006

Die Aktivierung setzt zahlreiche intrazelluläre Prozesse in Gang. Diese führen u.a. zu einer Konformationsänderung von Integrinrezeptoren (*inside-out* Signalübertragung), wodurch sie in einen Zustand von hoher Affinität für Liganden versetzt werden (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008). Von besonderer Bedeutung sind dabei die Integrin-Rezeptoren αIIbβ3 und α2β1, die jeweils an vWF und Kollagen binden und dadurch für eine stabile Adhäsion sorgen (Watson und Harrison, 2010). Zudem löst vor allem die Ligandenbindung an αIIbβ3 über eine sogenannte *outside-in* Signalübertragung weitere



Aktivierungskaskaden im Inneren des Thrombozyten aus (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008). Die Aktivierung geht mit der oben beschriebenen Formveränderung einher, bei der die Thrombozyten durch Vergrößerung der Oberfläche die Adhäsion verstärken und eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion ermöglichen (Gawaz, 1999).

### 3.2. Aggregation

Als Aggregation wird das Zusammenlagern von zwei oder mehreren Thrombozyten bezeichnet. Nach Bildung einer ersten Monoschicht von Thrombozyten am verletzten Endothel müssen weitere Thrombozyten aus dem zirkulierenden Blut rekrutiert werden. Dies geschieht über lokal akkumulierende Mediatoren, die, ausgelöst durch die initiale Adhäsion und Aktivierung, produziert oder sekretiert werden (Offermanns, 2006). So wird ADP aus den elektronendichten Speichergranula freigesetzt, während Thromboxan ( $\text{TxA}_2$ ) im Thrombozyten *de novo* synthetisiert wird (Watson und Harrison, 2010). Zudem wird Thrombin, das im Plasma in seiner inaktiven Form als Prothrombin vorliegt, durch den katalytischen Prothrombinase-Komplex an der Außenseite der Zellmembran des aktivierten Thrombozyten gebildet (Tracy und Mann, 1983).

ADP,  $\text{TxA}_2$  und Thrombin bewirken eine Amplifikation der Aktivierung, indem sie als sekundäre Botenstoffe auf autokrine sowie parakrine Weise ihre eigene Bildung und Freisetzung über eine positive Rückkopplung fördern. Dies gewährleistet eine schnelle Aktivierung und Akkumulation von weiteren Thrombozyten zu einem wachsenden Thrombus, der die Endothelläsion gegenüber dem Blutstrom abdichtet (Offermanns, 2006).  $\text{TxA}_2$  wirkt zudem vasokonstriktorisch und begünstigt durch eine Reduzierung des Blutstroms die Thrombusbildung (Gawaz, 1999).

Für die Aggregation ist der Rezeptor  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrin von zentraler Bedeutung, da er über Fibrinogen-Brücken die Thrombozyten miteinander verbindet.

Die Konsolidierung des Thrombus erfolgt während der sekundären Hämostase durch die Thrombin-vermittelte Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin (Kehrel, 2008).

### 3.3. Thrombozytäre Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Zellmembran des Thrombozyten bietet ein breites Spektrum an transmembranären Rezeptoren, die essentiell für die physiologische Thrombusbildung sind, darunter viele Integrine (u. a.  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ), Leucin-reiche (*leucine-rich repeated*, LRR)-Rezeptoren (z.B. GP1b/IX/V), heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) und Rezeptoren, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören (z.B.

GPVI) (Rivera *et al.*, 2009; s. Abbildung 3-5). Tabelle 3-1 zeigt eine Auswahl der Hauptrezeptoren und ihrer Agonisten.

**Tabelle 3-1: Thrombozytäre Rezeptoren und ihre Liganden (nach Jurk und Kehrel, 2005)**

<b>Funktion</b>	<b>Agonist/Ligand</b>	<b>Rezeptor</b>
Initiale und stabile Adhäsion	vWF	GP1b/V/IX
	Kollagen	GPVI, $\alpha 2\beta 1$
	Fibrinogen	$\alpha IIb\beta 3$
	Fibronectin	$\alpha 5\beta 1$
	Laminin	$\alpha 6\beta 1$
Aktivierung und Amplifikation	Thrombin	PAR1, PAR4
	ADP	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub>
	TxA <sub>2</sub>	TP $\alpha$ , TP $\beta$
Aggregation	Fibrin	Aktiviertes $\alpha IIb\beta 3$
	vWF	Aktiviertes $\alpha IIb\beta 3$ , GP1b/V/IX

### 3.3.1. GP1b/V/IX-Komplex

Mit 50.000 Exemplaren pro Thrombozyt ist der vWF-Rezeptor GP1b/V/IX nach  $\alpha IIb\beta 3$  der zweithäufigste Thrombozytenrezeptor (Clemetson und Clemetson, 2013). Er wird ausschließlich in Thrombozyten exprimiert und besteht aus vier Transmembranproteinen. Er ist, insbesondere unter hohen Scherkräften, essentiell für die initiale Interaktion der Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand. Ein Mangel oder eine Dysfunktion von GP1b/V/IX ist die Ursache für das Bernard-Soulier-Syndrom, bei dem Betroffene unter einer erhöhten Blutungsneigung leiden (Kauskot und Hoylaerts, 2012).

### 3.3.2. Integrin $\alpha IIb\beta 3$

Das Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  (GPIIb-IIIa-Komplex) ist mit 50.000 bis 80.000 Exemplaren das häufigste Glykoprotein auf Thrombozyten (Clemetson und Clemetson, 2013). Es bindet an verschiedene Liganden, darunter Fibrinogen, vWF und Fibronectin, wobei Fibrinogen als Hauptligand betrachtet wird (Watson und Harrison, 2010). Allen Liganden gemein ist die Konsensussequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Motiv), über die die Interaktion mit  $\alpha IIb\beta 3$  stattfindet. Im ruhenden Thrombozyten befindet sich  $\alpha IIb\beta 3$  in einem Zustand niedriger Affinität, bei der die RGD-Bindungsstelle für Liganden unzugänglich ist. Wird der Thrombozyt stimuliert, führen Signale aus dem Thrombozyteninneren zu einer Konformationsänderung von  $\alpha IIb\beta 3$  in einen Zustand von hoher Affinität, bei dem die RGD-Sequenz freiliegt. Die Stimulation von  $\alpha IIb\beta 3$  vermittelt die Adhäsion, Aggregation

sowie den Ausbreitungsprozess von Thrombozyten auf der freiliegenden extrazellulären Matrix. Eine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Dysfunktion manifestiert sich in der Glanzmann-Thrombasthenie, die sich symptomatisch durch eine erhöhte Blutungsneigung äußert (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt, 2008).

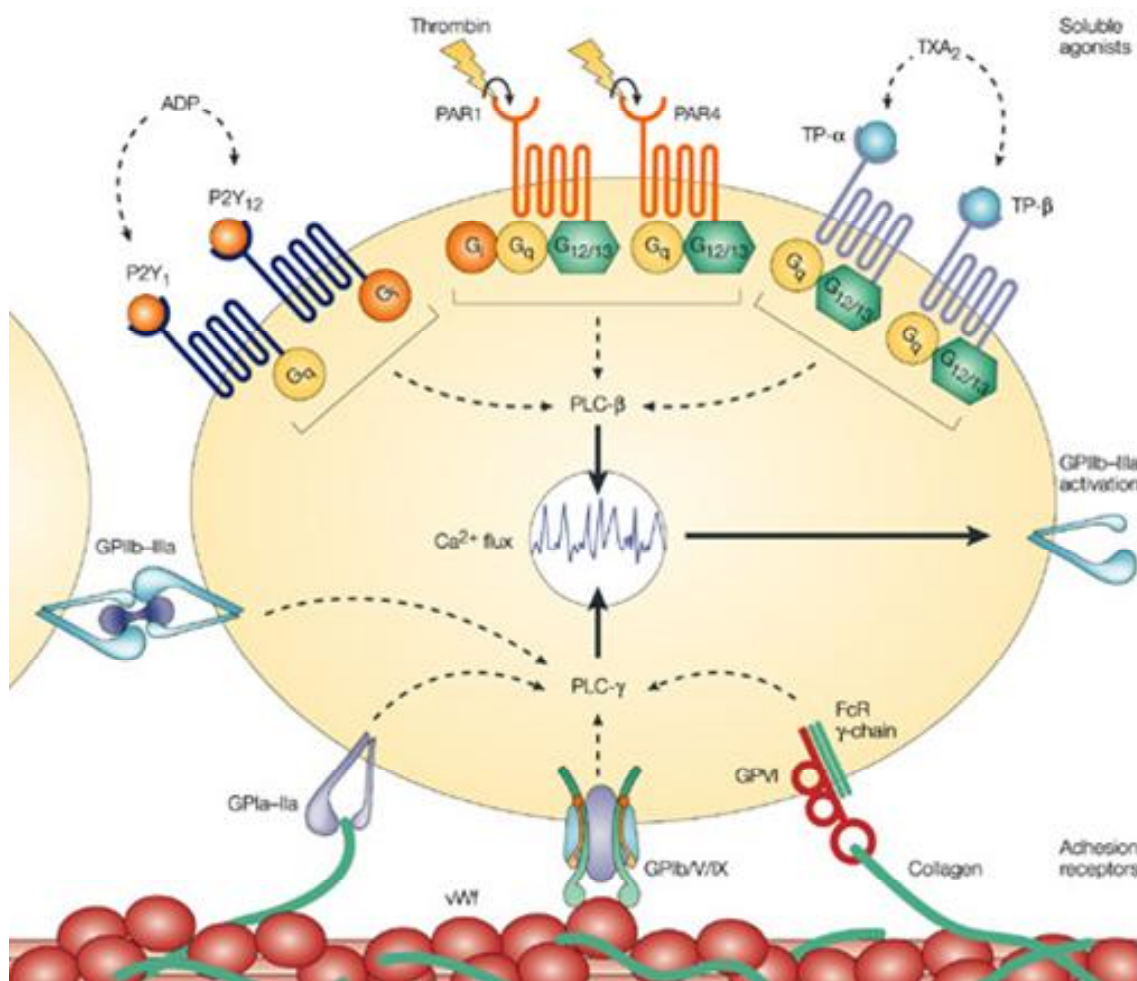
### 3.3.3. GPVI-Rezeptor

Der Kollagenrezeptor GPVI ist der wichtigste Adhäsionsrezeptor der Thrombozyten und zugleich maßgeblich an der Thrombozytenaktivierung beteiligt. Er ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert (Watson und Harrison, 2010; Ruggeri und Mendolicchio, 2007). Das 63 kDa große Protein besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer hoch-glykosylierten Linker-Region und einer zytoplasmatischen Sequenz (Kauskot und Hoylaerts, 2012). GPVI ist mit dem Adapterprotein FcR- $\gamma$  assoziiert, welches das konservierte Motiv ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) enthält. ITAMs spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Immunrezeptoren, darunter T- und B-Zell-Antigenrezeptoren. Die Bindung von GPVI an Kollagen führt zur Phosphorylierung von ITAM. Dies induziert eine nachgeschaltete über Tyrosinphosphorylierung vermittelte Signalkaskade, die in der Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase  $\text{C}\gamma\text{2}$  (PLC $\gamma\text{2}$ ) kulminiert (Watson und Harrison, 2010). Die aktivierte PLC $\gamma\text{2}$  katalysiert die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) und 1,2-Diacylglycerin (DAG). IP $_3$  induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, was zu einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels im Zytosol führt.  $\text{Ca}^{2+}$  ist ein für die Thrombozytenfunktion essentieller Botenstoff. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ist eine Voraussetzung für Prozesse wie Adhäsion, Degranulierung und die Aktivierung von  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . Während IP $_3$  intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisiert, ist DAG am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Kompartiment beteiligt (Varga-Szabo, Braun und Nieswandt, 2009).

### 3.3.4. G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Thrombozytenaktivierung durch Mediatoren wie Thrombin, TxA $_2$  und ADP erfolgt über die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). GPCRs stellen eine Familie von heptahelikalen Transmembranrezeptoren dar, die Signale über heterotrimere G-Proteine in das Zellinnere weiterleiten und darüber diverse intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (Kauskot und Hoylaerts, 2012). Dabei wird u.a. das Enzym Phospholipase  $\beta$  (PLC $\beta$ ) aktiviert, was wie bei PLC $\gamma\text{2}$  zur Bildung von IP $_3$  und DAG und letztendlich zur Erhöhung des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels führt (Offermanns, 2006).

Thrombin, einer der effektivsten Aktivatoren von Thrombozyten, agiert über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), einer Untergruppe der GPCRs. Es gibt vier verschiedene PAR-Isoformen, von denen PAR1 und PAR4 auf humanen Thrombozyten exprimiert werden, während murine Thrombozyten PAR3 und PAR4 aufweisen. PAR1 vermittelt die Thrombozytenaktivierung bei niedrigen, PAR4 erst bei hohen Thrombinkonzentrationen. Bei murinen Thrombozyten wird angenommen, dass PAR3 als Korezeptor für PAR4 dient.



**Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Hauptsignalwege bei der Thrombozytenaktivierung.**

Die Interaktion von GPIb/V/IX und vWf, das im Subendothel exprimiert wird, ist - insbesondere unter hohen Scherkräften - essentiell für die initiale Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand.  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GPIIb-IIIa) vermittelt Prozesse wie Adhäsion, Aggregation sowie das *Spreading* von Thrombozyten auf der freiliegenden extrazellulären Matrix. Es bindet an verschiedene Liganden, darunter Fibrinogen und vWf. Der Rezeptor GPVI bindet an Kollagenfasern des Subendothels und ist der wichtigste Adhäsionsrezeptor der Thrombozyten. Zugleich ist er maßgeblich an der Thrombozytenaktivierung beteiligt. Die löslichen Agonisten Thrombin,  $\text{TxA}_2$  und ADP aktivieren Thrombozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR): Thrombin bindet beim Menschen an die Protease-aktivierte Rezeptoren PAR1 und PAR4; bei Mäusen an PAR3 und PAR4.  $\text{TxA}_2$  bindet an die Rezeptoren TP- $\alpha$  und TP- $\beta$ . ADP bindet an die purinergen Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>. All diese Rezeptoren aktivieren spezifische Signalkaskaden, welche letztendlich zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern führen. Die Stimulation der Adhäsionsrezeptoren (GPIb/V/IX,  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , GPVI) bewirkt den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Aktivierung von PLC- $\gamma$ -Isoformen. Über GPCRs wird die Aktivierung von PLC- $\beta$ -Isoformen induziert. Abbildung aus Jackson und Schoenwaelder, 2003

Thromboxan (TxA<sub>2</sub>), das ausgehend von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase-1 (COX1) gebildet wird, wirkt über den Thromboxanrezeptor TP (Thromboxan/Prostanoid) (Offermanns, 2006; Jackson und Schoenwaelder, 2003). Aspirin (Acetylsalicylsäure), ein COX1-Inhibitor, ist ein etabliertes antithrombotisches Medikament für die Therapie als auch für die Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen (Park und Bavry, 2013).

ADP bindet an die zwei purinergen Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>. Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor kann durch Thienopyridine wie Clopidogrel, das gegenwärtig zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt wird, irreversibel inhibiert werden (Offermanns, 2006).

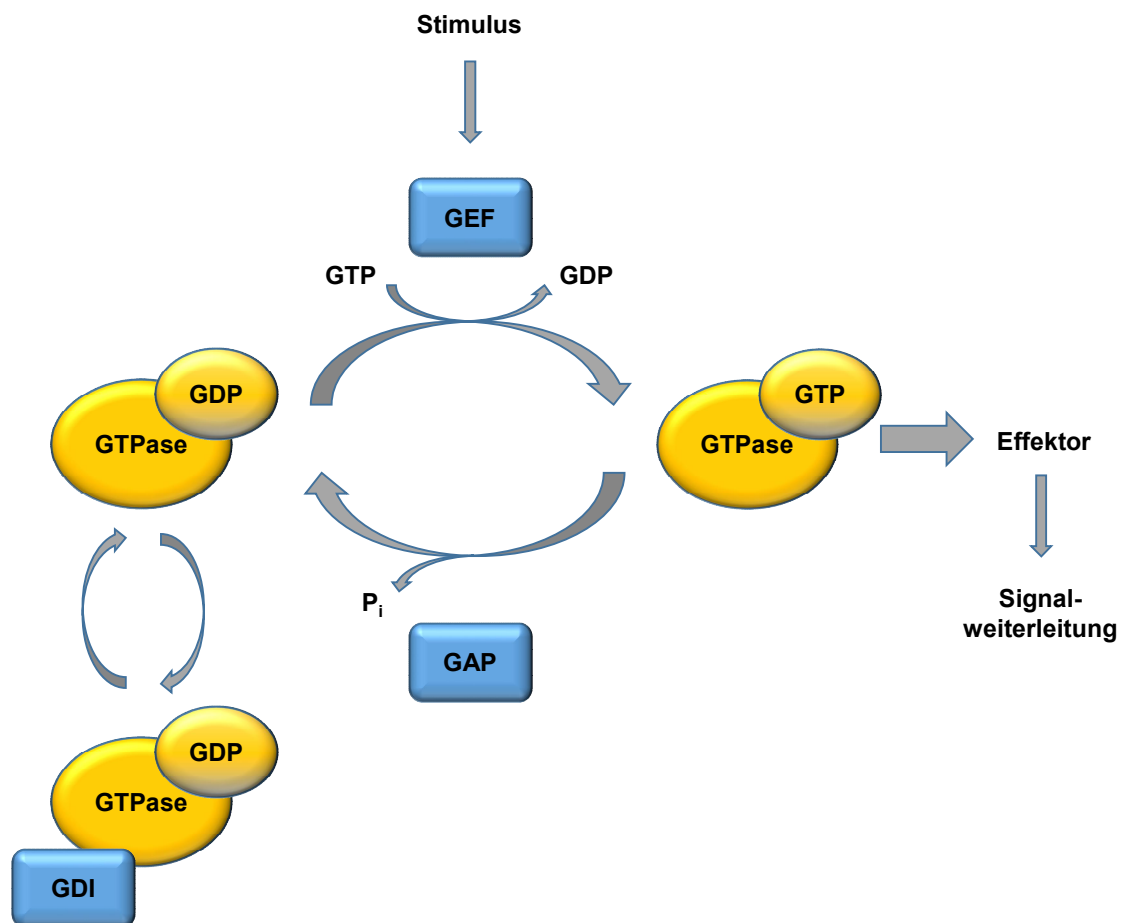
### 3.4. Rho-GTPasen und ihre Rolle bei der Zytoskelettdynamik

Rho (*ras homologous*)-GTPasen sind niedermolekulare Proteine (20-30 kDa) aus der Superfamilie der kleinen GTPasen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie Impulse von der Membran über Rezeptoren zu intrazellulären Signalwegen weiterleiten und damit fundamentale Prozesse der Zellbiologie wie Morphogenese, Zellwachstum, Migration sowie auch die Genexpression kontrollieren (Jaffe und Hall, 2005; Aslan und McCarty, 2013). Am umfassendsten ist bislang ihre Funktion als Regulatoren der Organisation des Aktinzytoskeletts untersucht (Bishop und Hall, 2000). Mittlerweile wurden über 20 Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen in Säugerzellen identifiziert, von denen die bekanntesten Vertreter RhoA (*ras homologous A*), Rac1 (*ras related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*) sind (Fauchereau *et al.*, 2003; Aslan und McCarty, 2013).

GTPasen werden auch als molekulare Schalter bezeichnet, da sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand alternieren (Bishop und Hall, 2000; s. Abbildung 3-6). Aufgrund der niedrigen intrinsischen Hydrolyserate und einer hohen Nukleotidaffinität bleiben die Rho-GTPasen in ihrem Aktivitätsstatus relativ arretiert (Eberth, 2006). Verändert werden die Aktivierungszustände durch die Aktivität von drei verschiedenen Arten von Regulatorproteinen: den Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs), den GTPase aktivierenden Proteinen (*GTPase-activating proteins*, GAPs) und den Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs). GEF-Proteine katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren die GTPasen dadurch. In ihrer GTP-gebundenen Form können die GTPasen mit ihren Effektorproteinen interagieren und eine nachgelagerte Signalweiterleitung initiieren. GAP-Proteine stimulieren die intrinsische Hydrolyse von GTP zu GDP und führen dadurch zu

einer Inaktivierung der GTPasen. GDI-Proteine binden an die GTPasen und entfernen diese vom Membranbereich. Dadurch verhindern sie eine Interaktion der GTPase mit GEF- und GAP-Proteinen und sind somit ebenfalls negative Regulatoren der GTPasen (Bishop und Hall, 2000; Villalonga und Ridley, 2006).

In Thrombozyten gehören die Rho-GTPasen zu den Hauptregulatoren der Organisation und Umformung des Zytoskeletts. Sie wirken als Schalter für die räumliche und zeitliche Weiterleitung und der Amplifikation von Signalen von der Thrombozytenoberfläche zum Intrazellulärraum. Die drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 nehmen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Aktinzytoskelettdynamik ein (Aslan und McCarty, 2012). RhoA ist an der Bildung von Stressfasern und von fokalen Adhäsionskomplexen beteiligt, Cdc42 reguliert die Ausbildung von Filopodien und Rac1 die Ausbildung von Lamellipodien (Dráber, Sulimenko und Dráberová, 2012).

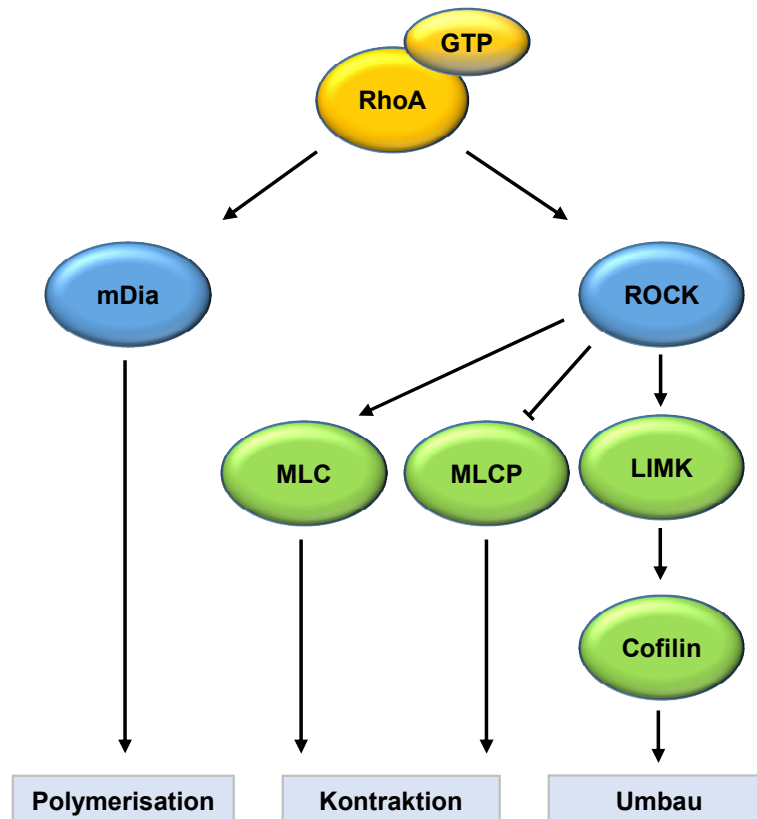


**Abbildung 3-6: Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen.**

Rho-GTPasen alternieren zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Ihre Aktivität wird durch GEF-, GAP- und GDI-Proteine reguliert. Abbildung nach Jaffe und Hall, 2005

### 3.4.1. RhoA

RhoA vermittelt die Aktinmyosin-Kontraktilität und den Umbau von Aktinfilamenten, die die aktivierungsbedingte Formveränderung des Thrombozyten bewirken, indem es die Proteinkinase ROCK (*Rho-associated protein kinase*) aktiviert (Aslan und McCarty, 2013; s. Abbildung 3-7). Ein weiterer wichtiger Effektor von RhoA ist das zur Gruppe der Formine gehörende Protein mDia (*mammalian diaphanous*), das für die Aktinpolymerisierung verantwortlich ist (Spiering und Hodgson, 2011).



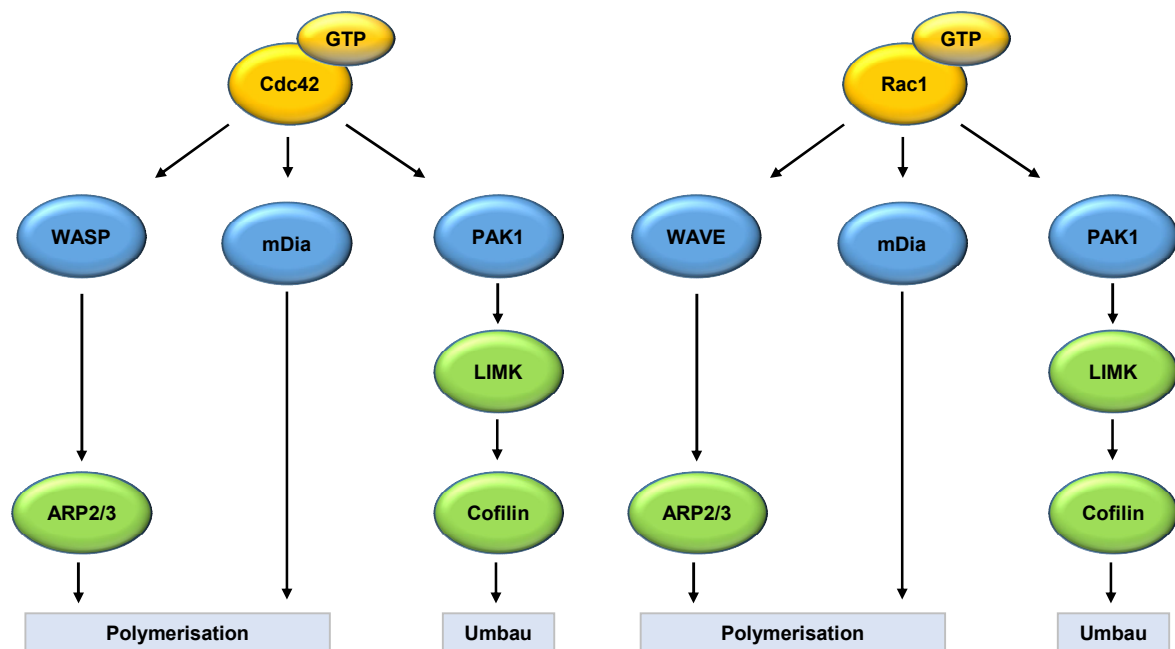
**Abbildung 3-7: Effektoren von RhoA und deren Einfluss auf die Aktivierungs-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts von Thrombozyten.**

RhoA aktiviert die Proteinkinase ROCK (*Rho-associated protein kinase*). ROCK phosphoryliert verschiedene Regulatoren des Aktinzytoskeletts inklusive der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP, *myosin light chain phosphatase*) und LIMK (*LIM motif-containing protein kinase*). Die Phosphorylierung von MLCP hat eine verstärkte Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin (MLC, *myosin light chain*) zur Folge, was die Kontraktion von Aktomyosin-Strukturen verursacht. Die Aktivierung von LIMK führt zur Phosphorylierung und Inhibition des Aktin-bindenden Proteins Cofilin, das eine Schlüsselrolle beim Umbau von Aktinfilamenten innehat (Dráber, Sulimenko und Dráberová, 2012). Ein weiterer Effektor von RhoA ist das zur Gruppe der Formine gehörende Protein mDia (*mammalian diaphanous*), das für die Aktinpolymerisierung verantwortlich ist (Spiering und Hodgson, 2011). Abbildung nach Dráber, Sulimenko und Dráberová, 2012

### 3.4.2. Cdc42

Die Rho-GTPase Cdc42 induziert über den WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein)-Komplex die Aktivierung des ARP2/3-Komplexes, einem kritischen Element bei der

Neubildung von Aktinfilamenten (s. Abbildung 3-8) (Stradal und Wehland, 2005). Es folgt die Bildung von parallelen Aktin-Bündeln, die den Filopodien ihre Form geben (Pleines *et al.*, 2010). Die Funktion von Cdc42 in Thrombozyten wird kontrovers diskutiert. Seit seiner Entdeckung wurde Cdc42 gemeinhin eine wichtige Rolle bei der Sekretion und der Ausbildung von Filopodien zugeschrieben (Aslan und McCarty, 2013). Jedoch zeigten Untersuchungen von Cdc42-defizienten Thrombozyten, dass diese normale Filopodien ausbilden können (Pleines *et al.*, 2010). Zudem wurde in Studien mit nuklearen Zellen gezeigt, dass die Filopodienausbildung unabhängig von Cdc42 durch die Aktivität der Rho-GTPase Rif stattfinden kann (Goh *et al.*, 2011; Pellegrin *et al.*, 2005). Andere Untersuchungen hingegen konnten bei Mäusen eine reduzierte Filopodienausbildung aufgrund eines Cdc42-*Knockouts* in Thrombozyten belegen (Akbar *et al.*, 2011).



**Abbildung 3-8: Effektoren von Rac1 und Cdc42 und deren Einfluss auf die Aktivierungsvermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts von Thrombozyten.**

Cdc42 induziert über den WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein)-Komplex die Aktivierung des ARP2/3-Komplexes, der die Neubildung von Aktinfilamenten vermittelt (Stradal und Wehland, 2005). Analog zu RhoA aktiviert Cdc42 das Protein mDia, das die Aktinpolymerisierung fördert, sowie – über Aktivierung der Proteinkinase PAK1 (*p21 activated kinase1*) – die Proteinkinase LIMK, was zum Umbau von Aktinfilamenten führt (Spiering und Hodgson, 2011). Auch Rac1 vermittelt die Aktinpolymerisierung und -reorganisation über die Proteine mDia und PAK1 (Spiering und Hodgson, 2011). Im Gegensatz zu Cdc42 vermittelt es die Aktivierung von ARP2/3 über das zur WASP-Familie gehörende Protein WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*) (Stradal und Wehland, 2005). Abbildung nach Dráber, Sulimenko und Dráberová, 2012

### 3.4.3. Rac1

Untersuchungen von Rac1-defizienten Thrombozyten zeigten, dass Rac1 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien spielt (McCarty *et al.*, 2005). Wie Cdc42

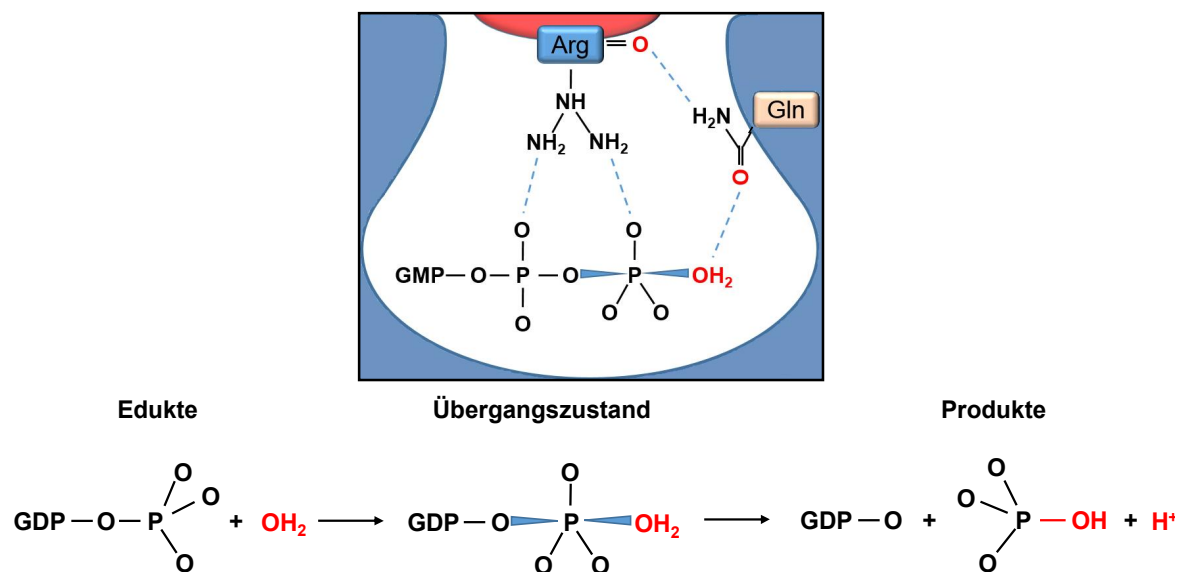


induziert auch Rac1 die Aktinpolymerisierung über den ARP2/3-Komplex (Stradal und Wehland, 2005; s. Abbildung 3-8).

### 3.5. Rho-GTPase-aktivierende Proteine (RhoGAPs)

Nach Interaktion mit GTPasen beschleunigen GAP-Proteine die Hydrolyserate von GTP zu GDP um mehrere Größenordnungen und bewirken dadurch die Inaktivierung der GTPase (Bos, Rehmann und Wittinghofer, 2007). GAP-Proteine interagieren spezifisch mit den verschiedenen Familien der GTPasen. So wirken etwa RhoGAP-Proteine nur auf die Gruppe der Rho-GTPasen. Die katalytische RhoGAP-Domäne besteht aus 150-200 Aminosäuren, die neun alpha-helikale Strukturen ausbilden und enthält einen hoch-konservierten Arginin-Rest („Arginin-Finger“) (Moon und Zheng, 2003; Longenecker *et al.*, 2000).

Verschiedene strukturelle und biophysikalische Untersuchungen konnten den Reaktionsmechanismus zwischen GTPase und GAP-Domäne aufdecken. Die Hydrolyse erfolgt durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das  $\gamma$ -Phosphoratom des an die GTPase gebundenen Guanosintriphosphats (Bos, Rehmann und Wittinghofer, 2007; s. Abbildung 3-9).



**Abbildung 3-9: Molekularer Mechanismus der Hydrolyse des Guanosintriphosphats (GTP) einer Rho-GTPase (blau) durch ein GAP-Protein (rot).**

Die Hydrolyse erfolgt durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das  $\gamma$ -Phosphoratom des an die GTPase gebundenen GTPs. Das GAP-Protein bringt die Seitenkette des katalytischen Arginins in die Nähe der Phosphat-bindenden Stelle der GTPase und stabilisiert dadurch den Übergangszustand der Reaktion. Das Wassermolekül wird so positioniert, dass die nukleophile Substitution mit der GDP-gebundenen GTPase als Abgangsgruppe ermöglicht wird. Abbildung nach Bos, Rehmann und Wittinghofer, 2007

Thrombozyten spielen für die Untersuchung von GAP-Proteinen eine bedeutende Rolle, da das erste RhoGAP-Protein für die Rho-GTPase Cdc42 (p50RhoGAP) bei Experimenten identifiziert wurde, in denen Thrombozyten als Modellsystem dienen (Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007). Bislang wurden über 70 RhoGAP-Proteine identifiziert. Gleichwohl ist über ihre Funktion in Thrombozyten nur wenig bekannt (Aslan und McCarty, 2012).

Die große Zahl an RhoGAP-Proteinen macht wiederum eine strenge Kontrolle ihrer Aktivität bei verschiedenen Zellprozessen nötig. Tatsächlich wird die RhoGAP-Aktivität durch eine Vielzahl an Mechanismen reguliert, darunter Phosphorylierung, proteolytische Degradierung oder Autoinhibition (Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007; Bos, Rehmann und Wittinghofer, 2007). So wird z.B. p190RhoGAP, ein GAP-Protein, das in Thrombozyten exprimiert wird, durch die Tyrosinkinase Src im Anschluss an eine Aktivierung von  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  phosphoryliert und dadurch aktiviert (Aslan und McCarty, 2012).

### 3.6. Oligophrenin-1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das RhoGAP-Protein Oligophrenin-1 (OPHN1) untersucht. Das 91 kDa große OPHN1 besteht aus einer N-terminalen BAR-Domäne (Bin/Amphiphysin/Rvs) (Aminosäuren (AS) 19-225), einer PH-Domäne (*pleckstrin homology*) (AS 266-370) und einer zentralen RhoGAP-Domäne (AS 384-561, einschließlich des Arginin-Fingers an Position 409) und drei im C-terminalen Bereich liegenden Prolin-reichen Regionen (AS 567/585, 629/639 und 735/748) (Fauchereau *et al.*, 2003; de Kreuk *et al.*, 2013; NCBI; s. Abbildung 3-10).

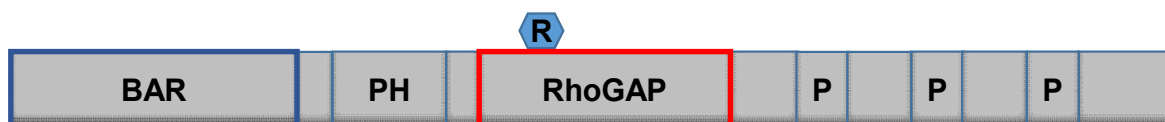


Abbildung 3-10: Domänenstruktur von OPHN1

BAR-Domänen spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei Prozessen von Membranzumformungen. In der Regel dimerisieren BAR-Domänen zu Bananen-förmigen Homodimeren und erkennen bzw. induzieren Membrankrümmungen. Im Fall von OPHN1 wird der BAR-Domäne zudem die Funktion zugesprochen, die GAP-Aktivität durch einen autoinhibitorischen Mechanismus zu regulieren. So konnten Eberth *et al.* (2009) anhand von Untersuchungen im zellfreien System mit Fluorochrom-gekoppelten Guanosintriphosphaten zeigen, dass die BAR-Domäne die aktiven Bereiche der GAP-Domäne in einem intramolekularen (cis) Mechanismus maskiert und die GAP-Aktivität dadurch einschränkt. Weiterhin konnte dargelegt werden, dass die BAR-Domäne dabei

ihre Membranbindungs-Aktivität beibehält und somit offenbar die Funktion hat, das ruhende OPHN1 an der Membran zu lokalisieren.

Überexpressionsstudien konnten belegen, dass OPHN1 über seine GAP-Domäne die GTPase-Aktivität von RhoA, Cdc42 und Rac1 stimuliert (Fauchereau *et al.*, 2003).

OPHN1 wurde bislang hauptsächlich im neuronalen System untersucht. Der Name des Proteins leitet sich vom griechischen *oligo* 'wenig' und *phren* 'Seele', 'Geist' ab. Die Oligophrenie ist eine Sammelbezeichnung für verschiedene Formen verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten (Freyberger und Dilling, 2010). Eine Mutation des OPHN1-Gens und der damit einhergehende Funktionsverlust stehen im Zusammenhang mit X-chromosomal bedingter mentaler Retardierung (*X-linked mental retardation*, XLMR) (Billuart *et al.*, 1998). Als Ursache wird eine Dysregulation der Rho-GTPasen-Aktivität vermutet (Fauchereau *et al.*, 2003). Als Regulatoren des Aktinzytoskeletts spielen Rho-GTPasen eine bedeutende Rolle bei der neuronalen Morphogenese, einschließlich der Ausbildung von Nervenzellausläufern sowie der Synapsenentwicklung (Luo, 2000). Diese Prozesse sind essentiell für die neuronale Konnektivität und Informationsweiterleitung (Fauchereau *et al.*, 2003). Menschen mit einer Mutation des OPHN1-Gens weisen eine Unterentwicklung des Kleinhirns (Pontozerebelläre Hypoplasie) sowie eine Erweiterung der lateralen Ventrikel (ventrikuläre Dilatation) auf (Bergmann *et al.*, 2003). In Mäusen mit einem OPHN1-Gen-*Knockout* wurde eine Unterentwicklung der dendritischen Dornfortsätze sowie eine veränderte Synapsenfunktion beobachtet. Zudem zeigten die Mäuse kognitive Beeinträchtigungen und ein verändertes soziales Verhalten (Khelifaoui *et al.*, 2007).

Govek *et al.* zeigten anhand von *knockdown*-Experimenten, dass OPHN1 RhoA in Neuronen negativ reguliert und dadurch das Dendritenwachstum beeinflusst (Govek *et al.*, 2004).

Weitere Interaktionspartner von OPHN1 sind das postsynaptische Adapterprotein Homer, (Govek *et al.*, 2004) sowie die Proteine Endophilin, Amphiphysin und CIN85. Die letzteren drei sind an dem Prozess der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt, bei dem ebenfalls eine regulatorische Funktion von OPHN1 vermutet wird (Khelifaoui *et al.*, 2009). Zudem bildet OPHN1 einen stabilisierenden Komplex mit dem postsynaptischen AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Rezeptor aus, wodurch es selektiv die AMPA-vermittelte synaptische Signalweiterleitung verstärkt (Nadif Kasri *et al.*, 2011).

OPHN1 wird in einer hohen Rate in Neuronen exprimiert, wo es mit dem Aktinzytoskelett kolokalisiert (Fauchereau *et al.*, 2003). Auch in Thrombozyten konnte das Protein nachgewiesen werden (Elvers *et al.*, 2012). Seine Funktion im thrombozytären System ist noch weitgehend unerforscht.

### 3.7. Problemstellung und Zielsetzung

Bei der Hämostase verhindern Thrombozyten im Falle einer Gefäßwandverletzung den Blutverlust, indem sie einen Thrombus bilden. Andererseits kann die Thrombozytenadhäsion und -aggregation in erkrankten Gefäßen (z.B. an rupturierten arteriosklerotischen Plaques) zu einem vaskulären Verschluss mit resultierender Hypoxie und Infarkt der distalen Gewebe führen. Akut ischämische Ereignisse wie Herzinfarkt oder Schlaganfall können die Folge sein.

Der gegenwärtige Einsatz antithrombotischer Substanzen bringt eine Verbesserung der klinischen Situation, ist jedoch häufig limitiert durch ein erhöhtes Blutungsrisiko. Deshalb ist die Entwicklung von antithrombotischen Medikamenten mit einer größeren therapeutischen Sicherheit notwendig (Michelson, 2011). Aufgrund der zentralen Rolle von Thrombozyten bei der arteriellen Thrombose könnten neue Erkenntnisse über die Rolle von regulatorischen Proteinen in thrombozytären Signalwegen einen Ansatzpunkt für die Entwicklung antithrombotischer Therapiestrategien bieten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des RhoGAP-Proteins OPHN1, das bislang hauptsächlich aus dem neuronalen System bekannt ist, in Thrombozyten untersucht und seine Bedeutung für die Hämostase charakterisiert.

Grundlage der Untersuchungen waren die folgenden bereits beschriebenen Befunde:

- OPHN1 reguliert Prozesse der neuronalen Morphologie wie z.B. die Dendritenausbildung.
- Bei diesen zellulären Formveränderungen spielen die drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 eine bedeutende regulatorische Rolle.
- Auch in Thrombozyten sind diese Rho-GTPasen an der Reorganisation des Zytoskeletts und der damit einhergehenden Formveränderung im Laufe des Aktivierungsprozess beteiligt.
- OPHN1 konnte als Regulator dieser drei Rho-GTPasen identifiziert werden

Diese Beobachtungen gaben Anlass zu der Hypothese, dass OPHN1 in Thrombozyten eine ähnliche Funktion haben könnte wie in Neuronen. Es sollte untersucht werden, in wie weit OPHN1 aufgrund seiner GAP-Aktivität über die Regulation der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in Prozessen der zytoskeletalen Reorganisation und Formveränderung von Thrombozyten involviert ist. Dabei wurde auch die Rolle von OPHN1 bei thrombozytären Prozessen wie der Degranulierung, der Aggregation und der Thrombusbildung analysiert.

Dazu wurden Mäuse untersucht, in denen das Gen für OPHN1 durch Unterbrechung des offenen Leserasters (*open reading frame*) im gesamten Organismus ausgeschaltet ist (konstitutiver Gen-*Knockout*). Diese Genmutation bewirkt, dass OPHN1 in diesen Mäusen nicht mehr exprimiert wird.

Eine weitere Fragestellung war, wie OPHN1 selbst reguliert wird und ob es neben dem beschriebenen autoinhibitorischen Mechanismus durch die BAR-Domäne weitere Faktoren gibt, die die GAP-Aktivität beeinflussen. Es wurde ein potentieller Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf die GAP-Aktivität von OPHN1 analysiert. Hierzu wurden Überexpressionsstudien mit OPHN1-Konstrukten, in denen die Tyrosinphosphorylierungsstellen durch Basenmutation entfernt worden waren, durchgeführt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Geräte, Verbrauchsmaterial und Software

Tabelle 4-1: Geräte

Gerät	Quelle
Blue Power™ 500 Netzgerät	SERVA Electrophoresis
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-18AIC	SANYO, Panasonic
DIC-Schieber PA 100x/1,40 III	Carl Zeiss
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Biosciences
FlexCycler BU	Analytik Jena
Flusskammer	Maastricht Instruments BV
Genpure Wasseraufbereitungssystem	TKA, Thermo Fisher Scientific
Heraeus Multifuge 3S Plus	Thermo Fisher Scientific
Invertiertes Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss
Kathodenzerstäuber Emitech K550X	Quorum Technologies
Konfokales Laserscan-Mikroskop Zeiss LSM5 Exciter	Carl Zeiss
Kritisch-Punkt-Trockner Polaron E3000	Quorum Technologies
Lumi-Aggregometer, Modell 700	Chrono-log Corporation
Microzentrifuge 5417R	Eppendorf
Microzentrifuge 5415C	Eppendorf
Mikrotiterplatten-Photometer Modell 550	Bio-Rad Laboratories
NanoDrop 2000 UV/VIS Spectralphotometer	Peqlab Biotechnologie
Objective Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil DIC	Carl Zeiss
Odyssey® Infrarot-Scanner	Li-cor® Biosciences
PerfectBlue Gelsystem Mini L	Peqlab Biotechnologie
pH-Meter HI 9025	HANNA Instruments
PowerPac™ Netzgerät	Bio-Rad Laboratories
Rasterelektronenmikroskop Evo LS10	Carl Zeiss
Sterilbank Herasafe™, Type HS 18	Thermo Fisher Scientific
SYSMEX Hämatologie-System KX-21N	Sysmex Deutschland
Thermomixer® Comfort	Eppendorf

Gerät	Quelle
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories
Transmissionselektronenmikroskop LIBRA 120	Carl Zeiss
Twinblock 48	Analytik Jena
Ultramikrotom Ultracut	W.Reichert-LABTEC e K.
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat Deutschland
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen™, Life technologies

**Tabelle 4-2: Verbrauchsmaterial**

Material	Quelle
BD Falcon™ Tubes	BD Biosciences
Blot-Papier Whatman™	GE Healthcare Life Sciences
C-Chip, Einweg-Hämozytometer (Neubauer-Kammer)	Digital Bio Technology
Eppendorf Safe-Lock Tubes™	Eppendorf
Gelkassetten	Invitrogen™, Life technologies
Heparinisierte Kapillaren (NA-hep)	VWR International
Immobilon-FL PVDF-Transfermembran	Merck Millipore
Mikroskopische Deckgläser, Borosilikatglas, Stärke 1 (0,13 - 0,17 mm)	R. Langenbrinck
Objektträger, Kalknatronglas	R. Langenbrinck

**Tabelle 4-3: Software**

Software	Quelle
aggrolink8	Chrono-log
AxioVision Rel. 4.8.2	Carl Zeiss
BD CellQuest™ Pro	BD Biosciences
ImageJ 1.43	National Institutes of Health (NIH)
Microplate Manager® 4.0	Bio-Rad Laboratories

#### 4.1.2. Reagenzien und Lösungen

Tabelle 4-4: Reagenzien

Reagens	Quelle
Albumin Fraktion V	Applichem
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Molecular Probes®, Life technologies
Ampicillin Natriumsalz	Roth
APS	Roth
Bench Top 100 bp DNA Ladder	Promega
Bench Top 1 kb DNA Ladder	Promega
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega
Bromphenolblau Na-Salz	Roth
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O; demineralisiert)	Merck Millipore
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich
DMEM, High Glucose, GlutaMAX™ supplement	Gibco®, Life technologies
dNTP Mix, je 10 mM	Promega
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich
EDTA, Ultrapure™; 0,5 M	Invitrogen™, Life technologies
EGTA	Fluka
Essigsäure	Merck Millipore
Ethanol	VWR
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fluorescence Mounting Medium	DAKO
Formaldehyd	Roth
Glycin	Roth
Green GoTaq® Flexi Buffer (5 x)	Promega
Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml)	Ratiopharm
HEPES Pufferan®	Roth
HI FBS	Gibco®, Life technologies
Humanes Fibrinogen, konjugiert mit Alexa Fluor® 488	Invitrogen™, Life technologies
Immersol S187	Carl Zeiss
Kanamycin	Sigma-Aldrich



Reagens	Quelle
KCl	Merck Millipore
LB Agar	Sigma-Aldrich
LB Broth	Sigma-Aldrich
Lipofectamine® 2000	Invitrogen™, Life technologies
Magermilchpulver	Applichem
MEM Non-Essential Amino Acids (100 x)	Gibco®, Life technologies
Methanol	VWR
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	Promega
NaCl	Sigma-Aldrich
NaCl (isotonische Kochsalzlösung, 0,9%)	Fresenius Kabi
NaHCO <sub>3</sub>	Merck Millipore
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
NEBuffer 2 (10 x)	NEB
Nonidet® P 40 Substitute	Fluka
Page Ruler prestained protein ladder	Fermentas
PBS tablets	Gibco®, Life technologies
2-Propanol AnalaR®, NORMAPUR®	VWR
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories
Protein G Sepharose® 4 fast flow	GE Healthcare Life Sciences
Protein Standard (1 mg/ml BSA)	Sigma-Aldrich
Rhodamine-Phalloidin	Molecular Probes®, Life technologies
Rotiphorese Gel30	Roth
SDS	Carl Roth
SeaKem® LE Agarose	Lonza
T4 DNA Ligase Buffer (10 x)	Fermentas
TEMED	Roth
Tris ultrapure	Applichem
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypan Blue Solution	Fluka
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco®, Life technologies
Tween® 20	Applichem

Reagens	Quelle
Zitronensäure	Sigma-Aldrich

**Tabelle 4-5: Puffer und Lösungen**

Puffer	Zusammensetzung
ACD-Puffer	0,1 M Natriumcitrat; 70 mM Zitronensäure; 0,1 M Glucose; pH 4,7
Blockierlösung (WB)	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T
DMEM-Kulturmedium	DMEM, High Glucose, GlutaMAX™ supplement; 10% (v/v) FCS; 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
Heparin-Lösung	20 U/ml Heparin in PBS
Karnovsky-Lösung	3,6% (v/v) Glutaraldehyd; 3% (v/v) Paraformaldehyd; 0,03 M Cacodylsäure; 0,04 M CaCl <sub>2</sub>
Laemmlis-Probenpuffer (5 x)	10% (v/v) Glycerin; 10% (v/v) β-Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 0,65 M Tris/HCl pH 6,8; 5‰ (w/v) Bromphenolblau
Lysepuffer A	300 mM NaCl; 20 mM Tris; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 1% (v/v) NP-40 Bei der Untersuchung von phosphorylierten Proteinen: Zugabe von 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
PBS-T	1 x PBS; 1% (v/v) Tween® 20
Präzipitationspuffer (IP)	300 mM NaCl; 20 mM Tris; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA
Sammelpuffer	1 M Tris pH 6,8
SDS-Laufpuffer (10 x)	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; vor Verwendung 1:10 Verdünnung mit ddH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 0,05 EDTA
Transferpuffer (WB)	2 mM Tris; 15 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
Tyrode-Lösung	136 mM NaCl; 0,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,7 mM KCl; 12 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 0,1% (w/v) Glukose; 0,35% (w/v) BSA; pH 7,4

**Tabelle 4-6: Agonisten**

Agonist	Rezeptor	Quelle
ADP	P2Y	Probe + go Labordiagnostika
CRP (YGKO(GPO) <sub>10</sub> GKOG, Kollagen-Analogon)	GPVI α <sub>2</sub> β <sub>1</sub>	Prof. Richard Farndale (Universität Cambridge, UK)

Agonist	Rezeptor	Quelle
humanes Fibrinogen	$\alpha$ IIb $\beta$ 3	Sigma-Aldrich
Kollagenreagens HORM®	GPVI	Nycomed
PAR4-aktivierendes Peptid (AYPGKF)	PAR4	JPT Peptide Technologies
Thrombin	PAR-Rezeptoren	Roche
U46619 (Prostaglandin PGH <sub>2</sub> -Analogon)	Thromboxan-Rezeptor	Enzo Life Sciences

Tabelle 4-7: Inhibitoren

Agonist	Target	Quelle
Apyrase	ADP-Hydrolyse	Sigma-Aldrich
PP2	Src	Merck Millipore
Prostaglandin-I <sub>2</sub> , (PGI <sub>2</sub> )	TxA <sub>2</sub> -Antagonist	Calbiochem

Tabelle 4-8: Kit-Systeme

Kit	Quelle
ChronoLume® luciferin assay	ChronoLog
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
G-LISA® Small G-protein Activation Assays für RhoA, Rac1, Cdc42 (kolorimetrisch)	Cytoskeleton
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuikChange™ II site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies

Tabelle 4-9: Narkose- und Schmerzmittel

Medikament	Quelle
Atipamezol	Albrecht, Eurovet
Carprofen	IDT Biologika
Fentanyl	Actavis
Flumazenil	Fresenius Kabi

Medikament	Quelle
Isofluran CP®	cp-pharma®
Medetomidin	Albrecht, Eurovet
Midazolam	Ratiopharm

**Tabelle 4-10: Bakterien**

Bakterien	Quelle
Oneshot TOP10 Chemically competent <i>E. Coli</i>	Invitrogen™, Life technologies

#### 4.1.3. Vektoren und Primer

**Tabelle 4-11: Vektoren**

Vektor	Quelle
pcDNA3.1/Hygro(+)	Invitrogen™, Life technologies
ptdTomato-N1	Clontech
Src-Plasmid 13661 (pLNCX chick src E378G, konstitutiv aktiv)	Addgene
Src-Plasmid 13663 (pCMV5 mouse src)	Addgene
Src-Plasmid in pcDNA3-eGFP	Eigenherstellung

**Tabelle 4-12: Primer**

Name	Verwendung	Sequenz
KOF	Genotypisierung <i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse	5' CCCACTGGGTAAAAGCTCTCAC TTCTTG 3'
KOR	Genotypisierung <i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse	5' CTATTCACCCTGCCCTCCAA AGAGT 3'
OPHN1_full_fw	Amplifikation der OPHN1- Nukleotidsequenz	5' GAGAAAGCTTACCATGGGGCAT CCCCCGC 3'
OPHN1_full_rv	Amplifikation der OPHN1- Nukleotidsequenz	5' GAGATCTAGAGCTCACAAGGGT TTGAAGTAGAC 3'
OPHN1_Y370A_fw	Ortsspezifische Mutagenese	5' GGATGGCAAAGAACCTATCGCC CACACTCCTATAACAAAAC 3'
OPHN1_Y370A_rv	Ortsspezifische Mutagenese	5' GTTTTGTTATAGGAGTGTGGGC GATAGGTTCTTTGCCATCC 3'
OPHN1_Y480A_fw	Ortsspezifische Mutagenese	5' CAAATCTGACAACCTGGATGCC CGTCTGGGGGCTATTCAC 3'

Name	Verwendung	Sequenz
OPHN1_Y480A_rv	Ortsspezifische Mutagenese	5' GTGAATAGCCCCCAGACGGGCATC CAGGTTGTCAGATTTG 3'

#### 4.1.4. Enzyme und Antikörper

Tabelle 4-13: Verschiedene Enzyme

Enzym	Quelle
T4 DNA Ligase	Fermentas
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	Promega
Luciferase	Probe & Go Labordiagnostika
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL)	Finnzymes, Thermo Scientific
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco®, Life technologies

Tabelle 4-14: Restriktionsenzyme

Enzym	Verwendung	Quelle
<i>Xba</i> I	Klonierung von OPHN1-Basensequenz in pcDNA3.1-Vektor	NEB
<i>Hind</i> III	Klonierung von OPHN1-Basensequenz in pcDNA3.1- und ptdTomato-N1-Vektor	NEB
<i>Eco</i> RI	Klonierung von OPHN1-Basensequenz in ptdTomato-N1-Vektor	Promega
<i>Dpn</i> I	Verdau von methylierter DNA bei der ortsspezifischen Mutagenese	ThermoScientific

Tabelle 4-15: Primäre Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
anti-Cdc42	Maus	1:800 (WB), 1:50 (IF)	BD Biosciences
anti-GP1β	Ratte	1:500 (WB)	Emfret
anti-GPIβ (CD42b), FITC-konjugiert	Ratte	1:7 (Durchflusszytometrie)	Emfret
anti-GPVI, FITC-konjugiert	Ratte	1:7 (Durchflusszytometrie)	Emfret
anti-Integrin α5 (CD49e) FITC-konjugiert	Ratte	1:7 (Durchflusszytometrie)	Emfret

Antikörper	Wirtsspezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
anti-Integrin b3 (GPIIIa, CD61) FITC- konjugiert	Ratte	1:7 (Durchflusszytometrie)	Emfret
anti-OPHN1	Kaninchen	1:200 (IF)	ProteinTech
anti-OPHN1	Ziege	1:800 (WB)	SantaCruz
anti-pan-Aktin	Kaninchen	1:500 (WB)	Cytoskeleton
anti-Phosphotyrosin (Klon 4G10)	Maus	1:1000 (WB)	Merck Millipore
anti-PLC $\gamma$ 2	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
anti-P-Selectin (CD62P), FITC- konjugiert	Ratte	1:7 (Durchflusszytometrie)	Emfret
anti-Rac1	Maus	1:800 (WB), 1:50 (IF)	BD Biosciences
anti-RhoA	Kaninchen	1:800 (WB), 1:50 (IF)	ProteinTech
anti-Src (36D10)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling

Tabelle 4-16: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
anti-Kaninchen IgG (800)	Esel	1:1000 (WB)	Li-cor® Biosciences
anti-Kaninchen IgG (488)	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen™, Life technologies
anti-Maus IgG (800)	Esel	1:1000 (WB)	Li-cor® Biosciences
anti-Maus IgG (488)	Kaninchen	1:200 (IF)	Invitrogen™, Life technologies
anti-Ziege IgG (600)	Esel	1:1000 (WB)	Li-cor® Biosciences

#### 4.1.5. A5-CHO-Zellen

Die Zelllinie A5-CHO wurde mit freundlicher Genehmigung von Prof. Mark Ginsberg (Department of Medicine, University of California, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. In A5-CHO-Zellen wird das humane Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 stabil überexprimiert. Somit kann diese Zelllinie als Model für ein thrombozytäres System betrachtet werden (Frojmovic *et al.*, 1991).

#### 4.1.6. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Maus

Die Mauslinie C57BL/6-*Ophn*<sup>tm1Bill</sup> mit konstitutivem OPHN1-Gen-*Knockout* wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Pierre Billuart (Institut Cochin - Faculté de Médecine de Paris Descartes, Paris) zur Verfügung gestellt. Bei den Mäusen ist das offene Leseraster des OPHN1-Gens auf dem X-Chromosom durch die Einführung einer Sequenz von 100 Basenpaaren in die kodierende Sequenz von Exon 9 unterbrochen. Dies hat den frühzeitigen Abbruch der Transkription des OPHN1-Gens nach der BAR-Domäne (Aminosäuren 1–242) zur Folge (Khelifaoui *et al.*, 2007).

Für die Experimente wurden *ophn1*<sup>-/-</sup>- und Wildtyp (WT)-Geschwistertiere im Alter von 2-5 Monaten verwendet. Die Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Tierhaltung der HNO-Klinik in Tübingen den Vorgaben entsprechend gehalten (gleichgeschlechtliche Gruppen von ≤ 5 Tieren in Makrolon TypII long-Käfigen, Temperatur von 22 °C ± 2, relative Luftfeuchtigkeit von 55% ± 5, Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit). Die Genotypisierung erfolgte durch PCR-Analyse der DNA aus dem Ohrgewebe.

Alle Eingriffe an den Mäusen wurden vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß §4 und §8, nach der Änderung vom 07.08.13 gemäß §8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.06 genehmigt.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1.1. Klonierungsstrategien

Für die Durchführung der Überexpressionsstudien wurden DNA-Vektoren mit integriertem OPHN1-Gen generiert. Hierzu wurde RNA aus murinen WT-Thrombozyten extrahiert (s. Abschnitt 4.2.1.2) und diese mittels reverser Transkription in die komplementäre DNA umgeschrieben (s. Abschnitt 4.2.1.9). Anschließend wurde mit spezifischen Primern der Genabschnitt von OPHN1 mittels PCR amplifiziert (s. Abschnitt 4.2.1.4). Durch einen Enzym-vermittelten Restriktionsverdau wurde die Sequenz isoliert und in den Vektor ligiert (s. Abschnitte 4.2.1.7 und 4.2.1.8). Als Vektoren dienten ein pcDNA3.1-Vektor sowie ein ptdTomato-N1-Vektor, bei dem OPHN1 an einen rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt exprimiert wurde.

Zur Herstellung der OPHN1-Konstrukte mit deletierten Tyrosinphosphorylierungsstellen wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese angewendet (s. Abschnitt 4.2.1.10). Die Überprüfung der Basensequenz erfolgte über das Didesoxy-Terminationsverfahren nach Sanger (s. Abschnitt 4.2.1.14). Zur Vervielfältigung wurden die Plasmide in *E. Coli*-Bakterien transformiert (s. Abschnitt 4.2.1.11) und anschließend über Ionenaustauscher-

Säulen isoliert und aufgereinigt (s. Abschnitt 4.2.1.12). Zur experimentellen Analyse der Plasmide wurden diese über Lipofektion in A5-CHO-Zellen transfiziert (s. Abschnitt 4.2.2.2).

### **4.2.1.2. RNA-Extraktion aus murinen Plättchen**

Zur Gewinnung der RNA aus Thrombozyten wurde das „RNeasy Kit“ von Qiagen den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Dabei wurden gewaschene Thrombozyten in einem Guanidiniumthiocyanat(GTC)-enthaltenden Puffer lysiert und homogenisiert. GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Das Lysat wurde auf eine Kieselgelmembran-Säule gegeben, die die RNA spezifisch bindet. Nach mehrfachem Waschen wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert (Mülhardt, 2009).

### **4.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösungen**

Die Konzentration von DNA und RNA in Lösungen wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) bestimmt. Der Reinheitsgrad der Probe ergibt sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) ( $A_{260}/A_{280}$ ). Bei einer reinen Protein-freien Nukleinsäurelösung liegt der Quotient bei 1,8-2,0 (Mülhardt, 2009).

### **4.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ermöglicht es, definierte DNA-Sequenzabschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Hierzu wird eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt, die einen DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang polymerisieren kann. Als Ausgangspunkt benötigt sie zwei Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereiches sind und somit das Zielgen flankieren.

Das Verfahren umfasst drei Reaktionsschritte, die sich zyklisch wiederholen: Denaturierung, Primeranlagerung (*Annealing*) und Elongation. Bei dem Denaturierungsschritt wird der parentale DNA-Doppelstrang durch Erhöhen der Temperatur ( $\approx 94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in Einzelstränge getrennt. Anschließend wird die Temperatur gesenkt ( $55\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), so dass es zur Hybridisierung der Primer an die DNA kommt. Zuletzt wird der Reaktionsansatz auf eine für die Polymerase optimale Arbeitstemperatur ( $68\text{-}72\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wieder erhöht. Diese bindet an das Primer/Matrizen-Hybrid-Molekül und fügt ausgehend von den gebundenen Primern Desoxyribonukleosidtriphosphate an, was zur Synthese des zur DNA-Matrize komplementären Zweitstrangs führt. Diese



Reaktionsfolge, bei der es zu einer Verdoppelung der DNA kommt, wird in der Regel 30-35 Mal wiederholt. Dies führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-Sequenz. Um eine vollständige Denaturierung der DNA-Matrize zu gewährleisten, wird die Dauer des initialen Denaturierungsschritts verlängert (3-5 min). Abschließend wird zur vollständigen Synthese des DNA-Produkts ein finaler Elongationsschritt von 5 min durchgeführt.

Die Temperatur für die Hybridisierung wird ausgehend von der Schmelztemperatur der Primer festgelegt (etwa 5 °C niedriger). Die Dauer der Elongationszeit ist von der Größe des zu synthetisierenden DNA-Fragments und der Prozessivität der Polymerase abhängig (Saiki *et al.*, 1988; Hermey *et al.*, 2011; Peters, 2004).

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle sind im Anhang (s. Absatz 10.5) aufgeführt.

#### **4.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten. Dabei wird ein Agarose-haltiges Gel in einem geeigneten Puffer mit der zu untersuchenden Probe beladen und eine Spannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern nun zur Anode. Durch die in der Gelmatrix vorhandenen Poren, die wie ein Molekularsieb wirken, wird die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erzeugt. Große Moleküle werden stärker zurückgehalten, während kleine Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können. Die Qualität der Auftrennung ist von der Konzentration der Agarose abhängig. Als Größenstandard werden DNA-Fragmente mit bekannter Größe verwendet (Peters, 2004).

Die Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt, auf ein horizontales Agarosegel in einer mit TAE-Laufpuffer befüllten Elektrophoresekammer geladen und eine Spannung von 140 V (300 mA) angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-2% verwendet. Zur Detektion der DNA wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml in TAE-Puffer) inkubiert (10 min, RT). Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht im sichtbaren Bereich. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mithilfe eines UV-Transilluminators.

#### **4.2.1.6. DNA-Isolierung und -Aufreinigung aus Agarose-Gelen und DNA-Lösungen**

Um ein gewünschtes DNA-Fragment nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR aus dem Reaktionsansatz zu isolieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und das betreffende DNA-Fragment aus dem Agarose-Gel extrahiert. Hierzu wurde die

entsprechende Bande durch Anregung mit langwelliger UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mithilfe des „Gel Extraction Kits“ von Qiagen den Herstellerangaben gemäß aus dem Gel isoliert. Dabei wurde zunächst die Gelmatrix aufgeschmolzen und auf eine Kieselgelmembran-Säule aufgetragen. Durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze bindet die Membran DNA. Nach mehrfachem Waschen wurde die DNA durch Erniedrigung der Salzkonzentration mit destilliertem Wasser eluiert.

Die Isolierung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte mit dem „QiAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen, welches ebenfalls auf dem Prinzip der Kieselgel/DNA-Interaktion und einer anschließenden Salzkonzentrations-abhängigen Elution beruht.

### **4.2.1.7. Restriktionsverdau**

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen des Typ II) spalten DNA an spezifischen Erkennungssequenzen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen (Nelson und Cox, 2001). Sie werden im Rahmen einer Klonierung dazu verwendet, DNA-Moleküle gezielt an definierten Stellen zu zerlegen, um sie in einer nachfolgenden Ligations-Reaktion an einen geeigneten Klonierungsvektor zu koppeln. Restriktionsenzyme benötigen für eine optimale Aktivität unterschiedliche Puffer, die sich in ihrem Salzgehalt unterscheiden.

In einem Reaktionsvolumen von etwa 20 µl wurden etwa 2 µg DNA mit der erforderlichen Menge des jeweiligen Restriktionsenzym 4 h bei 37 °C in einem geeigneten Puffer inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen des Reaktionsansatzes (75 °C, 10 min) inaktiviert. Wurde mit zwei Enzymen gleichzeitig inkubiert, wurden die Bedingungen entsprechend den Herstellerangaben angepasst.

### **4.2.1.8. Ligation**

DNA-Ligasen katalysieren über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung die Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Brown, 2002). Um ein DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor einzufügen, wurden 30 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss des zu integrierenden DNA-Fragments in Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase für 16 h bei 4 °C inkubiert. Der Ansatz wurde im Anschluss direkt zur Transformation eingesetzt.

### **4.2.1.9. Synthese komplementärer DNA durch reverse Transkription**

Die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA, *complementary DNA*) wurde unter Verwendung einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die die Transkription von RNA in DNA katalysiert, durchgeführt (Brown, 2002). Hierzu wurden

Oligo-dT-Primer verwendet, die an die Poly-A+-Sequenz der mRNA binden. Alle verwendeten Substanzen einschließlich der Polymerase entstammten dem ImProm-II™ Reverse Transcription System-Kit von Promega.

In einem Volumen von 20 µl wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

ImProm-II 5 x Reaktionspuffer	4,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (7 nM)	2,5 µl
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, je 0,5 mM)	1,0 µl
Ribonuklease Inhibitor (Recombinant RNasin)	0,5 µl
Oligo-dT-Primer (500 µg/ml)	1,0 µl
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNA	1,0 µg
Add 20 µl mit ddH <sub>2</sub> O	

Zur Primer-Hybridisierung an die RNA wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 25 °C gehalten. Durch die Temperaturerhöhung auf 42 °C wurde die cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase eingeleitet. Abschließend wurde das Enzym bei 72 °C für 15 min inaktiviert.

#### 4.2.1.10. Ortsspezifische Mutagenese

Mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese (engl. *site-directed mutagenesis*) kann die Funktion und Bedeutung einzelner Aminosäurereste eines Proteins untersucht werden. Dabei werden gezielt einzelne Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht, wodurch die Aminosäuresequenz verändert wird. Zur Einführung der Mutation Tyrosin→Alanin im Bereich der potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1 (AS 370, AS 480), wurde eine Mutation der Basen TA zu GC durchgeführt. Dies wurde mithilfe des QuickChangeII site-directed mutagenesis Kits (Agilent Technologies) gemäß den Herstellerangaben vorgenommen. Dabei wurde eine PCR durchgeführt, bei der ein Plasmid mit integrierter Basensequenz von OPHN1 als Matrize und zwei Primer, die die Basenmutation enthielten, eingesetzt wurden. Zur DNA-Synthese, ausgehend von den angelagerten Primern, wurde eine PfuUltra HF DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase verfügt aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität über eine Korrekturlese-Funktion (engl.: *proof reading*), welche die Korrektur falsch eingebauter Nukleotide ermöglicht und dadurch unerwünschte Mutationen in der Ziel-DNA verhindert (Brown, 2002). Als PCR-Produkt erhält man ein mutationstragendes, nicht-geschlossenes Plasmid. Zur Entfernung der parentalen Matrizen-DNA wurde der Reaktionsansatz mit

dem Restriktionsenzym *DpnI*, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet, behandelt. Das parentale Plasmid entstammt *E. coli* Bakterien, welche über ein dam-Methylierungssystem verfügen. Es ist demnach methyliert und wird von *DpnI* abgebaut. Das in der PCR amplifizierte mutationstragende Plasmid bleibt wegen fehlender Methylierung unbeeinträchtigt (Mülhardt, 2009). Die Plasmide wurden in *E. Coli* Bakterien transformiert, in denen die PCR-Fragmente ligiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen auf Agar-Platten ausplattiert, Einzelklone durch Inokulation amplifiziert und die Plasmide aus den Bakterien isoliert (s. Abschnitt 4.2.1.11 und 4.2.1.12). Die eingeführte Mutation wurde durch Sequenzierung nach Sanger verifiziert.

### **4.2.1.11. Transformation kompetenter Bakterien (durch Hitzeschock)**

Die Transformation, das Einbringen von DNA in Bakterien, dient zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA im Rahmen einer Klonierung. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension von kompetenten *E. Coli*-Bakterien mit 10-30 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem 42-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Aus bisher nicht geklärten Gründen nehmen die Bakterien so die DNA auf (Nelson und Cox, 2001). Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C in einem Rotationsschüttler bei 225 rpm inkubiert. Der Ansatz wurde zur Vereinzellung der Bakterien auf Agar-Platten mit Selektivmedium ausgestrichen und für 16-20 h bei 37 °C im Brutschrank belassen.

### **4.2.1.12. Präparation von Plasmid-DNA**

Nach der Transformation und Vereinzellung von Bakterien wurden einzelne Bakterienstämme von der Agar-Platte aufgenommen und LB-Selektivnährmedium mit den Bakterien angeimpft (Inokulation), um letztere zu amplifizieren (ü.N., 37 °C, 225 rpm). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe von DNA-Präparations-Kits (Qiagen; je nach Bedarf Mini-, Midi- oder Maxipräparation) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse aus den Bakterien freigesetzt. Anschließend folgte ein Neutralisierungsschritt und die lysierten Bakterien wurden durch Zentrifugation (bei Midi- und Maxipräparationen durch Filtration) abgetrennt. Die DNA wurde an eine Kieselgelmembran-Säule (Minipräparation) oder an eine Ionenaustauscher-Membran (Midi- und Maxipräparationen) gebunden und nach mehrfachem Waschen durch Änderung der Salzkonzentration eluiert.

#### **4.2.1.13. Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseohren**

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde aus den bei der Ohr-Markierung anfallenden Lochstanzen die genomische DNA isoliert, um diese mittels PCR zu charakterisieren. Die DNA-Isolierung erfolgte mithilfe des „DNeasy Blood and Tissue Kits“ (Qiagen). Dabei wurde das Gewebe in Lysepuffer unter Zugabe von Proteinase K bei 56 °C 4 h schüttelnd lysiert. Die DNA wurde an eine Kieselgelmembran-Säule gebunden und nach mehrfachem Waschen durch Änderung der Salzkonzentration eluiert.

#### **4.2.1.14. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit generierten Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC mit der Didesoxy-Terminationsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

### **4.2.2. Zellbiologische Methoden**

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sämtliche zellbiologische Arbeiten unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Lösungen und Materialien wurden durch Autoklavieren sterilisiert (120 °C, 1 bar Überdruck).

#### **4.2.2.1. Kultivierung von A5-CHO-Zellen**

Die A5-CHO Zellen wurden in DMEM-Kulturmedium unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle 3-4 Tage subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst (5-10 min, 37 °C). Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von frischem Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (310 g, 5 min) und das Sediment mit einer Zelldichte von ca. 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Kulturmedium ausgesät.

#### **4.2.2.2. Transiente Transfektion von A5-CHO-Zellen**

Für die transiente Transfektion wurden A5-CHO-Zellen in einer Dichte von 200.000 Zellen/ml in Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert, bis sie zu ca. 80% konfluent waren (~ 24 h). Zur Transfektion wurden 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl des Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 in DMEM vereint (Reaktionsvolumen: 250 µl) und 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Lipid-Gemisch auf die Zellen gegeben und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde ausgewechselt und die Zellen für 24 h bis zur Versuchsdurchführung kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde über einen

immunologischen Nachweis des Zielproteins mittels Western Blot-Analyse (s. Abschnitt 4.2.3.4) überprüft.

### **4.2.3. Proteinbiochemische Methoden**

#### **4.2.3.1. Zellyse**

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Lysepuffer A (Detergens: NP-40) unter Zugabe von Proteinase-Inhibitoren (1 x *Complete Proteinase Inhibitor Cocktail*) bei 4 °C lysiert (Thrombozyten: 20 min, A5-CHO-Zellen: 45 min). Die Lysate wurden zentrifugiert (20800 g, 4 °C, 5 min) und die Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford (s. Abschnitt 4.2.3.2) bestimmt.

#### **4.2.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dabei wird der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 als Indikator eingesetzt. Durch Komplexbildung mit Proteinen ändert sich dessen Farbe von orange zu blau. Dieser Farbumschlag kann mittels photometrischer Messung gemessen werden. Als Standard-Protein wurde BSA eingesetzt.

#### **4.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Trennung und Charakterisierung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse. Die Methode basiert auf der Wanderung von geladenen Proteinen in einem elektrischen Feld. Die Elektrophorese wird in einer Gelmatrix auf Polyacrylamid-Basis durchgeführt, die als Molekularsieb fungiert. Bei Zugabe des Detergens Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) bindet dieses an die Proteine und es werden negativ geladene SDS-Protein-Komplexe gebildet. In diesen Komplexen ist die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar, wodurch sie ein ähnliches Ladungs-Masse-Verhältnis besitzen. Darüber hinaus denaturiert SDS die Proteine - besonders nach vorausgehender Reduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol. Somit trennt die SDS-Elektrophorese Proteine fast ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts, wobei kleinere Polypeptide schneller wandern als große Proteine. Zur Abschätzung des Molekulargewichts eines Proteins werden Marker-Proteine, Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht, eingesetzt. (Laemmli, 1970; Nelson und Cox, 2001).

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit reduzierendem Laemmli-Probenpuffer (10%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die

Gesamtproteinmenge je Probe betrug 50 µg. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 400 mA (Laufzeit ca. 90 min). Die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden nach dem unten dargestellten Pipettierschema hergestellt (Tabelle 4-17):

**Tabelle 4-17: Pipettierschema für Polyacrylamid-Gele für die Gelelektrophorese**

Lösung	Sammelgel (5%)	Trenngel (8,5%)	Trenngel (12%)
H <sub>2</sub> O	3,4 ml	4,5 ml	3,3 ml
Sammelgelpuffer	0,625 ml		
Trenngelpuffer		2,5 ml	2,5 ml
30% Acrylamid	0,85 ml	2,8 ml	4,0 ml
10% (w/v) SDS	50 µl	100 µl	100 µl
10% (w/v) APS	50 µl	80 µl	80 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl

#### 4.2.3.4. Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Bei der Western Blot-Methode werden Proteine, die zuvor durch Gelelektrophorese getrennt wurden, elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Membran (hier: PVDF) übertragen. Auf dieser können sie daraufhin detektiert werden.

Der elektrische Transfer der Proteine erfolgte im *Semi-Dry*-Verfahren. Nach der Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden das Gel, das die aufgetrennten Proteine enthielt, sowie zwei Filterpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Außerdem wurde eine Transfermembran in Methanol äquilibriert. Auf die horizontale Oberfläche des Transfergerätes wurden ein Filterpapier, die Membran, das SDS-Gel und zuletzt das zweite Filterpapier aufeinander gelegt. Der Transfer erfolgte bei 80 mA und 10 V (1 ½ h).

#### 4.2.3.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die auf einer PVDF-Membran immobilisierten Proteine können immunologisch nachgewiesen bzw. identifiziert werden. Hierzu wurde die Membran mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS inkubiert (1 h, RT), um unspezifische Bindungen der Antikörper an freie Bindungsstellen zu verhindern. Die Membran wurde für 1 h bei RT (oder über Nacht, 4 °C) mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS-T entfernt und die Membran wurde mit einem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet war,

inkubiert (1 h, RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proteine mithilfe eines Fluoreszenzdetektors (Anregungslicht im Infrarotbereich) sichtbar gemacht.

#### **4.2.3.6. Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation oder Ko-Immunpräzipitation von Proteinen diente in dieser Arbeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie der Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen. Bei dieser Methode wird ein Protein über einen Antikörper, der an eine feste, stationäre Phase (hier: Protein Sepharose G) gekoppelt wird, aus einer Lösung, meist ein Zellysat, gefällt (Präzipitation). Anschließend werden die Interaktionspartner des Proteins mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot detektiert.

Bei einer Untersuchung der Phosphorylierung wurden die Proteine mithilfe des Antikörpers 4G10 präzipitiert. 4G10 bindet spezifisch phosphoryliertes Tyrosin und kann so alle derart phosphorylierten Proteine aus dem Lysat extrahieren.

Die zu untersuchenden Zellen wurden lysiert und mit 3 µg des entsprechenden Antikörpers inkubiert (1 h, 4 °C). Die Protein G Sepharose wurde zugegeben und die Probe über Nacht inkubiert (4 °C). Nach mehrmaligem Waschen der Sepharose wurde die Probe mit reduzierendem Laemmli-Probenpuffer versetzt und erhitzt (95 °C), was die Trennung von Antikörper und Sepharose zur Folge hatte. Es folgte eine immunologische Analyse der Probe.

#### **4.2.3.7. Untersuchung der Rho-GTPasen-Aktivität (G-LISA®)**

Die Quantifizierung der aktiven GTP-gebundenen Rho-GTPasen in Thrombozyten und A5-CHO-Zellen erfolgte mit den G-LISA®-Kitsystemen (Cytoskeleton). Das Messprinzip beruht, wie bei einem ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), auf der immunologischen Detektion von Proteinen nach Immobilisierung auf einer Oberfläche. Im Fall des G-LISA®-Kitsystems ist die Oberfläche mit Proteinen beschichtet, die spezifisch die aktive GTP-gebundene Form der Rho-GTPasen, nicht aber die GDP-gebundene Form bindet.

Gewaschene Thrombozyten oder A5-CHO-Zellen wurden lysiert und die Lysate anschließend zentrifugiert [2 min, 10600 g (RhoA), 8600 g (Cdc42) oder 20800 g (Rac1), je 4 °C]. Die GTP-Rho-affine Oberfläche wurde mit dem Überstand inkubiert [30 min (RhoA, Rac1) oder 15 min (Cdc42), 4 °C]. Nach wiederholtem Waschen wurde die Oberfläche mit einem spezifischen gegen die jeweilige GTPase gerichteten Primär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit einem sekundären Antikörper, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt war, inkubiert.



Nach Zugabe eines HRP-Substrats katalysiert HRP dessen Oxidation, wodurch eine Farbreaktion entsteht, die kolorimetrisch gemessen werden kann. Die Farbintensität wurde mithilfe eines Mikroplatten-Readers bei 490 nm gemessen.

#### **4.2.4. Funktionelle Untersuchung von murinen Thrombozyten und A5-CHO-Zellen**

##### **4.2.4.1. Blutentnahme aus der Maus**

Die Mäuse wurden mittels Isofluran narkotisiert. Nach Erlöschen der Schmerzreflexe wurde die Blutentnahme durch Punktion des retrobulbären Augenplexus mithilfe einer heparinisierten Kapillare durchgeführt. Das Blut wurde in Reaktionsgefäßen mit Heparin-Lösung oder ACD-Puffer aufgefangen. Zur Flüssigkeitsrekonstitution wurde den Tieren 0,9% NaCl subkutan injiziert.

##### **4.2.4.2. Bestimmung der Thrombozytenkonzentration**

Die Thrombozytenkonzentration sowie das mittlere Thrombozytenvolumen wurden nach der Blutabnahme mithilfe eines automatischen Hämatologie-Analysators ermittelt. Die Analyse beruht auf der Messung des elektronischen Widerstands, der sich verändert, sobald die Zellen in das Messmedium eintreten.

##### **4.2.4.3. Isolierung und Aufreinigung von Thrombozyten**

Nach der Abnahme wurde das Blut zentrifugiert (264 g, 5 min, RT) und der Überstand (obere Phase sowie Interphase) abgenommen. Zur Gewinnung von Thrombozytenreichem Plasma (PRP, *platelet-rich plasma*), wurde der Überstand nochmals zentrifugiert (52 g, 6 min, RT) und die obere Phase (PRP) abgenommen.

Um gewaschene Thrombozyten zu erhalten, wurde das PRP zentrifugiert (640 g, 5 min, RT) und das Thrombozyten-Pellet zweimal mit Tyrode-Lösung gewaschen. Für den Einsatz in funktionellen Analysen wurde die Thrombozytensuspension mit CaCl<sub>2</sub> (finale Konzentration: 1 mM) ergänzt.

##### **4.2.4.4. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Größe und der Granularität von Zellen sowie zum Nachweis von Proteinen in oder auf Zellen. Suspendierte Einzelzellen werden an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeführt. Das dabei erzeugte, charakteristische Streulicht wird von einem Detektor separat ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Lichtbeugung an der Zelle im flachen Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (0,5-10°) und verhält sich

proportional zur Größe der Zelle. Die Strahlen, die direkt auf die Zelle treffen, und durch Komponenten des Zellinneren zur Seite hin abgelenkt werden (90°), werden als Seitwärtsstreuung (SSC, *side scatter*) bezeichnet. Diese Lichtbrechung wird von der Granularität der Zelle beeinflusst. Bei Behandlung der Zellen mit Fluorochromen bzw. Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, können durch das detektierte Fluoreszenzlicht zusätzliche Informationen beispielsweise über die Expression von Proteinen, die Differenzierung der Zelle oder das Membranpotential gewonnen werden (Macey, 2007).

### **Untersuchung der Oberflächenrezeptoren**

Zur Analyse der Glykoproteinrezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten wurde heparinisiertes Vollblut zweimal mit Tyrode-Lösung gewaschen (640 g, 5 min, RT). Die Thrombozytensuspension wurde mit den entsprechenden Antikörpern versetzt (30 min, RT). Nach Verdünnung mit PBS (1:10) erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

### **Quantifizierung von P-Selectin**

Zur Quantifizierung von P-Selectin auf der Oberfläche von Thrombozyten wurde heparinisiertes Vollblut zweimal mit Tyrode-Lösung gewaschen (640 g, 5 min, RT). Nach Zugabe von 1 mM CaCl<sub>2</sub> wurde die Thrombozytensuspension mit einem anti-P-Selectin-Antikörper sowie mit den entsprechenden Agonisten versetzt (30 min, RT). Nach Verdünnung mit PBS (1:10) erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

### **Untersuchung der Fibrinogen-Bindung**

Zur Analyse der Fibrinogen-Bindung von Thrombozyten wurden gewaschene Thrombozyten in Tyrode-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM CaCl<sub>2</sub> wurde die Thrombozytensuspension mit einem anti-Fibrinogen-Antikörper sowie mit den entsprechenden Agonisten versetzt (30 min, RT). Nach Verdünnung mit PBS (1:10) erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

#### **4.2.4.5. Untersuchung der Adhäsion und Spreading-Dynamik von murinen Thrombozyten und A5-CHO-Zellen**

Zur Analyse der Adhäsion und der Pseudopodienausbildung wurden Glas-Deckgläser mit humanem Fibrinogen (1 mg/ml) oder fibrillärem Kollagen vom Typ I (200 µg/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet und anschließend mit 1% BSA in PBS blockiert (RT, 1 h). Gewaschene Thrombozyten wurden in Tyrode-Lösung unter Zusatz von 1 mM CaCl<sub>2</sub> (10<sup>5</sup> Thrombozyten/µl) suspendiert. Die Thrombozyten wurden - unmittelbar bevor sie auf die beschichteten Deckgläschen aufgetragen wurden - mit 0,008 U/ml Thrombin oder 0,5

µg/ml CRP aktiviert. A5-CHO-Zellen wurden ohne zusätzliche Aktivierung in PBS auf die Deckgläschen gegeben.

Die adhärennten Zellen wurden nach 45 min (Thrombozyten) bzw. 1 h (A5-CHO-Zellen) mit 2% Formaldehyd fixiert (15 min, RT). Zur Darstellung von intrazellulären Strukturen oder Proteinen wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X 100 permeabilisiert (15 min, RT). Über eine immunologische Detektion wurden die entsprechenden Proteine sichtbar gemacht. Hierzu wurden sie 1 h mit einem primären Antikörper inkubiert, gewaschen und anschließend 1 h mit einem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper behandelt. Zur Darstellung des Zytoskeletts wurden die permeabilisierten Zellen 1 h mit Rhodamin-Phalloidin (rot) oder Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) mit einer Verdünnung von 1:300 inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Eindeckmedium eingebettet und es wurden Aufnahmen von verschiedenen mikroskopischen Bereichen gemacht (Lichtmikroskop mit DIC-Prisma für Durchlichtaufnahmen und konfokales Mikroskop für Fluoreszenzaufnahmen).

#### **4.2.4.6. Untersuchung der ATP-Freisetzung**

Die Freisetzung von ATP aus den elektronendichten Granula von Thrombozyten wurde mithilfe eines Luciferin-Luciferase-Systems gemessen. Durch die enzymatische Aktivität von Luciferasen reagieren Luciferine zusammen mit Sauerstoff und ATP zu energiereichen, instabilen Substanzen, bei deren Zerfall Licht freigesetzt wird. Durch Detektion dieser Biolumineszenz kann die ATP-Konzentration einer Probe bestimmt werden.

Zur Messung der ATP-Freisetzung von Thrombozyten wurde das ChronoLume Luciferin-Testsystem (ChronoLog) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Gewaschene Thrombozyten wurden in Tyrode-Lösung unter Zusatz von 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 µg/ml humanen Fibrinogen suspendiert (225.000 Thrombozyten/µl). Nach Inkubation mit der Luciferase (2 min, RT) wurden die entsprechenden Agonisten zugegeben und die entstehende Lumineszenz mit einem Lumineszenz-Detektionsgerät gemessen (10 min, 37 °C, 1.000 rpm Rührgeschwindigkeit). Die Datenanalyse wurde mit der Software aggroLink8 durchgeführt.

#### **4.2.4.7. Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten**

Das Aggregationsvermögen von Thrombozyten wurde mithilfe eines Licht-Transmissions-Aggregometers gemessen. Die durch ein stimulierendes Agens induzierte Aggregation führt in einer Thrombozytensuspension zu einer erhöhten Lichtdurchlässigkeit. Die

Zunahme der Lichttransmission steht in Korrelation mit der Thrombozytenaggregation und kann durch ein Aggregometer erfasst werden (Born, 1962).

Gewaschene Thrombozyten wurden in Tyrode-Lösung unter Zusatz von 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 µg/ml humanen Fibrinogen suspendiert (225.000 Thrombozyten/µl). Nach Zugabe der entsprechenden Agonisten wurde die Lichttransmission mit einem Aggregometer gemessen (10 min, 37 °C, 1.000 rpm Rührgeschwindigkeit). Die Datenanalyse wurde mit der Software aggroLink8 durchgeführt.

#### **4.2.4.8. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden freie Elektronen durch das Anlegen einer Spannung beschleunigt und durch das zu mikroskopierende Präparat gelenkt. Dort erfahren sie - je nach Elektronendichte des Atoms, auf das der Elektronenstrahl trifft - eine Streuung, deren Detektion Informationen über die Beschaffenheit der Probe geben. Durch die geringe Wellenlänge der Elektronen kann bei der Elektronenmikroskopie ein Auflösungsvermögen bis in den Bereich von atomaren Abständen erreicht werden (Emschermann, 1999).

Gewaschene Thrombozyten wurden durch Zugabe von vorgewärmter Karnovsky-Lösung fixiert (10 min, 37 °C) und in 3,5% Agarose eingebettet (37 °C). Nach Koagulation der Agarose (RT) wurde nochmals mit Karnovsky-Lösung fixiert. Die Probe wurde mit 1% Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Kakodylpuffer unter Zusatz von 1,5% Kaliumhexacyanoferrat nachfixiert (2 h). Die Blöcke wurden in Glycidether eingebettet und mit einem Ultramikrotom geschnitten. Die Schnitte (30 nm) wurden auf Kupfergitter aufgebracht und mittels eines Transmissionselektronenmikroskops bei einer Spannung von 120 kV analysiert.

#### **4.2.4.9. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

In einem Rasterelektronenmikroskop wird ein gebündelter Elektronenstrahl über die Oberfläche des zu untersuchenden Präparats geführt. Die beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe entstehenden Sekundärelektronen werden erfasst und zur Bilddarstellung verwendet. Es entsteht eine plastische Abbildung der Objekt Oberfläche. Zu diesem Zweck muss die Probe zuvor durch Bedampfung mit einem Edelmetall (z.B. Gold) leitend gemacht werden. Mit dem REM können Strukturen mit einem Auflösungsvermögen von bis zu wenigen Nanometern untersucht werden (Lexikon der Biologie, 1999).

Glasdeckgläschen wurden mit humanem Fibrinogen (1 mg/ml, 4 °C, über Nacht) beschichtet und mit 1% BSA in PBS (1 h, RT) blockiert. Gewaschene Thrombozyten

wurden in Tyrode-Lösung suspendiert ( $10^5$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ ) und auf die Fibrinogen-Oberfläche aufgetragen. Die adhärenen Thrombozyten wurden mit 2% Glutaraldehyd (EM-Grade) fixiert und anschließend in einer steigenden Alkoholreihe entwässert. Die Proben wurden in  $\text{CO}_2$  einer überkritischen Trocknung unterzogen. Zuletzt wurde mithilfe eines Kathodenzerstäubers eine 20 nm dicke Goldschicht aufgedampft. Die Probenanalyse erfolgte bei einer Spannung (Elektronenstrahl) von 15 kV mit einem Rasterelektronenmikroskop.

#### **4.2.4.10. Untersuchung der Thrombusbildung**

Zur Untersuchung der Thrombusbildung unter Flussbedingungen von murinem Vollblut wurden Glasdeckgläser mit 100  $\mu\text{g/ml}$  fibrillärem Kollagen vom Typ I beschichtet (4 °C, über Nacht) und anschließend mit 5% BSA in PBS blockiert (1 h, RT). Heparinisiertes Vollblut wurde mit Tyrode-Lösung 1:3 verdünnt und durch eine transparente Flusskammer (Flussbetthöhe: 50  $\mu\text{m}$ , -breite: 5 mm) über die mit Kollagen beschichtete Oberfläche perfundiert. Angewendet wurden Scherraten von 450  $\text{s}^{-1}$  (4 min Perfusion), 700  $\text{s}^{-1}$  (4,5 min Perfusion) und 1000  $\text{s}^{-1}$  (5 min Perfusion). Anschließend wurde die Kammer mit Tyrode-Lösung gespült und es wurden Aufnahmen von verschiedenen mikroskopischen Bereichen gemacht (x 20 Objektiv). Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm AxioVision. Als Maß für die Thrombusbildung wurde der prozentuale Anteil der mit Thromben bedeckten Fläche an der Gesamtfläche angelegt.

#### **4.2.5. Bestimmung der Schwanzblutungszeit OPHN1-defizienter Mäuse**

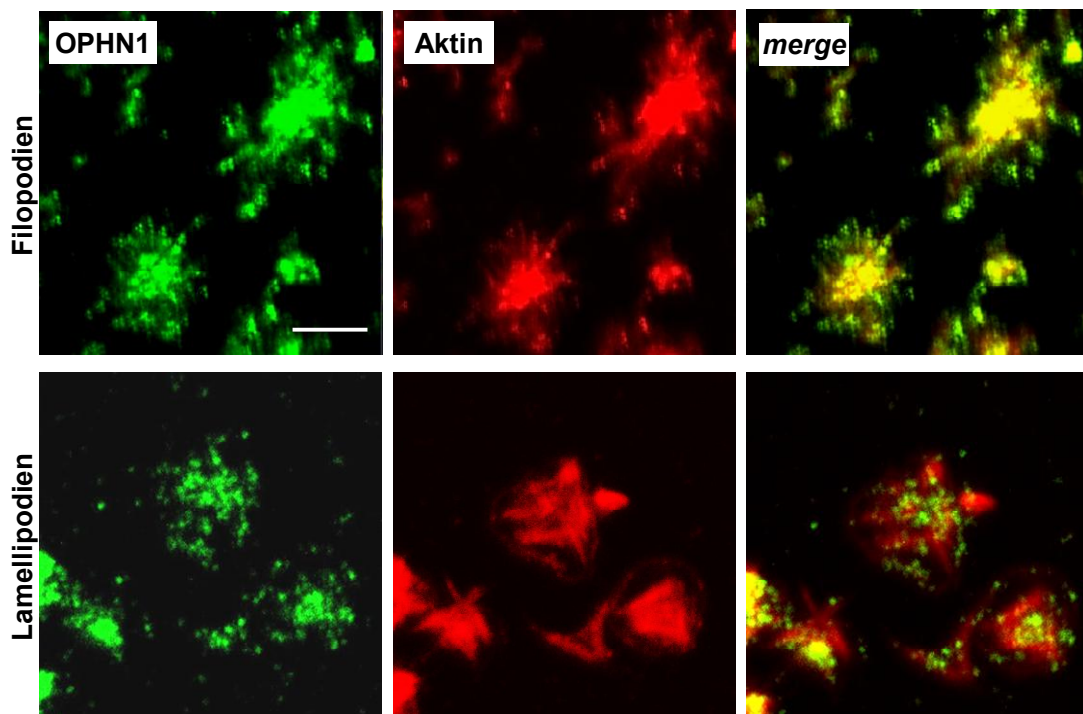
Zur Bestimmung der Schwanzblutungszeit wurden Mäuse mit einer Mischung aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl anästhesiert. Nach Überprüfung der Schmerzreflexe wurden ca. 3 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgeschnitten. Zur Bestimmung der Blutungszeit wurde das austretende Blut alle 20 s mit einem Filterpapier absorbiert, ohne dabei mit der Wunde selbst in Kontakt zu kommen. War kein Blut mehr auf dem Filterpapier zu sehen, wurde die Blutung als gestillt betrachtet. Trat keine Blutstillung ein, wurde das Experiment nach 20 min abgebrochen. Den Tieren wurde das Schmerzmittel Carprofen verabreicht und die Narkose wurde anschließend mit Atipamezol und Flumazenil antagonisiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Lokalisation von OPHN1 in Thrombozyten

#### 5.1.1. OPHN1 ist in Thrombozyten am Zytoskelett lokalisiert

Um die intrazelluläre Verteilung von OPHN1 in Thrombozyten zu untersuchen, wurden OPHN1 und filamentöses Aktin (F-Aktin) in adhärenenten murinen WT-Thrombozyten mittels Fluoreszenzfärbung visualisiert. Dabei konnte OPHN1 sowohl im zentralen Thrombozytenkörper als auch in den Filopodien und den Lamellipodien detektiert werden (s. Abbildung 5-1). Außerdem zeigte sich eine deutliche Kolokalisierung von OPHN1 und dem polymerisierten Aktin.



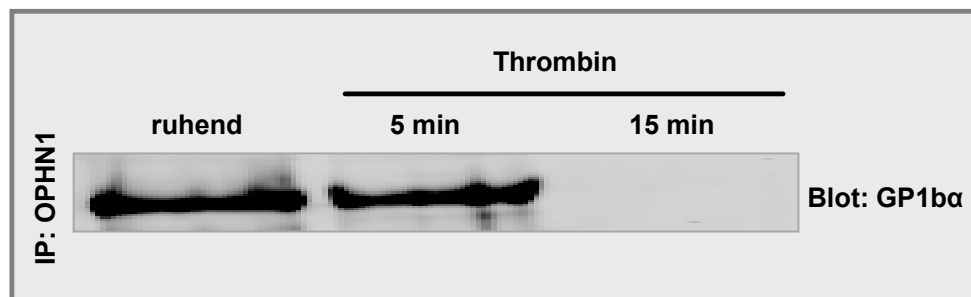
**Abbildung 5-1: OPHN1 kolokalisiert in Thrombozyten mit filamentösem Aktin.**

Murine WT-Thrombozyten nach 45 min *Spreading* auf Fibrinogen (1 mg/ml) und Immunfärbung von OPHN1 (grün) und filamentösem Aktin (rot). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Signale. Bei gelben Bereichen kann von einer Kolokalisation der beiden Proteine ausgegangen werden. Repräsentative Bilder, aufgenommen mittels konfokaler Mikroskopie (63x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 5  $\mu$ m.

#### 5.1.2. OPHN1 interagiert in Thrombozyten mit GP1b $\alpha$

Über eine Ko-Immunpräzipitation konnte weiterhin eine Interaktion zwischen OPHN1 und GP1b $\alpha$ , der Liganden-bindenden Untereinheit des thrombozytenspezifischen Rezeptorkomplexes GP1b/V/IX, in murinen WT-Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung der beiden Proteine war sowohl in ruhenden Thrombozyten als auch für einen definierten Zeitraum nach ihrer Aktivierung zu sehen (s. Abbildung 5-2). Nach 48

einem längeren Aktivierungszeitraum (15 min) war jedoch keine Interaktion mehr zu entdecken.



**Abbildung 5-2: OPHN1 interagiert in Thrombozyten mit GP1bα.**

Murine WT-Thrombozyten wurden mit 2 U/ml Thrombin stimuliert und lysiert. Anschließend wurde OPHN1 aus dem Lysat immunpräzipitiert und GP1bα im Western Blot nachgewiesen.

## 5.2. Charakterisierung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten

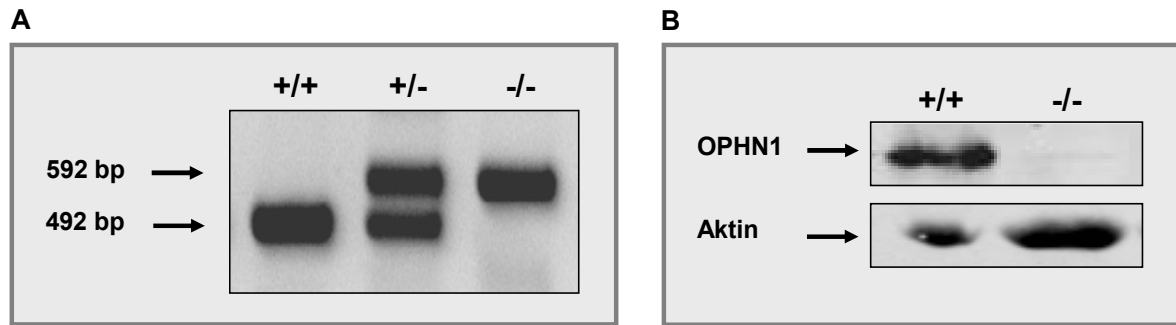
### 5.2.1. Zucht und Haltung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse

Um die Rolle von OPHN1 in Thrombozyten zu charakterisieren, wurden Mäuse mit einem konstitutiven OPHN1-Gen-*Knockout* (*ophn1*<sup>-/-</sup>) untersucht. Hinsichtlich der Wurfrate, der Lebensdauer, der körperlichen Konstitution sowie ihres Verhaltens konnten bei den transgenen Tieren keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den WT-Mäusen festgestellt werden.

### 5.2.2. Nachweis des OPHN1-Gen-*Knockouts* auf DNA- und Protein-Ebene

Der Genotyp der Versuchsmäuse wurde durch die PCR-Analyse genomischer DNA aus Ohrbiopsien ermittelt. Die im Laufe der Genmutation integrierte DNA-Sequenz ergab einen Größenunterschied von 100 bp zwischen dem WT- und dem *ophn1*<sup>-/-</sup>-PCR-Produkt (WT: 492 bp, *ophn1*<sup>-/-</sup>: 592 bp) (s. Abbildung 5-3).

Zusätzlich wurde zum Nachweis des *Knockouts* die Expression von OPHN1 in den Thrombozyten von *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mithilfe eines spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert (s. Abbildung 5-3). In den Thrombozyten der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte kein OPHN1 nachgewiesen werden, was die fehlende Expression bestätigte.

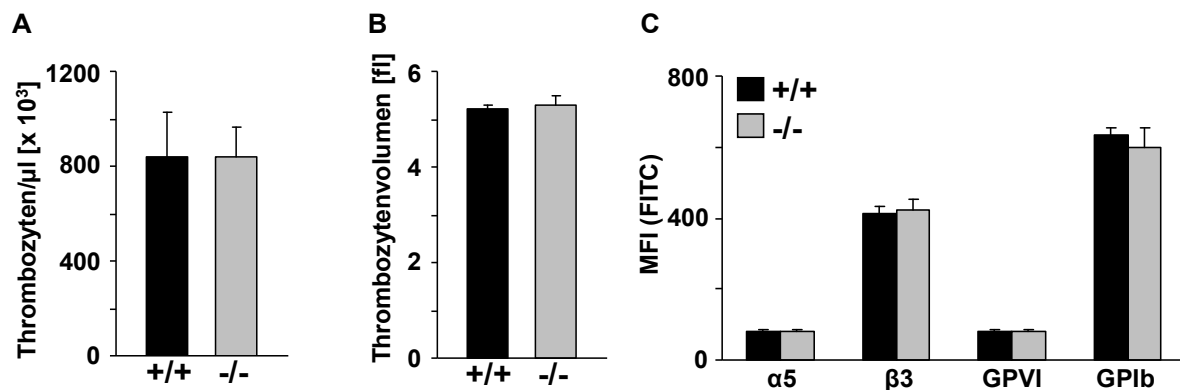


**Abbildung 5-3: Nachweis des OPHN1-Gen-Knockouts in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten.**

- (A) Genotypisierung einer WT-, einer heterozygoten und einer *ophn1*<sup>-/-</sup>-Maus mittels PCR-Analyse. Bei WT-Tieren entsteht ein Fragment von 492 Basenpaaren (bp) und bei *ophn1*<sup>-/-</sup>-Tieren ein Fragment von 592 bp. Bei heterozygoten Tieren entsteht eine Doppelbande.
- (B) Thrombozyten aus WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden lysiert und OPHN1 wurde im Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Aktin.

### 5.2.3. Bestimmung der Thrombozytenzahl und des Thrombozytenvolumens

Eine Analyse der Thrombozytenzahl im Vollblut mithilfe eines Hämatologie-Analysators ergab keinen Unterschied zwischen WT- und den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Auch das Volumen der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten war in ihrem ruhenden Zustand mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar. Weiterhin zeigte eine durchflusszytometrische Analyse eine normale Expression verschiedener für die Thrombozytenfunktion essentieller Glykoproteinrezeptoren (bzw. deren Untereinheiten) auf der Oberfläche von *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten (s. Abbildung 5-4).



**Abbildung 5-4: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine normale Thrombozytenzahl und ein normales Volumen sowie eine unveränderte Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf.**

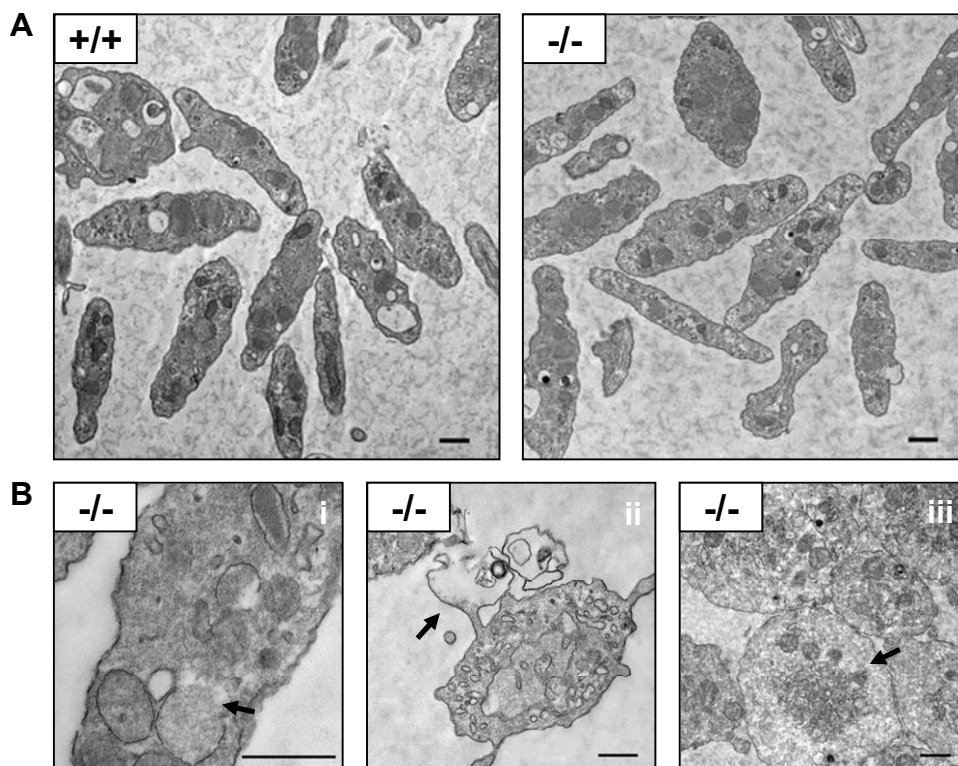
- (A) Mittlere Thrombozytenzahl im Vollblut von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 12 pro Gruppe)
- (B) Mittleres Thrombozytenvolumen von ruhenden WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 12 pro Gruppe)
- (C) Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Glykoproteine auf der Oberfläche von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 8 pro Gruppe)



#### 5.2.4. Morphologische Charakterisierung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten

Um den Einfluss der OPHN1-Defizienz auf die Thrombozytenmorphologie zu untersuchen, wurden die *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops untersucht. Hierzu wurden die gewaschenen Thrombozyten in Suspension fixiert und eingebettet. Zur Untersuchung wurden die Blöcke in ultradünne Scheiben geschnitten.

Die Aufnahmen zeigten, dass einige der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten ohne eine Behandlung mit stimulatorischen Substanzen charakteristische Merkmale von Präaktivierung aufwiesen. Dazu gehörte eine Lokalisation der Speichergranula, die teilweise schon entleert waren, in der Nähe der Plasmamembran. Bei anderen Thrombozyten war eine Konzentrierung von Aktin in der Zellmitte zu beobachten (s. Abbildung 5-5 B). Der Großteil der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten hatten dagegen eine für ruhende Thrombozyten typische Zellmorphologie und Zytoplasmastruktur (s. Abbildung 5-5 A).



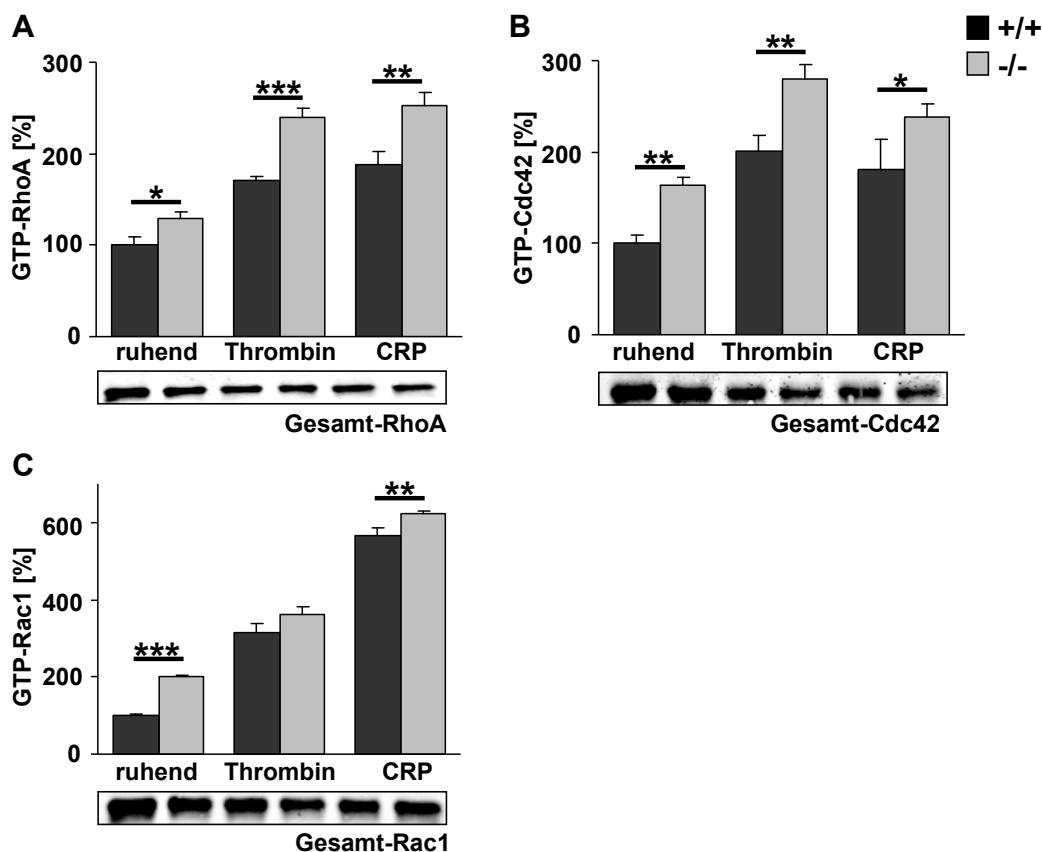
**Abbildung 5-5: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine erhöhte Anfälligkeit für Aktivierung auf.**

Repräsentative Bilder von Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 0,5  $\mu\text{m}$ , mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Martin Schaller).

- (A) *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten haben eine für Thrombozyten typische Zellmorphologie und Zytoplasmastruktur.
- (B) Einige *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen Merkmale von Präaktivierung auf; darunter eine Lokalisation der Speichergranula in Membrannähe und deren partielle Degranulierung (i, ii) sowie eine Konzentration von Aktin in der Zellmitte (iii).

### 5.2.5. Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten

Da OPHN1 als Regulator der drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 beschrieben ist, sollte der Einfluss des OPHN1-Funktionsverlustes auf die Aktivität dieser Rho-GTPasen in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten untersucht werden. Hierzu wurde die Menge an aktivem GTP-gebundenen RhoA, Cdc42 und Rac1 im Lysat von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten mittels G-LISA® bestimmt, einem für GTP-gebundene Rho-GTPasen spezifischen ELISA-System.



**Abbildung 5-6:** Die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 ist in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten erhöht.

Quantifizierung der aktiven GTP-gebundenen Rho-GTPasen im Lysat von WT und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten mittels G-LISA®. Sowohl im ruhenden Zustand als auch nach Stimulation mit 0,2 U/ml Thrombin und 20 µg/ml CRP ist das Level an GTP-gebundenem RhoA (A), Cdc42 (B) und Rac1 (C) in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten signifikant erhöht. Dargestellt ist der Mittelwert der optischen Dichte ± SD (OD der unstimulierten WT-Thrombozyten = 100%) (n = 2-4 pro Gruppe, \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001). Ein Nachweis der Gesamt-Expression der drei Rho-GTPasen wurde mittels Western Blot durchgeführt (unterhalb der Diagramme).

Bereits im Ruhezustand war die Menge der aktiven Form bei allen drei Rho-GTPasen in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten signifikant erhöht (s. Abbildung 5-6). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin (0,2 U/ml) und CRP (20 µg/ml) stieg das Level der Rho-GTPasen sowohl in den WT- als auch in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten erwartungsgemäß an. Dennoch war auch hier der Anteil an aktivem RhoA, Cdc42 und Rac1 in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-

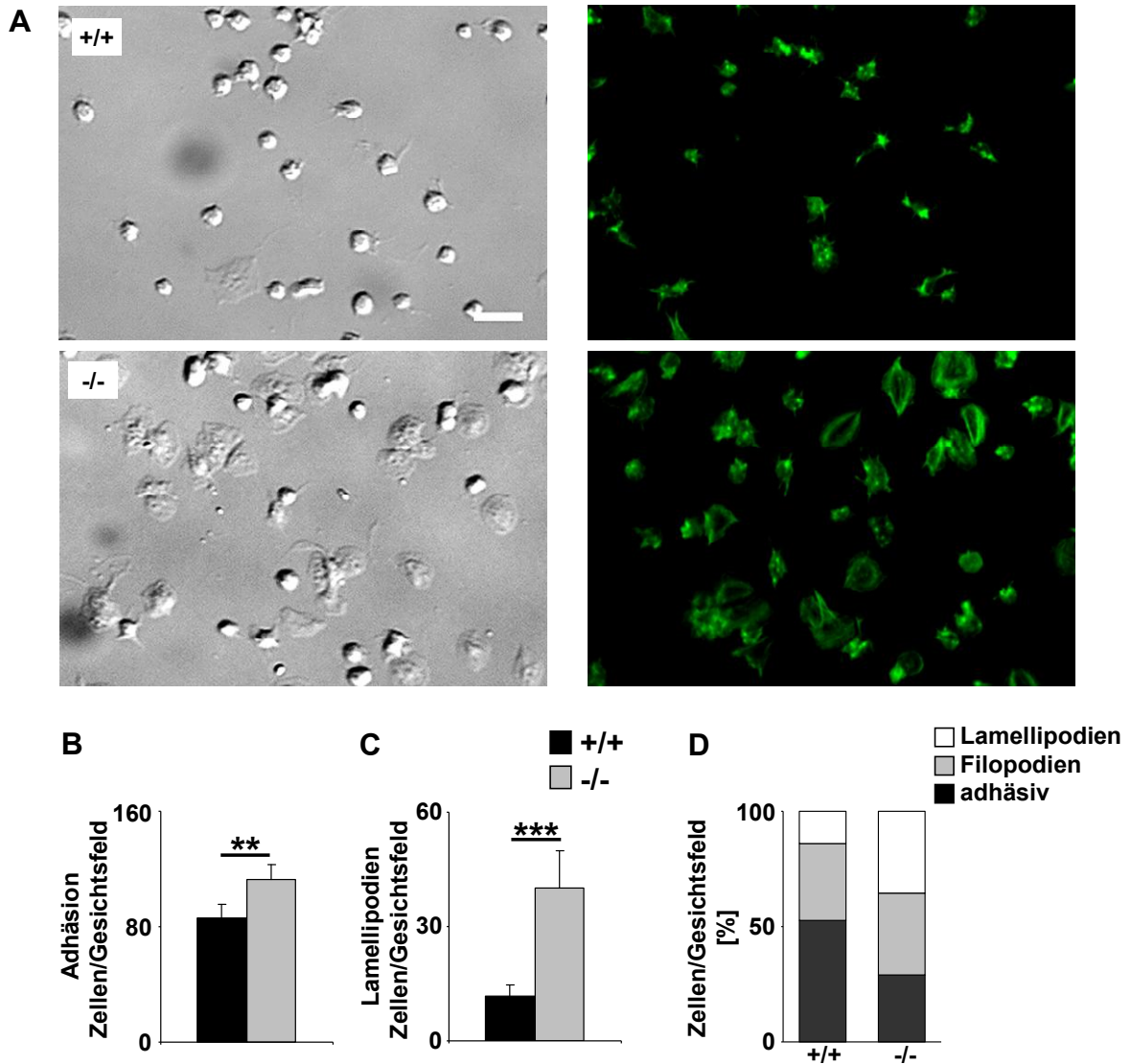
Thrombozyten deutlich erhöht. Die Gesamt-Expression der Rho-GTPasen war in den WT- und den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten gleich, wie ein Nachweis im Western Blot zeigte.

#### **5.2.6. *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten weisen eine erhöhte Zytoskelettdynamik auf**

Die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 sind essentielle Regulatoren von zytoskeletalen Prozessen in Thrombozyten. Es ist daher anzunehmen, dass eine erhöhte Aktivität der Rho-GTPasen in den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten einen Einfluss auf die Zytoskelettdynamik und Formumwandlung der Thrombozyten im Laufe ihrer Aktivierung hat. Aus diesem Grund wurden die *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten in *Spreading*-Experimenten untersucht, bei denen sowohl die Adhäsivität sowie die Filopodien- und Lamellipodienausbildung auf thrombogenen Strukturen bestimmt wurde.

Hierzu wurden gewaschene WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten unter Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> mit CRP oder Thrombin vorstimuliert, auf eine Fibrinogen- oder Kollagen-Oberfläche aufgetragen und nach einem definierten Zeitraum fixiert.

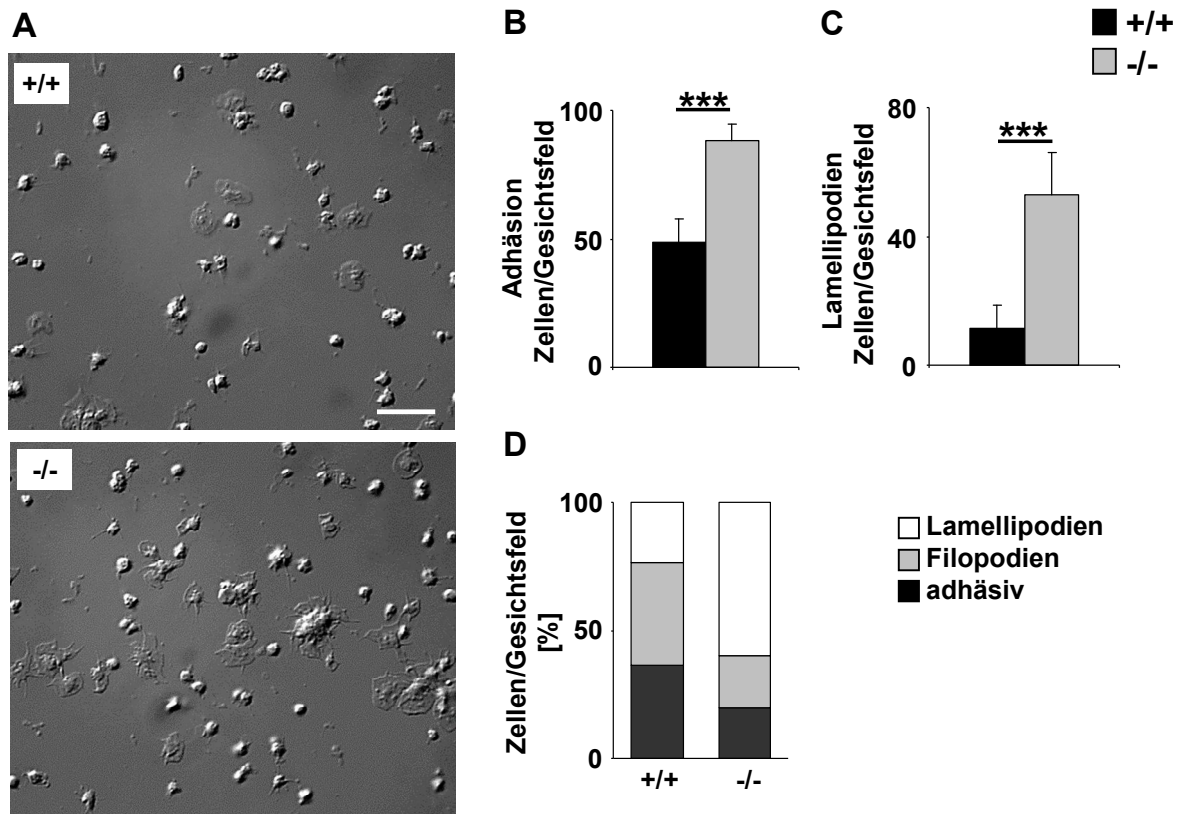
Bei einer Vorbehandlung mit CRP zeigten sich bei der Adhäsion auf Fibrinogen ausgeprägte Unterschiede zwischen WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten hinsichtlich ihrer Adhäsivität und Morphologie. Nach 45 min *Spreading* war die Anzahl der adhäsiven Zellen bei den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten deutlich höher als bei den WT-Thrombozyten (s. Abbildung 5-7). Zusätzlich war eine drastisch verstärkte Ausbildung der Lamellipodien bei den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten zu beobachten. 35,6% ± 8,6 der *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten wiesen nach 45 min Lamellipodien auf, während es bei den WT-Thrombozyten nur 13,7% ± 3,2 waren. Bezüglich der Filopodien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten beobachtet werden.



**Abbildung 5-7: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen nach einer Stimulation mit CRP eine erhöhte Adhäsion und Lamellipodienausbildung beim *Spreading* auf Fibrinogen auf.**

- (A) WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach CRP-Stimulation (0,5 µg/ml) und 45 min *Spreading* auf Fibrinogen (1 mg/ml). Repräsentative Bilder, aufgenommen mithilfe eines Differentialinterferenzkontrast-Mikroskops (*differential interference contrast*, DIC, 100x) (links) und mittels konfokaler Mikroskopie (63x) (rechts). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 5 µm.
- (B) Darstellung der adhärenen Zellen (Mittelwert der Zellzahl ± SD, \*\*P < 0.01)
- (C) Darstellung der Anzahl der Zellen mit Lamellipodien (Mittelwert der Zellzahl ± SD, \*\*\*P < 0.001)
- (D) Darstellung des prozentualen Anteils von adhäsiven Zellen (ohne Pseudopodienausbildung), Zellen mit Filopodien und Zellen mit Lamellipodien

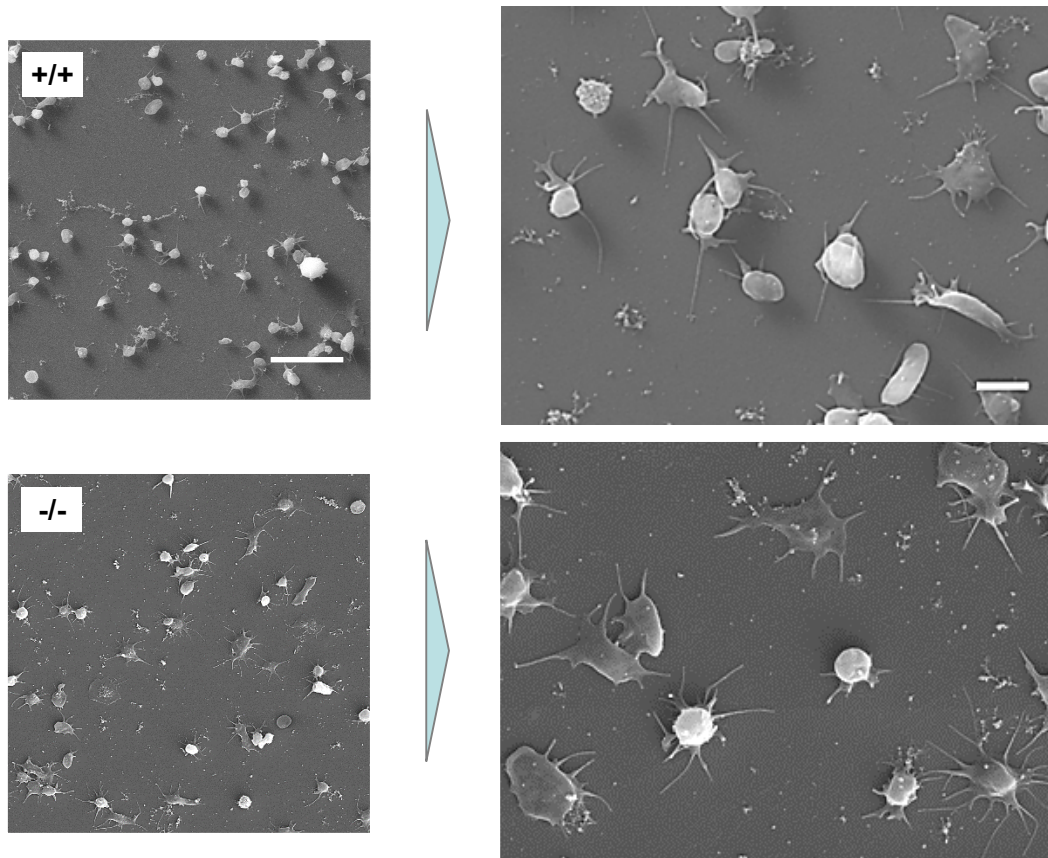
Auch nach einer Vorbehandlung mit Thrombin war beim *Spreading* auf Fibrinogen eine erhöhte Adhäsion sowie eine deutlich verstärkte Lamellipodienausbildung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrolle zu beobachten (s. Abbildung 5-8).



**Abbildung 5-8: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen nach einer Stimulation mit Thrombin eine erhöhte Adhäsivität und Lamellipodienausbildung beim *Spreading* auf Fibrinogen auf.**

- (A) WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin (0,008 U/ml) und 45 min *Spreading* auf Fibrinogen (1 mg/ml). Repräsentative Bilder, aufgenommen mithilfe eines DIC-Mikroskops (100x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 10  $\mu$ m.
- (B) Darstellung der adhärenen Zellen (Mittelwert der Zellzahl  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001)
- (C) Darstellung der Anzahl der Zellen mit Lamellipodien (Mittelwert der Zellzahl  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001)
- (D) Darstellung des prozentualen Anteils von adhäsiven Zellen (ohne Pseudopodienausbildung), Zellen mit Filopodien und Zellen mit Lamellipodien

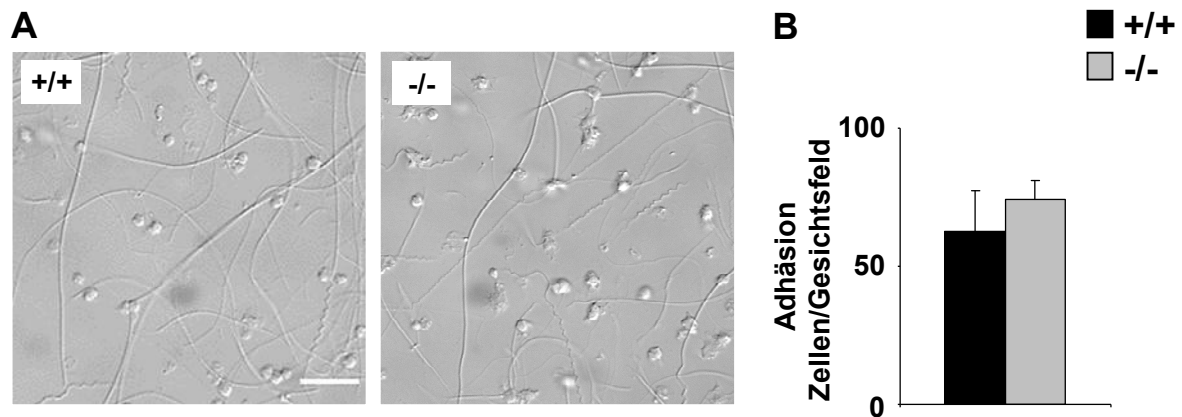
Die OPHN1-defizienten Thrombozyten wiesen auch bei fehlendem exogenen Stimulus eine verstärkte zytoskeletale Dynamik beim *Spreading* auf Fibrinogen auf. So zeigen Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop eine verstärkte Pseudopodienausbildung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten (s. Abbildung 5-9).



**Abbildung 5-9: Unbehandelte *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine verstärkte Pseudopodienausbildung beim *Spreading* auf Fibrinogen auf.**

Repräsentative Bilder von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach 45 min *Spreading* auf Fibrinogen (1 mg/ml), aufgenommen mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops. Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 10 µm (links) und 2 µm (rechts) (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Oliver Betz).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden, war beim *Spreading* auf Kollagen (nach Vorbehandlung mit CRP) kein Unterschied zwischen den WT- und OPHN1-defizienten Thrombozyten hinsichtlich ihrer Adhäsivität zu beobachten (s. Abbildung 5-10). Morphologische Analysen der Thrombozyten waren aufgrund der unebenen Struktur der Kollagenfasern nicht möglich.



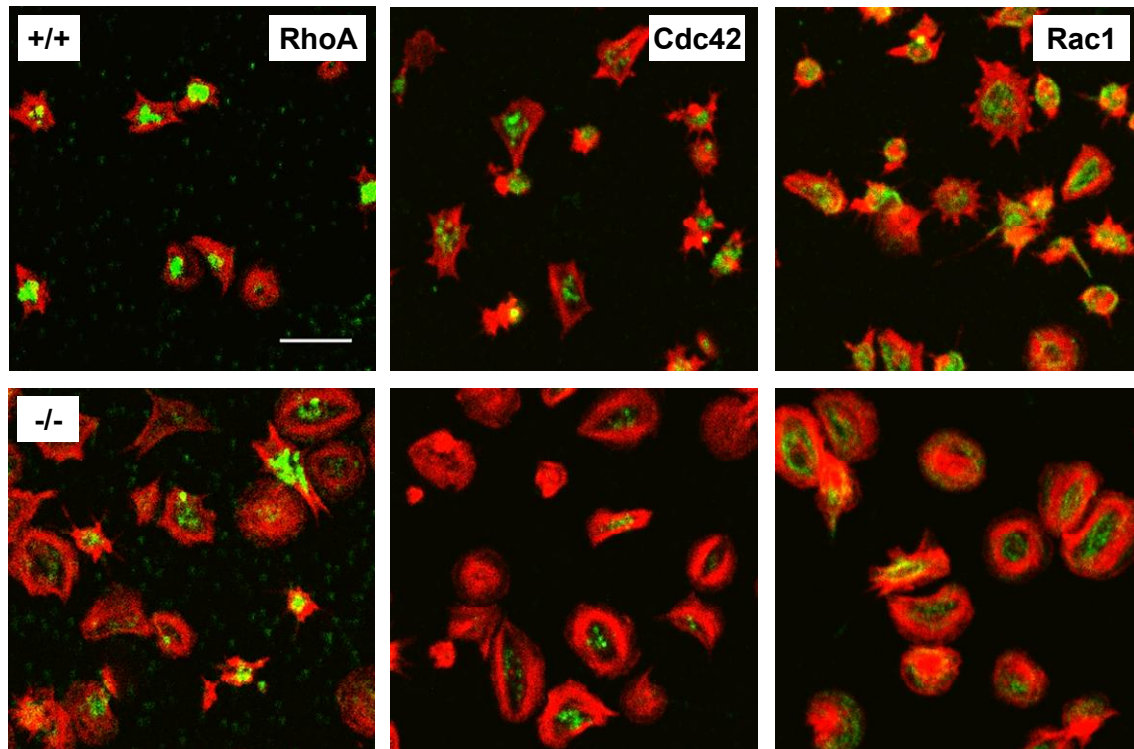
**Abbildung 5-10: WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine vergleichbare Adhäsivität beim *Spreading* auf Kollagen nach Stimulation mit CRP auf.**

- (A) WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Stimulation mit CRP (0,5 µg/ml) und 45 min *Spreading* auf Kollagen (200 µg/ml). Repräsentative Bilder, aufgenommen mithilfe eines DIC-Mikroskops (100x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 10 µm.
- (B) Darstellung der adhärenen Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert der Zellzahl ± SD

### 5.2.7. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine normale Verteilung der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 auf

Um der Frage nachzugehen, ob bei einer erhöhten Rho-GTPase-Aktivität sowie einer veränderten Zytoskelettdynamik der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten auch eine andere Verteilung der Rho-GTPasen in den Thrombozyten vorliegt, wurden die drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in adhärenen *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten mittels Fluoreszenzfärbung visualisiert.

Es zeigte sich, dass die drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 – unter Berücksichtigung der veränderten Zellmorphologie – in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten eine mit den WT-Thrombozyten vergleichbare Verteilung aufwiesen (s. Abbildung 5-11).



**Abbildung 5-11: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine normale Verteilung der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 auf.**

Repräsentative Bilder von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach einer Stimulation mit CRP (0.5 µg/ml), 45 min *Spreading* auf Fibrinogen (1 mg/ml) und einer Färbung der Rho-GTPasen (grün) und Aktin (rot), aufgenommen mittels konfokaler Mikroskopie (63x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 5 µm.

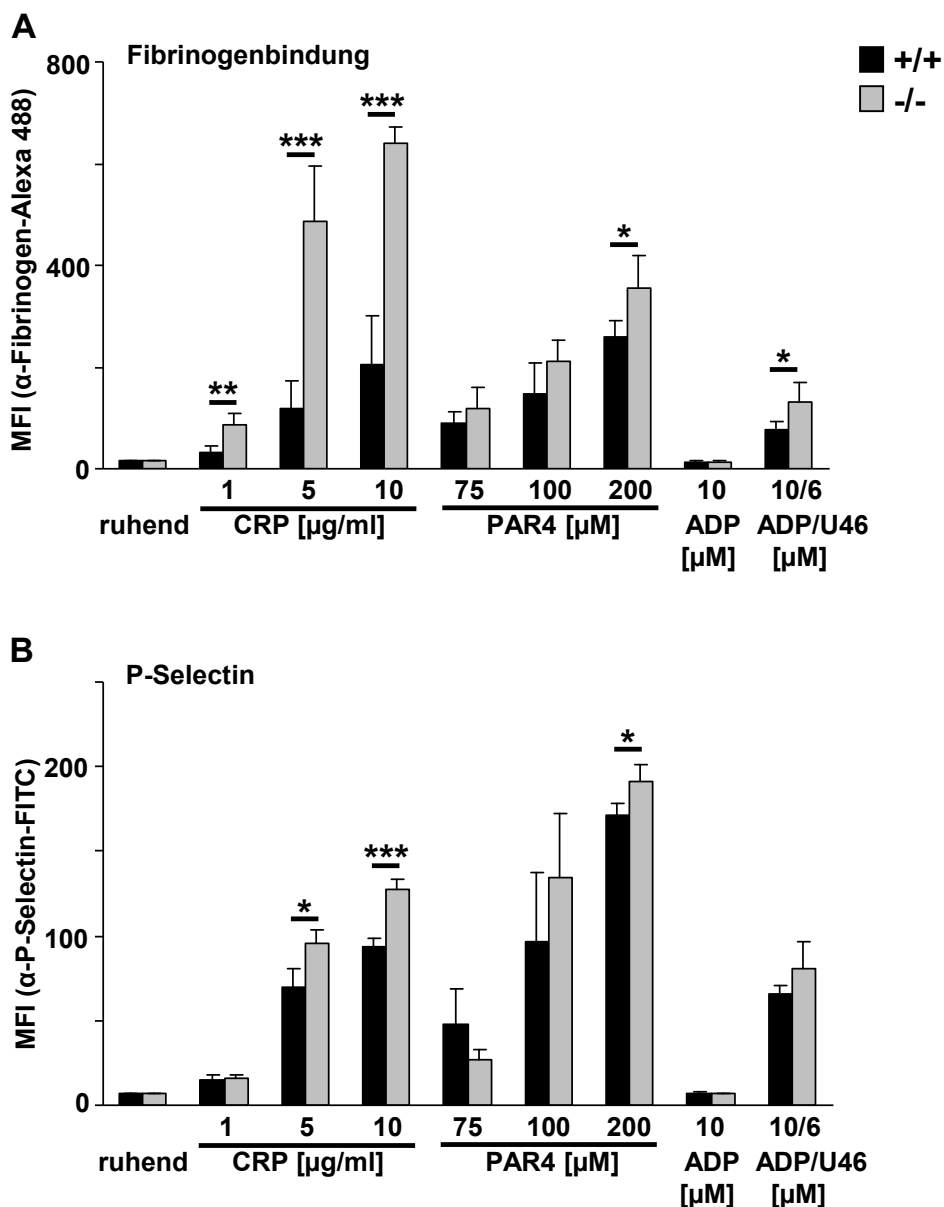
### 5.2.8. OPHN1-Defizienz führt zu verstärkter Thrombozytenaktivierung

Neben der Zytoskelettdynamik sollten weitere Aktivierungsmuster der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten untersucht werden. Hierzu wurde zum einen die Aktivität des Integrinrezeptors  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 analysiert, indem die Bindung von Fluorochrom-gekoppeltem Fibrinogen an das Glykoprotein mittels Durchflusszytometer bestimmt wurde. Weiterhin wurde P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche als Maß für die Degranulierung der alpha-Granula nach Stimulation mit verschiedenen Thrombozyten-Agonisten durchflusszytometrisch quantifiziert.

Unstimulierte *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zeigten bei beiden Parametern einen normalen mit der WT-Kontrollgruppe vergleichbaren Basalwert (s. Abbildung 5-12). Nach einer Stimulation war hingegen sowohl die Menge an gebundenem Fibrinogen als auch das P-Selektin-Niveau bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten bei den meisten Agonisten erhöht. Ein besonders drastischer Unterschied zwischen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup> trat auf, wenn die Thrombozyten mit CRP behandelt wurden. Die *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten reagierten demnach in besonderem Maße bei einer Stimulation des ITAM-gekoppelten GPVI-Rezeptor-Signalwegs. Bei der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren war der Unterschied zwischen WT und KO gemeinhin geringer. Allein bei hohen Dosen des



PAR4-Peptids, das den Thrombin-Rezeptor PAR4 stimuliert, waren die  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung und die membranäre P-Selektin-Menge bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten signifikant erhöht. Auch bei Stimulation mit ADP war kein Unterschied zwischen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zu beobachten. Nur in Kombination mit dem Thromboxan-Analogen U46619 war die Fibrinogenbindung bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten erhöht.

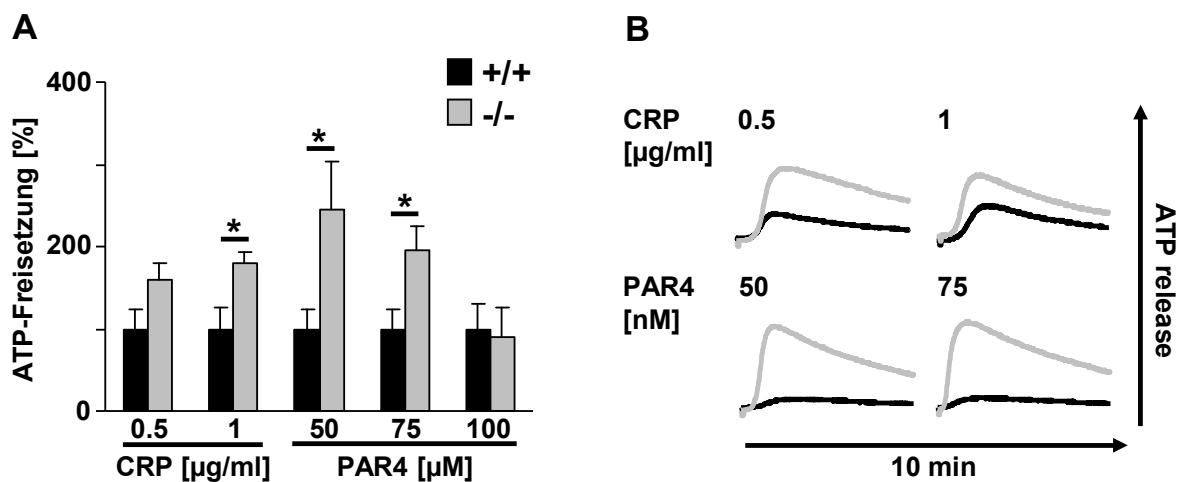


**Abbildung 5-12: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine verstärkte Fibrinogenbindung und eine erhöhte Menge an Oberflächen-P-Selectin nach ihrer Aktivierung auf.**

- (A) Durchflusszytometrische Bestimmung der Fibrinogenbindung. Gewaschene WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden 30 min mit den angezeigten Agonisten in Anwesenheit von Alexa Fluor® 488-gekoppeltem Fibrinogen inkubiert. Dargestellt sind die mittleren Werte der Intensität (*mean fluorescence intensity*, MFI)  $\pm$  SD ( $n = 8$  pro Gruppe, \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0.001$ ). U46 steht für das Thromboxan-Analogen U 46619.
- (B) Durchflusszytometrische Bestimmung von P-Selectin auf der Oberfläche von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten. Gewaschenes Vollblut aus WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde 30 min mit den angezeigten Agonisten in Anwesenheit eines FITC-gekoppelten anti-P-Selectin-Antikörpers inkubiert. Dargestellt ist MFI  $\pm$  SD ( $n = 6$  pro Gruppe, \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0.001$ ).

Eine Analyse der Sekretion der elektronendichten Granula erfolgte über die Messung der ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten nach einer Stimulation mit CRP und PAR4-Peptid. Das sekretierte ATP wurde mithilfe eines Luciferin-Luciferase-Systems durch Detektion der entstehenden Biolumineszenz analysiert.

Sowohl CRP als auch PAR4 bewirkten bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten in Schwellenwert- wie auch in höheren Konzentrationen eine verstärkte Sekretion von ATP in den Überstand (s. Abbildung 5-13). Allein bei sehr hohen Dosen von PAR4 trat kein Unterschied zwischen WT und *ophn1*<sup>-/-</sup> auf.

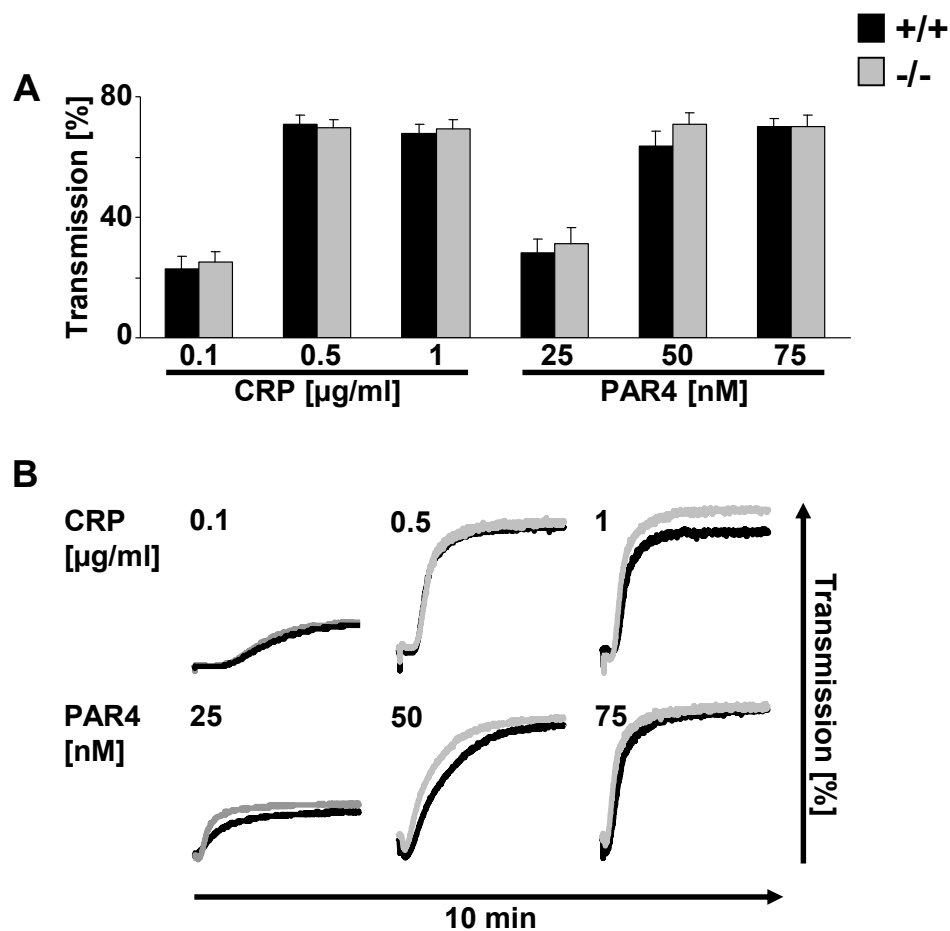


**Abbildung 5-13: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine verstärkte ATP-Freisetzung nach Aktivierung auf.**

- (A) Messung der ATP-Freisetzung in den Überstand von gewaschenen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Aktivierung mit den angezeigten Agonisten. Detektion der Biolumineszenz mithilfe eines Luciferin-Luciferase-Systems. Dargestellt ist die prozentuale ATP-Konzentration ± SEM (ATP-Freisetzung der WT-Thrombozyten = 100%) (n = 6 - 11 pro Gruppe, \*P < 0.05).
- (B) Repräsentative Kurven der ATP-Freisetzung von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten

### 5.2.9. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine normale Aggregation auf

Das Aggregationsvermögen der WT- und der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurde mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie nach einer Aktivierung mit CRP und PAR4-Peptid gemessen. Trotz erhöhter Sekretion und Integrinaktivierung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wiesen sie eine normale, mit dem WT vergleichbare Aggregation auf (s. Abbildung 5-14).



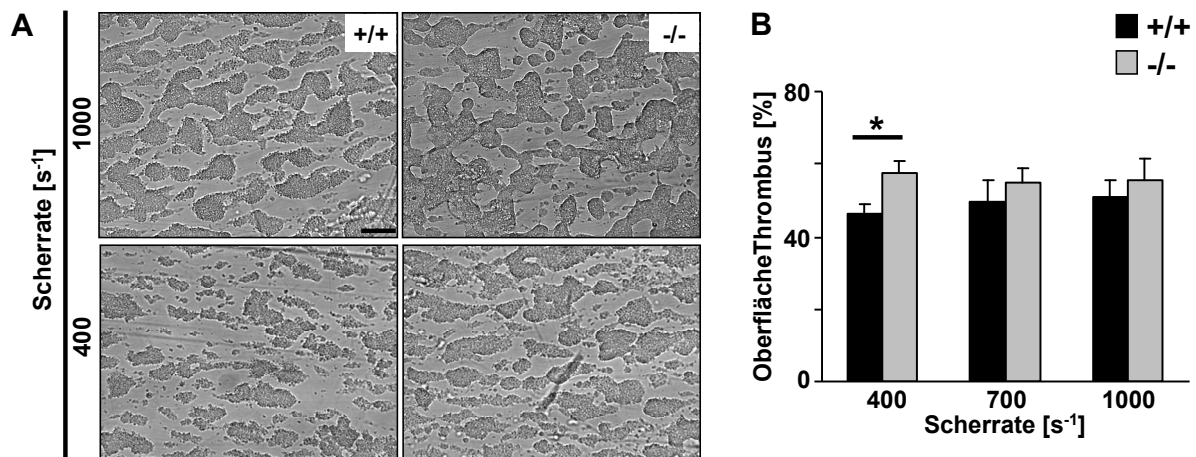
**Abbildung 5-14: *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten weisen eine normale Aggregation auf.**

- (A) Messung der Aggregation von gewaschenen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Aktivierung mit den angezeigten Agonisten in Anwesenheit von 100  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie. Dargestellt ist die prozentuale Licht-Transmission  $\pm$  SEM (n = 6 - 11 pro Gruppe).
- (B) Repräsentative Kurven der Aggregation von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten

#### 5.2.10. Vollblut aus *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen weist unter niedrigen Scherraten eine verstärkte Thrombusbildung auf Kollagen auf

Um die funktionale Bedeutung von OPHN1 in einem physiologischen Model zu charakterisieren, wurde die Thrombusbildung von Blut aus *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Flussbedingungen untersucht. Hierzu wurde Vollblut unter verschiedenen Flussraten (450  $\text{s}^{-1}$ , 700  $\text{s}^{-1}$ , 1000  $\text{s}^{-1}$ ) über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche perfundiert und daraufhin die Fläche der sich bildenden Thromben ausgemessen.

Bei Flussraten von 700  $\text{s}^{-1}$  und 1000  $\text{s}^{-1}$  war hinsichtlich der Thrombusbildung kein Unterschied zwischen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Blut zu beobachten. Bei sehr niedrigen, venösen Scherraten hingegen war die mit Thromben bedeckte Fläche bei dem Blut aus *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöht (s. Abbildung 5-15).



**Abbildung 5-15: Vollblut aus *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen weist unter niedrigen Scherraten eine verstärkte Thrombusbildung auf Kollagen auf.**

Heparinisiertes Vollblut aus WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche unter den angezeigten Flussraten perfundiert.

- (A) Repräsentative Phasen-Kontrast-Aufnahmen der mit Thromben bedeckten Oberfläche nach Ablauf der Vollblut-Perfusion (1700 s<sup>-1</sup> nicht gezeigt, die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 50 µm)
- (B) Prozentualer Anteil der mit Thromben bedeckten Oberfläche ± SD (n = 3 - 4 pro Gruppe; \*P < 0.05)

### 5.2.11. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben eine verkürzte Blutungszeit

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ein Funktionsverlust von OPHN1 bei Thrombozyten eine gesteigerte zytoskeletale Dynamik und eine verstärkte Aktivierung zur Folge hat. Zudem wurde eine erhöhte Thrombusbildung beobachtet. Um die Auswirkungen dieser Ausprägungen für die Hämostase *in vivo* zu erörtern, wurde die Blutungszeit der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse analysiert. Hierfür wurde den Mäusen ein kleiner Teil der Schwanzspitze abgeschnitten und die Zeit bis zur Blutstillung gemessen.

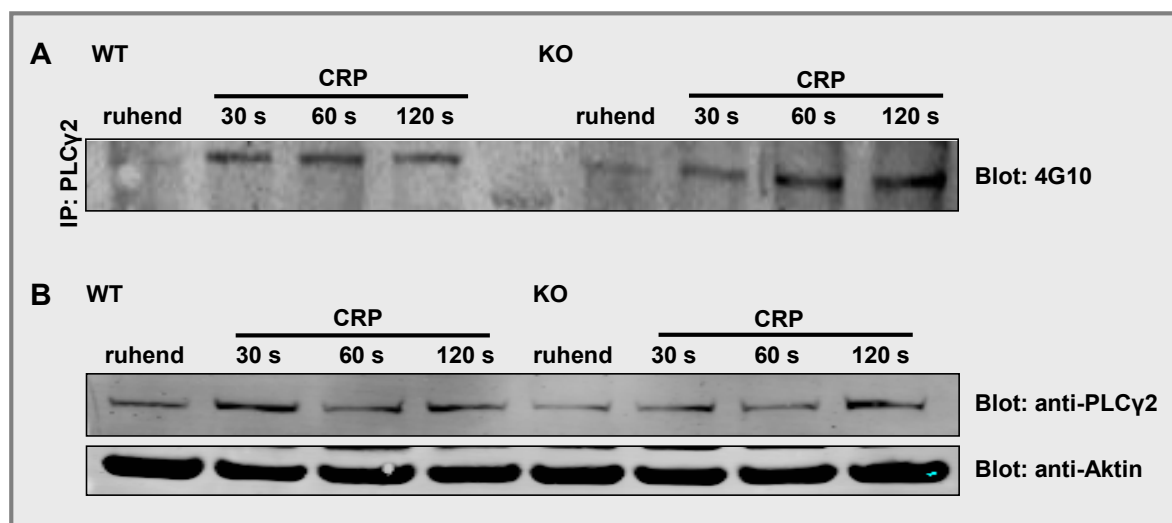
Es zeigte sich, dass ein Wundverschluss bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in kürzerer Zeit eintrat als bei den WT-Mäusen. Bei 70% der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse hörte der Blutfluss innerhalb von 40 s auf, während dies nur bei 30% der WT-Mäuse der Fall war.

### 5.2.12. Die Tyrosin-Phosphorylierung von PLCγ2 ist in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Stimulation mit CRP verstärkt

Bei den Untersuchungen der Integrinaktivierung und Degranulierung bewirkte eine Stimulation mit CRP eine übermäßig starke Aktivierung der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten. Daher ist von einer besonderen Rolle von OPHN1 im GPVI/ITAM-Signalweg auszugehen. Aus diesem Grund wurde das Protein PLCγ2, das eines der Schlüsselenzyme dieses Signalwegs ist, in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten untersucht. Als Maß für seine Aktivierung wurde der Phosphorylierungsgrad des Proteins analysiert. Hierzu wurden die Thrombozyten mit CRP stimuliert, lysiert und daraufhin PLCγ2 mit einem spezifischen

Antikörper aus dem Lysat präzipitiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung im Western Blot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10) analysiert.

Sowohl in den WT- als auch in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurde die PLC $\gamma$ 2-Phosphorylierung durch die CRP-Stimulation angeregt. Es zeigte sich jedoch, dass der Phosphorylierungsgrad in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten - besonders nach 60 und 120 Sekunden Aktivierung – im Vergleich zur WT-Kontrolle höher war (s. Abbildung 5-16). Eine Kontroll-Analyse des Expressionsniveaus von PLC $\gamma$ 2 mittels Western Blot zeigte, dass dieses in WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten gleich war.



**Abbildung 5-16: Die Tyrosin-Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 ist in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Stimulation mit CRP verstärkt.**

- (A) WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden mit 20  $\mu$ g/ml CRP stimuliert und lysiert. Anschließend wurde PLC $\gamma$ 2 aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 wurde im Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 detektiert. Repräsentativer Western Blot zur Darstellung der PLC $\gamma$ 2-Phosphorylierung (n = 3).
- (B) Darstellung der PLC $\gamma$ 2-Expression im Lysat von WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten im Western Blot. Als Ladekontrolle diente Aktin.

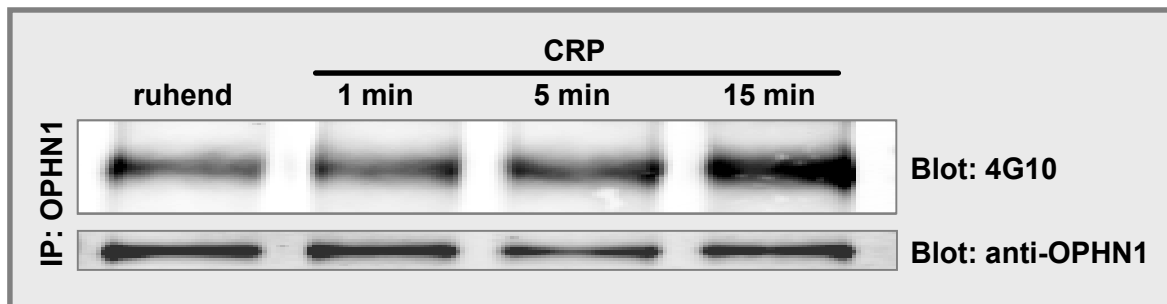
### 5.3. Regulation von OPHN1

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Fragestellung, ob die GAP-Aktivität von OPHN1 neben dem autoinhibitorischen Mechanismus durch die BAR-Domäne durch weitere Faktoren reguliert wird. Einen potentiellen Regulationsmechanismus stellt die Phosphorylierung dar. Ein bekanntes Beispiel ist die Aktivierung des GAP-Proteins p190RhoGAP durch Phosphorylierung, die über die Tyrosinkinase Src vermittelt wird. Im Folgenden wurde untersucht, ob dieses Model auch für OPHN1 gültig ist.

#### 5.3.1. OPHN1 wird in Thrombozyten durch Aktivierung phosphoryliert

Zunächst wurde analysiert, ob OPHN1 in Thrombozyten phosphoryliert wird und ob sich der Phosphorylierungsgrad im Laufe einer Aktivierung verändert. Hierzu wurden murine Thrombozyten mit CRP stimuliert und lysiert. Daraufhin wurde OPHN1 mit einem spezifischen Antikörper aus dem Zelllysate präzipitiert und die Phosphorylierung im Western Blot mit 4G10 analysiert.

Bereits in ruhenden Thrombozyten lag OPHN1 im phosphorylierten Zustand vor. Im Laufe der Aktivierung nahm die Phosphorylierung von OPHN1 zu (s. Abbildung 5-17).



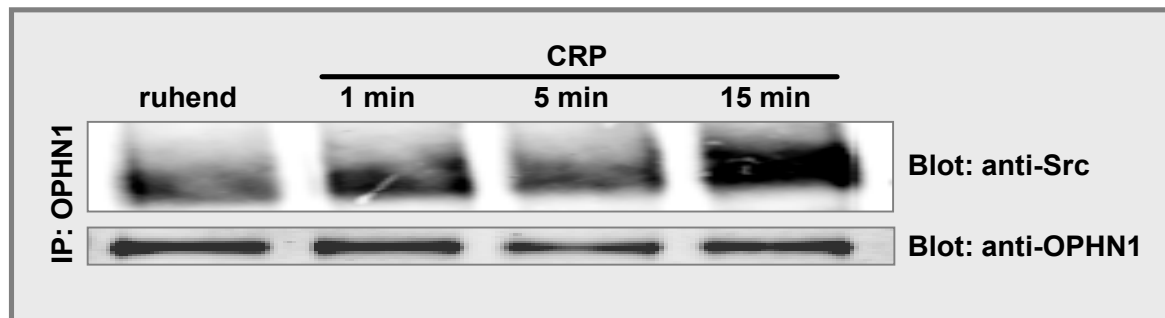
**Abbildung 5-17: OPHN1 wird in Thrombozyten durch Aktivierung mit CRP phosphoryliert.**

Murine Thrombozyten wurden mit 20 µg/ml CRP stimuliert und lysiert. Anschließend wurde OPHN1 aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Immunfällung wurde OPHN1 im Präzipitat mittels Western Blot dargestellt.

#### 5.3.2. OPHN1 interagiert mit der Tyrosinkinase Src in Thrombozyten

Als Kandidat für die Phosphorylierung von OPHN1 in Thrombozyten kommt die Proteinkinase Src in Frage. Um zu untersuchen, ob eine Interaktion zwischen OPHN1 und Src in Thrombozyten stattfindet, wurden murine Thrombozyten mit CRP stimuliert und lysiert. OPHN1 wurde mit einem spezifischen Antikörper aus dem Zelllysate präzipitiert und Src wurde im Präzipitat mittels Western Blot detektiert.

Bereits im Ruhezustand der Thrombozyten konnte eine Interaktion von Src und OPHN1 nachgewiesen werden. Diese Interaktion nahm im Laufe der Aktivierung zu (s. Abbildung 5-18).



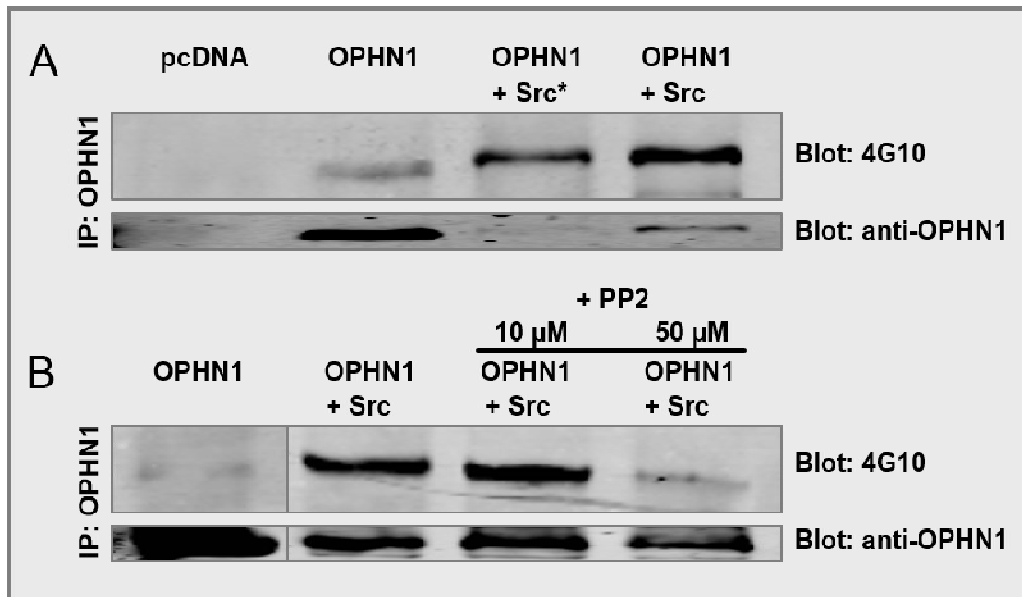
**Abbildung 5-18: OPHN1 interagiert in Thrombozyten nach einer Aktivierung mit CRP verstärkt mit Src.**

Murine Thrombozyten wurden mit 20 µg/ml CRP stimuliert und lysiert. Anschließend wurde OPHN1 aus dem Lysat immunpräzipitiert. Src wurde im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Immunfällung wurde OPHN1 im Präzipitat mittels Western Blot dargestellt.

### 5.3.3. OPHN1 wird nach Src-Überexpression phosphoryliert

Nachdem eine Aktivierungs-abhängige Phosphorylierung von OPHN1 sowie eine Interaktion zwischen OPHN1 und Src nachgewiesen werden konnte, sollte ermittelt werden, ob Src für die Phosphorylierung von OPHN1 verantwortlich ist. Hierzu wurden OPHN1 und Src in A5-CHO-Zellen überexprimiert. OPHN1 wurde aus dem Zelllysate immunpräzipitiert und die Phosphorylierung von OPHN1 im Western Blot mit dem Antikörper 4G10 analysiert.

In Abwesenheit von Src lag OPHN1 in geringem Maße in einem phosphorylierten Zustand vor. Bei einer Kotransfektion mit Src verstärkte sich die Phosphorylierung drastisch (s. Abbildung 5-19 A). Diese Phosphorylierung konnte durch die Inkubation mit dem Src-Inhibitor PP2 unterbunden werden (s. Abbildung 5-19 B). Diese Befunde legen nahe, dass Src für die Phosphorylierung von OPHN1 verantwortlich ist.



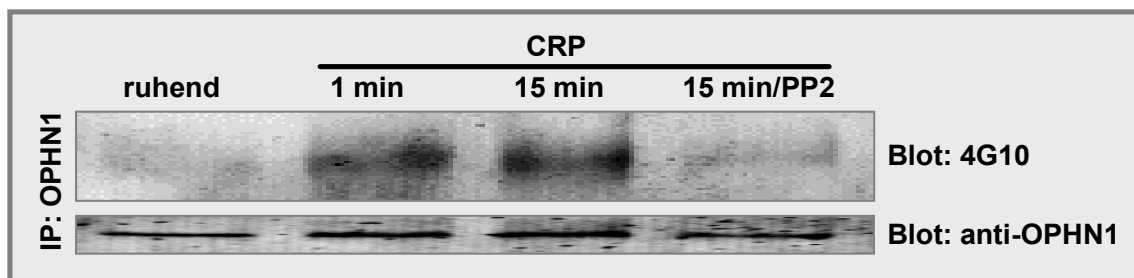
**Abbildung 5-19: OPHN1 wird bei einer Src-Überexpression phosphoryliert.**

A5-CHO-Zellen wurden mit OPHN1- und Src-Plasmiden kotransfiziert (\*konstitutiv aktives Src). Die Zellen wurden lysiert und es wurde eine Immunpräzipitation von OPHN1 durchgeführt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 detektiert. Separate Proben wurden mit 10 µM und 50 µM des Src-Inhibitors PP2 behandelt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Immunfällung wurde OPHN1 im Präzipitat mittels Western Blot dargestellt.

### 5.3.4. Die Phosphorylierung von OPHN1 wird in Thrombozyten durch den Src-Inhibitor PP2 blockiert

Um auch in Thrombozyten einen Bezug zwischen der Phosphorylierung von OPHN1 und der Aktivität von Src herzustellen, wurden humane Thrombozyten nach einer Aktivierung mit PP2 behandelt. Die Thrombozyten wurden lysiert und OPHN1 aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem Antikörper 4G10 analysiert.

Auch in Thrombozyten führte die Behandlung mit PP2 zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von OPHN1 (s. Abbildung 5-20).



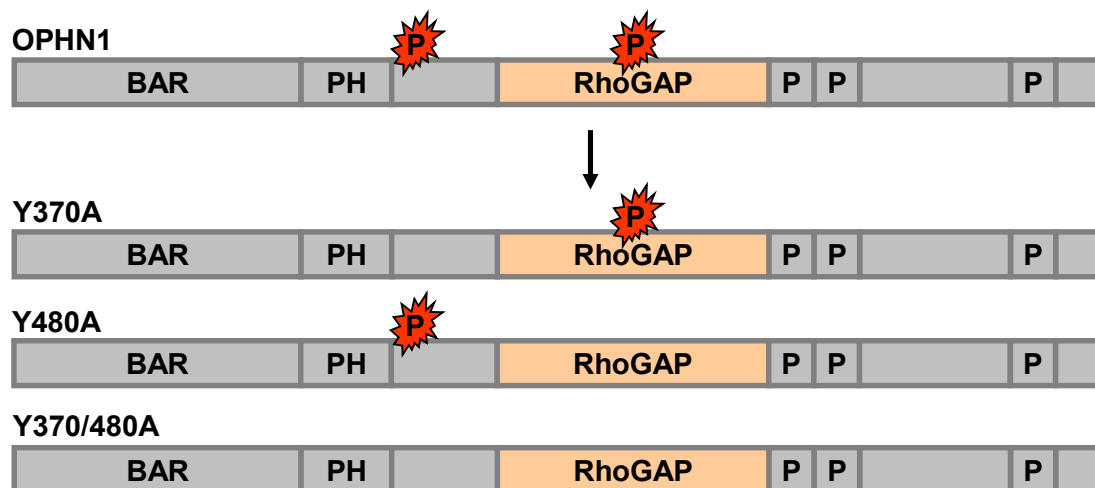
**Abbildung 5-20: Die Phosphorylierung von OPHN1 wird in Thrombozyten durch den Src-Inhibitor PP2 blockiert.**

Humane Thrombozyten wurden mit 20 µg/ml CRP stimuliert und lysiert. OPHN1 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 detektiert. Eine separate Probe wurde mit 10 µM des Src-Inhibitors PP2 behandelt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Immunfällung wurde OPHN1 im Präzipitat mittels Western Blot dargestellt.



### 5.3.5. Herstellung von OPHN1-Konstrukten mit deletierten Tyrosinphosphorylierungsstellen

Nachdem die oben dargestellten Befunde auf eine Src-vermittelte Phosphorylierung von OPHN1 hindeuteten, sollte ermittelt werden, in welchem Bereich des Proteins die Phosphorylierung stattfindet und welche Phosphorylierungsstelle hierbei einen funktionellen Einfluss hat. Hierzu wurden Mutanten von OPHN1 hergestellt, bei denen die zwei potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen Y370 und Y480 deletiert waren. Die Mutation erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese, bei der ein Tyrosin durch ein Alanin ersetzt wurde. Es wurden Plasmide mit jeweils einer Mutation (Y370A, Y480A) sowie eine Doppelmutante (Y370/480A), in der beide Tyrosinphosphorylierungsstellen verändert waren, generiert (s. Abbildung 5-21).

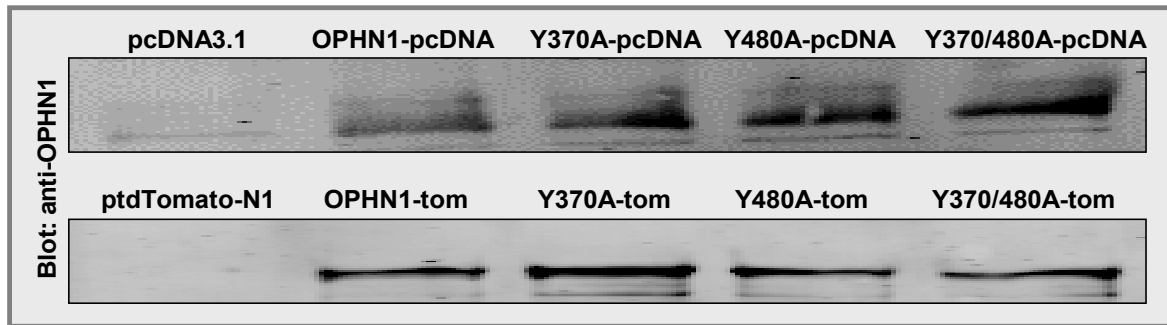


**Abbildung 5-21: Generierung der OPHN1-Mutanten Y370A, Y480A und Y370/480A.**

Durch ortsspezifische Mutagenese wurde an den potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1 Tyrosin gegen Alanin ausgetauscht. Es wurden die Einzelmутanten Y370A und Y480A sowie die Doppelmutante Y370/480A hergestellt. Die Basenmutation konnte mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden.

Die DNA-Konstrukte wurden sowohl in einen pcDNA3.1-Vektor als auch in einen ptdTomato-N1-Vektor ligiert, bei dem die Proteine zusammen mit dem rot fluoreszierenden Protein Tomato exprimiert wurden.

Eine Sequenzierung nach der Methode von Sanger ergab, dass die Konstrukte die gewünschte Basenmutation enthielten. Eine Überexpression in A5-CHO-Zellen mit anschließender Zellyse und einem Western Blot zeigte, dass die Mutanten sowohl im pcDNA3.1-Vektor als auch im ptdTomato-N1-Vektor gut exprimiert wurden (s. Abbildung 5-22).

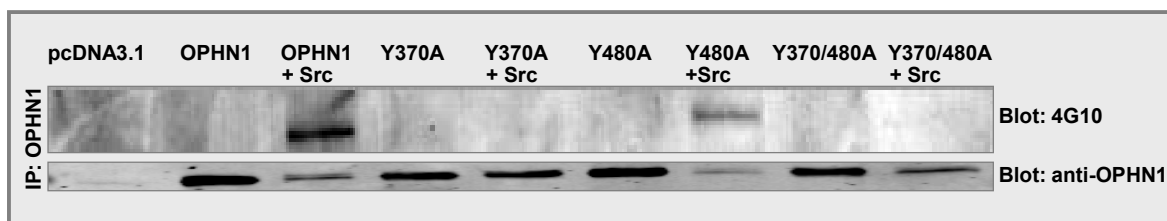


**Abbildung 5-22: Expression der OPHN1-Phosphomutanten Y370A, Y480A und Y370/480A in A5-CHO-Zellen.**

Darstellung der Expression der OPHN1-Mutanten im Zelllysate von A5-CHO-Zellen nach einer Transfektion im Western Blot mit einem anti-OPHN1-Antikörper. Oben: Mutanten im pcDNA3.1-Vektor, unten: Mutanten im ptdTomato-N1-Vektor

### 5.3.6. OPHN1 wird hauptsächlich an Tyrosin 370 phosphoryliert

Um zu analysieren, welche der potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1 phosphoryliert werden, wurden die OPHN1-Mutanten Y370A, Y480A und Y370/480A einzeln und zusammen mit Src in A5-CHO-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und OPHN1 bzw. die OPHN1-Mutanten aus dem Zelllysate immunpräzipitiert. Die Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem Antikörper 4G10 analysiert. Es zeigte sich, dass vorwiegend die Mutante Y480A durch Src phosphoryliert wurde. Eine Phosphorylierung von Y370A war hingegen fast nicht zu sehen (s. Abbildung 5-23). Demnach wird OPHN1 hauptsächlich an Tyrosin 370, das sich zwischen der PH- und der GAP-Domäne befindet, phosphoryliert. Bei Y370/480A wurde erwartungsgemäß keine Phosphorylierung detektiert.



**Abbildung 5-23: OPHN1 wird hauptsächlich an Tyrosin 370 phosphoryliert.**

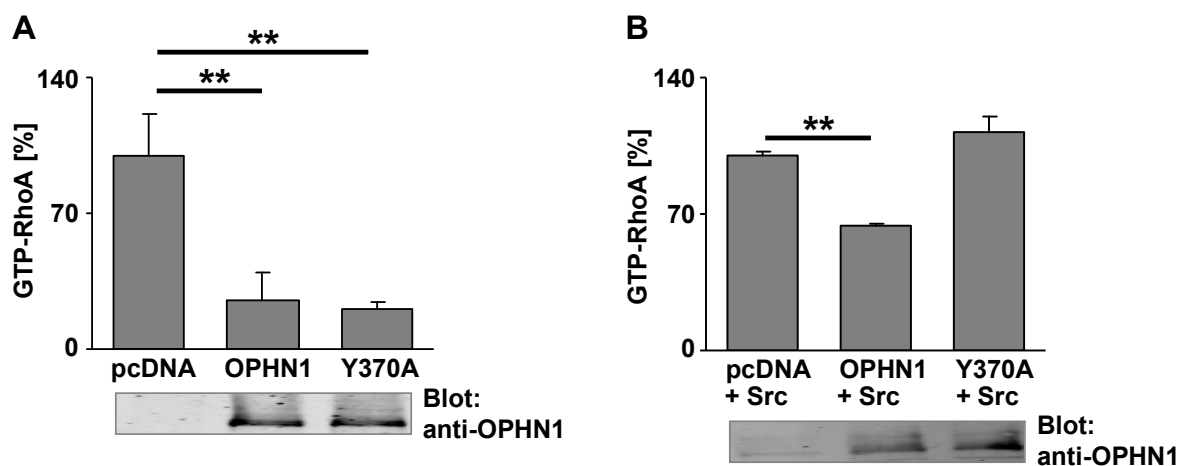
Die Plasmide mit den OPHN1-Mutanten Y370A, Y480A und Y370/480A wurden alleine und zusammen mit Src in A5-CHO-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und OPHN1 bzw. die OPHN1-Mutanten mithilfe eines anti-OPHN1-Antikörpers aus dem Zelllysate immunpräzipitiert. Die Phosphorylierung von OPHN1 wurde im Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Immunfällung wurde OPHN1 im Präzipitat mittels Western Blot dargestellt.

### 5.3.7. Einfluss der Mutation von Tyrosin 370 auf die GAP-Aktivität von OPHN1

Um zu untersuchen, ob die Tyrosin-Phosphorylierung Einfluss auf die GAP-Aktivität von OPHN1 hat, wurden A5-CHO-Zellen mit den Mutanten Y370A, Y480A und Y370/480A - mit und ohne Kotransfektion mit Src - transfiziert und die Menge an aktivem GTP-

gebundenen RhoA im Zelllysat mittels G-LISA® bestimmt. Aufgrund der schwankenden Expressionsrate der transfizierten Konstrukte konnte allein die Aktivität der Mutante Y370A mit dem WT-Konstrukt verglichen werden.

Die Analysen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Y370A zeigte bei den Einzeltransfektionen eine mit WT-OPHN1 vergleichbare GTPase-Aktivität gegenüber RhoA (Abbildung 5-24 A). Bei beiden Konstrukten war die Menge an aktivem RhoA im Lysat signifikant reduziert. Wurden die Konstrukte hingegen mit Src ko-transfiziert, wies Y370A im Gegensatz zu OPHN1 keine GTPase-Aktivität auf (Abbildung 5-24 B).



**Abbildung 5-24: Einfluss der Mutation von Tyrosin 370 auf die GAP-Aktivität von OPHN1 bei RhoA.**

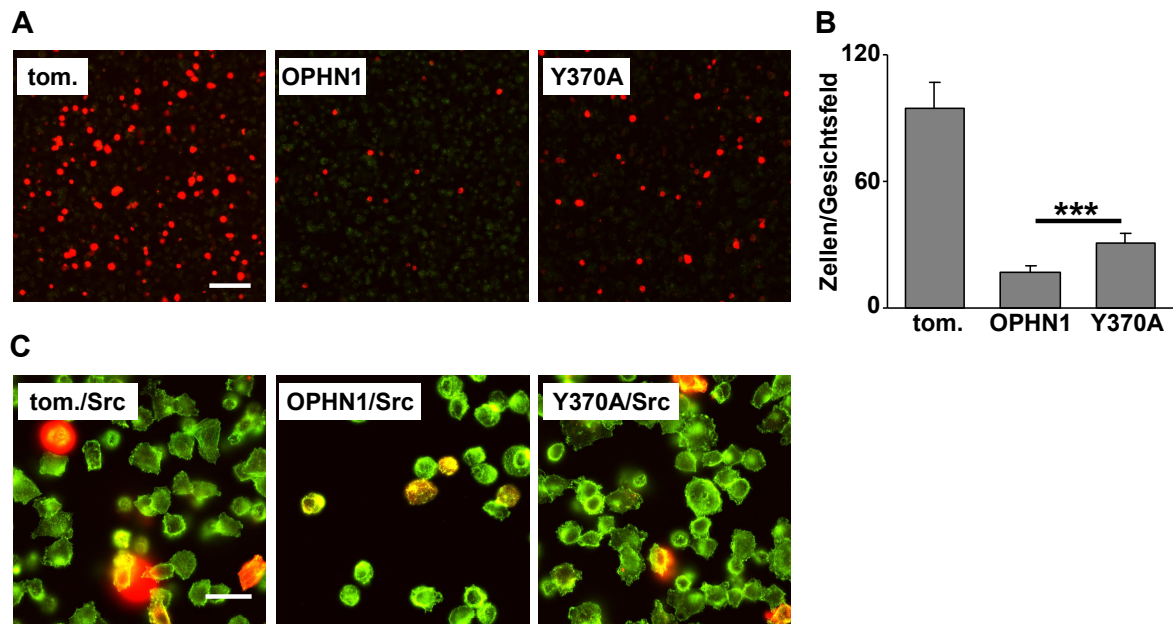
- (A) A5-CHO-Zellen wurden mit OPHN1 und Y370A (in pcDNA3.1) transfiziert, lysiert und die GTP-RhoA-Menge im Lysat mittels G-LISA® bestimmt. Darstellung der optischen Dichte (%) (Mittelwert  $\pm$  SD,  $**P < 0.01$ )
- (B) A5-CHO-Zellen wurden mit OPHN1 und Y370A (in pcDNA3.1) und Src ko-transfiziert, lysiert und die GTP-RhoA-Menge im Lysat mittels G-LISA® bestimmt. Darstellung der optischen Dichte (%) (Mittelwert  $\pm$  SD,  $**P < 0.01$ )

In einem weiteren Ansatz zur Analyse der funktionellen Bedeutung der Phosphorylierung von OPHN1 wurden A5-CHO-Zellen nach der Transfektion mit den OPHN1-Mutanten auf Fibrinogen aufgetragen und die Adhäsivität der Zellen analysiert. Hierfür wurden die Konstrukte im ptdTomato-N1-Vektor verwendet, um so transfizierte von nicht transfizierten Zellen mittels Fluoreszenz-Detektion unterscheiden zu können.

Es zeigte sich, dass die Zellen nach einer Transfektion mit OPHN1 einen drastischen Adhäsionsdefekt im Vergleich zu den Kontrollzellen (Leervektor) aufwiesen (s. Abbildung 5-25 A, B). Dieser Defekt war signifikant geringer, wenn die Zellen das Konstrukt Y370A überexprimierten.

Zusätzlich wurden die Zellen mit den OPHN1-Konstrukten und Src kotransfiziert und auf Fibrinogen analysiert. Die Transfektion mit OPHN1 und Src bewirkte eine deutliche

Reduktion der Pseudopodienausbildung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieser Effekt war nach der Transfektion mit Y370A und Src nicht zu beobachten (s. Abbildung 5-25 C).



**Abbildung 5-25: Die Mutation von Tyrosin 370 vermindert von OPHN1 induzierte Effekte bei der Adhäsion und Pseudopodienausbildung von A5-CHO-Zellen.**

- (A) A5-CHO-Zellen wurden mit OPHN1 und Y370A (in ptdTomato-N1) transfiziert und für 1 h auf Fibrinogen (1 mg/ml) aufgetragen. Repräsentative Bilder, aufgenommen mittels konfokaler Mikroskopie (10x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 50  $\mu$ m.
- (B) Darstellung der adhärenen Zellen (Mittelwert der Zellzahl  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001)
- (C) A5-CHO-Zellen wurden mit OPHN1 und Y370A (in ptdTomato-N1) und Src (eGFP) ko-transfiziert und für 1 h auf Fibrinogen (1 mg/ml) gegeben. Repräsentative Bilder, aufgenommen mittels konfokaler Mikroskopie (40x). Die Länge des Maßstabsbalkens entspricht 30  $\mu$ m.

## 6. Diskussion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in Deutschland nach wie vor die häufigste Todesursache. Laut Statistischem Bundesamt waren 40% aller Todesfälle im Jahr 2012 auf eine Erkrankung des Kreislaufsystems zurückzuführen. Thrombozyten spielen in der Pathogenese von akuten ischämischen Ereignissen wie dem Herzinfarkt und dem Schlaganfall eine wesentliche Rolle. Dies wird durch den nachgewiesenen präventiven und therapeutischen Nutzen von Thrombozytenaggregationshemmern wie z.B. Aspirin oder Clopidogrel bei thrombotischen Komplikationen bestätigt (Badimon, Ibanez und Vilahur, 2007). Da durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation jedoch auch in die blutstillende Funktion der Thrombozyten, die Hämostase, eingegriffen wird, ist die Behandlung mit Thrombozytenfunktionshemmern mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden (Raju, Eikelboom und Hirsh, 2008). Eine genauere Kenntnis der Mechanismen der Thrombozytenaktivierung könnte entscheidende Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer antithrombotischer Therapiestrategien bieten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Ziel das Rho-GTPase-aktivierende Protein (RhoGAP) Oligophrenin-1 (OPHN1) und seine Rolle für die Thrombozytenfunktion untersucht. Bislang wurde OPHN1 hauptsächlich im neuronalen System untersucht. Hier ist es an Prozessen der Zytoskelettorganisation beteiligt und damit von Bedeutung für die neuronale Konnektivität und Reizweiterleitung (Khelifaoui *et al.*, 2007). Die zur Gruppe der Rho-GTPasen gehörenden Proteine RhoA, Cdc42 und Rac1 spielen bei diesen dynamischen Umbildungsprozessen eine kritische regulatorische Rolle, indem sie u.a. die Aktinpolymerisierung und die Bildung von Zellausläufern beeinflussen (Jaffe und Hall, 2005). OPHN1 stimuliert als RhoGAP-Protein bei den genannten drei Rho-GTPasen die GTP-Hydrolyse zu GDP und wirkt damit nachweislich inhibitorisch auf ihre Aktivität (Billuart *et al.*, 1998; Fauchereau *et al.*, 2003). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der Regulation von RhoA durch OPHN1 und dem neuronalem Dendritenwachstum gezeigt werden (Govek *et al.*, 2004).

Auch Thrombozyten verändern z.B. bei einer Gefäßverletzung und ausgelöst durch einen exogenen Stimulus unmittelbar ihre Form. Auch hierbei spielen die drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 als Mediatoren des Zytoskelettumbaus eine entscheidende Rolle (Aslan und McCarty, 2013). Bislang ist nur wenig darüber bekannt, wie die Aktivität dieser drei Rho-GTPasen in Thrombozyten reguliert wird. Ob OPHN1 an diesen Prozessen in seiner Funktion als RhoGAP-Protein beteiligt ist, ist nicht beschrieben.

Eine Fragestellung dieser Arbeit war deshalb, in wie weit OPHN1 aufgrund seiner GAP-Aktivität die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in Thrombozyten reguliert und

dadurch Prozesse der Thrombozytenaktivierung, insbesondere der zytoskeletalen Reorganisation, beeinflusst. Dazu wurden Thrombozyten aus Mäusen mit einem konstitutivem *ophn1*-Gen-*Knockout* analysiert.

Weiterhin wurde untersucht, wie OPHN1 selbst reguliert wird. Als potentieller Regulationsmechanismus wurde eine Tyrosinphosphorylierung von OPHN1 angenommen und durch Überexpressionsstudien mit OPHN1-Konstrukten, in denen die Tyrosinphosphorylierungsstellen durch Basenmutation entfernt waren, überprüft.

### **6.1. OPHN1 ist in Thrombozyten am Zytoskelett lokalisiert**

In Neuronen ist OPHN1 im Zytoplasma sowie an der Spitze der Neuriten lokalisiert und mit dem Aktinzytoskelett assoziiert (Fauchereau *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte OPHN1 anhand von Fluoreszenzfärbungen sowohl im zentralen Zellkörper von murinen Thrombozyten als auch in den Filopodien und den Lamellipodien detektiert werden. Außerdem konnte dabei gezeigt werden, dass OPHN1 in adhärenenten Thrombozyten am Aktinzytoskelett lokalisiert ist. Die Assoziation am filamentösen Aktin spricht für die These, dass OPHN1 ein Regulator von zytoskeletalen Prozessen in Thrombozyten ist.

Weiterhin konnte mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen OPHN1 und der Liganden-bindenden Untereinheit GP1b $\alpha$  des thrombozytenspezifischen Glykoproteinrezeptor-Komplexes GP1b/V/IX in murinen Thrombozyten nachgewiesen werden. Diese Wechselwirkung bestand sowohl im Ruhezustand der Thrombozyten als auch für einen definierten Zeitraum nach einer Thrombin-vermittelten Aktivierung. Nach einem längeren Aktivierungszeitraum (15 min) war die Interaktion aufgehoben. Eine Thrombozytenaktivierung mit Thrombin bewirkt die transiente Translokation von GP1b/V/IX von der Thrombozytenoberfläche in das offene kanalikuläre System; nach etwa 30 Minuten erscheint der Rezeptor langsam wieder auf der Plasmamembran (Kauskot und Hoylaerts, 2012; Michelson *et al.*, 1991). Denkbar wäre, dass OPHN1 im Laufe dieses Prozesses in Membrannähe bleibt und deshalb die Wechselwirkung der beiden Proteine aufgehoben wird. GP1b/V/IX ist über das Zytoskelettprotein Filamin mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. Das Auflösen dieser Verbindung trägt maßgeblich zum Prozess der Formveränderung des Thrombozyten im Laufe der Aktivierung bei. Möglicherweise ist OPHN1 als Regulator an diesen Prozessen der Zytoskelettorganisation beteiligt.

Eberth *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die GAP-Aktivität von OPHN1 durch einen intramolekularen Mechanismus reguliert wird. Die BAR-Domäne bindet dabei an die GAP-Domäne und inhibiert sie dadurch. Bislang ist unbekannt, durch welchen Stimulus die Wechselwirkung zwischen GAP- und BAR-Domäne aufgehoben wird, um das Protein in die aktive Form zu versetzen. Für andere GAP-Proteine konnten bereits verschiedene

Proteine als Regulatoren ihrer GAP-Aktivität identifiziert werden. Darunter waren die GP1b/V/IX-Bindungspartner 14-3-3 und Filamin (Elvers *et al.*, 2012). Die hier gezeigte Assoziation von OPHN1 an GP1b/V/IX könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch die GAP-Aktivität von OPHN1 durch einen GP1b-Bindungspartner kontrolliert wird.

## 6.2. Analyse der Rolle von OPHN1 in Thrombozyten mithilfe von *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

### 6.2.1. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Mäuse

Zur Charakterisierung der Rolle von OPHN1 in der Thrombozytenfunktion wurden Thrombozyten aus Mäusen mit einem konstitutiven *Knockout* des OPHN1-Gens untersucht.

Eine Analyse der OPHN1-Expression auf Proteinebene bestätigte die vollständige Abwesenheit von OPHN1 in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten.

Bei den transgenen Tieren wurden weder körperliche Beeinträchtigungen noch Verhaltensauffälligkeiten beobachtet. Auch eine Analyse des Vollbluts zeigte eine normale, mit der WT-Kontrolle vergleichbare Thrombozytenzahl sowie ein normales Zellvolumen der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten. OPHN1 spielt demnach für die Thrombozytenentwicklung ausgehend von Megakaryozyten im Knochenmark keine funktionelle Rolle. Zudem wiesen die *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten bei einer durchflusszytometrischen Analyse ein normales Expressionsmuster verschiedener für die Thrombozytenfunktion essentieller Glykoprotein-rezeptoren (bzw. deren Untereinheiten) auf ihrer Oberfläche auf.

Bei einer detaillierteren Betrachtung der Ultrastruktur zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wiesen einige der OPHN1-defizienten Thrombozyten auch ohne eine Vorbehandlung mit stimulatorischen Substanzen charakteristische Merkmale von Präaktivierung auf. So befand sich ein großer Teil der Speichergranula, die teilweise schon entleert waren, in der Nähe der Plasmamembran. Andere Thrombozyten zeigten eine Konzentrierung von Aktin in der Zellmitte. Der Großteil der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten hatte dagegen eine für ruhende Thrombozyten typische Zellmorphologie und Zytoplasmastruktur.

Es ist davon auszugehen, dass die OPHN1-defizienten Thrombozyten nicht in einem präaktivierten Zustand im Blut der Mäuse zirkulieren. Dies sollte sonst offensichtliche körperliche Ausprägungen bei den Mäusen zur Folge haben. Wahrscheinlich ist, dass *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten eine erhöhte Anfälligkeit zur Aktivierung haben und deshalb auch bei einer sorgfältigen Präparation auf minimale Impulse, z.B. eine Zentrifugation, stärker reagieren als WT-Thrombozyten.

### 6.2.2. OPHN1 hemmt RhoA, Rac1 und Cdc42 und beeinflusst die Formumwandlung von Thrombozyten

Fauchereau *et al.* (2003) konnten in Überexpressionsstudien mit COS-7-Zellen zeigen, dass OPHN1 eine GTP-Hydrolyse-Aktivität gegenüber den drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 aufweist. Weiterhin konnten Khelifaoui *et al.* (2009) bei OPHN1-defizienten Fibroblasten eine doppelt so hohe RhoA-Aktivität wie in den Kontrollzellen beobachten. Im Einklang mit diesen Befunden konnte in dieser Arbeit mittels G-LISA® gezeigt werden, dass die Menge der aktiven GTP-gebundenen Form der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten deutlich höher als in WT-Thrombozyten ist. Sowohl im Ruhezustand als auch nach einer Aktivierung mit Thrombin und CRP war die Aktivität aller drei Rho-GTPasen in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten signifikant erhöht. Die Gesamt-Expression der Rho-GTPasen war hingegen in den WT- und den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten gleich. Die verstärkte Aktivität von RhoA, Cdc42 und Rac1 in Abwesenheit von OPHN1 lässt darauf schließen, dass OPHN1 in Thrombozyten ein negativer Regulator dieser drei Rho-GTPasen ist.

Im neuronalen System ist OPHN1 an der Bildung von Nervenzellausläufern beteiligt, die auf einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts basiert (Khelifaoui *et al.*, 2007). Auch bei Thrombozyten ist der Umbau von Aktinstrukturen und die Bildung von Pseudopodien ein zentraler Schritt im Laufe der Aktivierung. Die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 wiederum sind essentielle Regulatoren von zytoskeletalen Prozessen in Thrombozyten. Sie sind u.a. für die Bildung von Stressfasern und von Pseudopodien verantwortlich (Aslan und McCarty, 2013). Es ist daher anzunehmen, dass die verstärkte Aktivität der Rho-GTPasen in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten einen Einfluss auf Zytoskelettprozesse hat.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit eine veränderte Dynamik der Formumwandlung von *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten bei *Spreading*-Experimenten beobachtet werden. Die *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zeigten eine verstärkte Adhäsivität auf Fibrinogen. Zugleich war die Bildung der Lamellipodien bei den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten drastisch erhöht. Der Funktionsverlust von OPHN1 führt offenbar zu einer gesteigerten Zytoskelettdynamik. Aus früheren Studien mit Rac1-defizienten Thrombozyten ist bekannt, dass Rac1 essentiell für die Bildung von Lamellipodien ist (McCarty *et al.*, 2005). Die ausgeprägte Ausbildung von Lamellipodien der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten deutet also darauf hin, dass durch das Fehlen von OPHN1 vor allem die Aktivität von Rac1 verstärkt wird. Dies legt den Schluss nahe, dass OPHN1 zytoskeletale Prozesse insbesondere über die Regulation von Rac1 beeinflusst.



Die räumliche Verteilung der Rho-GTPasen in den Thrombozyten war trotz der veränderten Zytoskelettdynamik bei WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten vergleichbar.

### 6.2.3. OPHN1 beeinflusst Prozesse der Thrombozytenaktivierung

Neben dem Einfluss auf die Zytoskelettprozesse führte das Fehlen von OPHN1 auch zu einer Aktivitätssteigerung der Thrombozyten nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten. Diese äußerte sich in durchflusszytometrischen Analysen durch eine verstärkte Sekretion der alpha-Granula sowie durch eine erhöhte Fibrinogen-Bindung von Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Unstimulierte *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zeigten hingegen eine normale Sekretion und  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Aktivierung. *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten befinden sich demnach nicht *per se* in einem präaktivierten Zustand.

Es ist naheliegend, dass die erhöhte Aktivität der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten durch die Aktivitätssteigerung der Rho-GTPasen ausgelöst wird, da diese nicht durch OPHN1 gehemmt werden. Sowohl RhoA, Cdc42 als auch Rac1 sind an der Regulation von Sekretionsprozessen und vor allem RhoA und Rac1 an der Aktivierung von  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in Thrombozyten beteiligt (Aslan und McCarty, 2013; Pleines *et al.*, 2009; Pleines *et al.*, 2010).

Ein besonders großer Unterschied zwischen WT- und *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten war bei einer Stimulation des ITAM-gekoppelten GPVI-Rezeptors zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass OPHN1 in der GPVI-vermittelten Signalkaskade eine entscheidende Rolle spielt.

Wie Studien von Pleines *et al.* (2009) zeigen, kommt es bei Rac1-defizienten Thrombozyten zu einer Beeinträchtigung der GPVI-vermittelten Aktivierung. Im Gegensatz zu den OPHN1-defizienten Thrombozyten war deren Aktivierungsreaktion nach Stimulation ITAM-gekoppelter Signalwege deutlich erniedrigt. Die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bewirkte dagegen eine normale Reaktion. Dies zeigt, dass Rac1 wichtig für eine ITAM-abhängige Aktivierung ist, was mit den hier beschriebenen Befunden im Einklang ist: Eine durch den OPHN1-Funktionsverlust verursachte Rac1-Hyperaktivität bewirkt eine verstärkte Antwort auf eine GPVI-Stimulation; das Fehlen von Rac1 verursacht hingegen eine verminderte Reaktion dieses Signalwegs. Diese Zusammenhänge deuten weiterhin daraufhin, dass OPHN1 primär über Rac1 in die thrombozytäre Signalübertragung eingreift.

Über eine Bestimmung der ATP-Freisetzung nach einer Stimulation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten neben der verstärkten Degranulierung der alpha-Granula auch eine erhöhte Sekretion der elektronendichten

Granula aufweisen. Dieser Effekt trat jedoch gleichermaßen stark bei einer ITAM-abhängigen wie bei der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf.

Die Aggregation von Thrombozyten erfolgt hauptsächlich über die  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelte Vernetzung über Fibrinogenbrücken. Der Prozess wird zusätzlich von freigesetzten Mediatoren wie ADP und Thromboxan verstärkt. Eine erhöhte  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivität und eine verstärkte Sekretion - wie bei den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten der Fall - sollten demnach zu einer gesteigerten Aggregation führen. Entgegen dieser Erwartung wiesen die OPHN1-defizienten Thrombozyten ein normales, mit WT-Thrombozyten vergleichbares, Aggregationsverhalten auf.

#### **6.2.4. Eine OPHN1-Defizienz führt zu einer verstärkten Thrombusbildung und einer verkürzten Blutungszeit**

Als weitere Thrombozytenfunktion wurde Vollblut aus *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäusen auf die Fähigkeit zur Thrombusbildung hin untersucht. Dazu wurde das Blut über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche perfundiert und die Größe der entstandenen Thromben ermittelt. Unter niedrigen Scherraten zeigte sich bei einer OPHN1-Defizienz eine verstärkte Thrombusbildung, bei mittleren und hohen Scherraten konnte hingegen kein Unterschied zwischen WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Blut beobachtet werden. Danach beeinflusst OPHN1 den Prozess der Thrombusbildung vor allem unter niedrigen Flussgeschwindigkeiten, wie sie in venösen Gefäßen herrschen.

Um zu klären, in wie weit sich die aktivatorische Ausprägung des OPHN1-*Knockouts* auf die physiologische Hämostase auswirkt, wurde die Schwanzblutungszeit bei *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäusen gemessen. Im Vergleich zu WT-Mäusen war die Zeit bis zum Eintreten des Wundverschlusses bei den *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäusen verkürzt. Dies zeigt, dass OPHN1 ein wesentlicher Faktor im Prozess der Blutgerinnung ist.

#### **6.2.5. OPHN1 im ITAM-abhängigen GPVI-Signalweg**

Die Aktivierung des Kollagen-Rezeptors GPVI führt zur Initiation einer Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen, die in der Phosphorylierung und Aktivierung des Enzyms Phospholipase  $\text{C}\gamma\text{2}$  (PLC $\gamma\text{2}$ ) kulminiert (Watson, 2011). Aufgrund der Vermutung, dass OPHN1 speziell in der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung involviert ist, wurde hier die Phosphorylierung von PLC $\gamma\text{2}$  in *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten nach Stimulation des GPVI-Rezeptors durch CRP untersucht. Dabei konnte im aktivierten Zustand der *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten eine gegenüber WT-Thrombozyten verstärkte Tyrosinphosphorylierung

von PLC $\gamma$ 2 nachgewiesen werden. Der Verlust von OPHN1 führt demnach zu einer erhöhten PLC $\gamma$ 2-Aktivität in Thrombozyten.

Überexpressionsstudien sowie Studien mit Rac1-defizienten Thrombozyten konnten zeigen, dass Rac1 essentiell für die Aktivierung von PLC $\gamma$ 2 ist (Piechulek, 2005; Pleines, 2009). Dabei hatte jedoch weder der Überschuss noch das Fehlen von Rac1 einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung von PLC $\gamma$ 2, sondern allein auf die Produktion des durch die PLC $\gamma$ 2-Aktivität entstehenden Spaltprodukts Inositoltrisphosphat (IP $_3$ ). Diese wurde anhand der Akkumulation des IP $_3$ -Metabolits Inositolmonophosphat (IP $_1$ ) gemessen. Eine IP $_3$ -Quantifizierung in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten konnte aufgrund zeitlicher Beschränkungen nicht durchgeführt werden. Es ist durchaus denkbar, dass in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Aktivität von PLC $\gamma$ 2 und der erhöhten Aktivität von Rac1, die wiederum durch die fehlende Inhibition durch OPHN1 bedingt wird, besteht. Hierzu sollten weitere Untersuchungen dieses Signalwegs Aufschluss geben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Funktionsverlust von OPHN1 in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten mit einer verstärkten Zytoskelettdynamik sowie einem aktivatorischen Phänotyp assoziiert ist. Dieser ist vermutlich auf die erhöhte Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und insbesondere von Rac1 - aufgrund der fehlenden Inhibition durch OPHN1 - zurückzuführen. Diese Befunde stützen die These, dass OPHN1 ein Regulator von RhoA, Cdc42 und Rac1 und von zytoskelettalen Prozessen in Thrombozyten ist und dadurch eine wesentliche Rolle in der Thrombusbildung und Hämostase spielt.

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse weitgehend in sich konsistent sind, ist nicht auszuschließen, dass die erhöhte Aktivität der drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 komplexe Mechanismen auslösen, die sich nicht durch ein eindimensionales Signalkaskaden-Model erklären lassen. So ist denkbar, dass neben OPHN1 weitere GAP-Proteine an der Regulation der Thrombozytenfunktion beteiligt sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Aktivität von OPHN1 in den *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten durch andere Proteine mit redundanter Funktion ersetzt wird.

#### **6.2.6. Vergleich - OPHN1 in humanen Thrombozyten**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die in *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten erhöhte Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 Einfluss auf die Zytoskelettdynamik, Aktivierungsmechanismen und die Hämostase hat. Bleijerveld *et al.* (2013) führten verschiedene funktionale Analysen mit Thrombozyten aus Patienten mit Oligophrenie durch, bei denen davon ausgegangen wurde, dass sie kein OPHN1 exprimieren. Die

Thrombozyten der untersuchten Patienten zeigten sowohl eine normale Menge an Oberflächen-P-Selectin als auch eine normale Aktivierung von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  nach GPVI-Stimulation. Desweiteren konnte keine veränderte Dynamik des *Spreading*-Prozesses auf Fibrinogen beobachtet werden. Ein maßgeblicher Unterschied zwischen gesunden Probanden und Patienten trat dagegen beim *Spreading* der Thrombozyten auf Kollagen-Peptiden auf. Die Thrombozyten der Patienten wiesen dabei eine signifikant reduzierte Filopodienbildung auf, während die Bildung der Lamellipodien unverändert war.

Eine mögliche Erklärung dieser Abweichung zu den hier dargestellten Daten ist, dass es bei den untersuchten Patienten trotz der Mutation des OPHN1-Gens zu einer zumindest partiellen Expression von OPHN1 kommt. Bei zwei der vier Patienten lag eine Basenmutation am Ende der GAP-Domäne vor, die weit entfernt vom aktiven Zentrum einen Aminosäure-Austausch verursacht (Val533Glu). Dies hat die Expression einer verkürzten Form von OPHN1 zur Folge, der allein der C-terminale Abschnitt, der auf die GAP-Domäne folgt, fehlt. Es ist möglich, dass diese Form des Proteins über eine uneingeschränkte GAP-Aktivität verfügt. Somit ist nicht gewährleistet, dass bei den entsprechenden Patienten ein Funktionsverlust von OPHN1 vorliegt. Die beschriebenen Eigenschaften der Thrombozyten können somit nicht uneingeschränkt auf das Fehlen von OPHN1 zurückgeführt werden. Cdc42 wird als entscheidender Faktor bei der Filopodienbildung diskutiert. Die beobachtete reduzierte Filopodienbildung legt den Schluss nahe, dass diese durch die fehlende Regulation von Cdc42 durch OPHN1 bedingt ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Cdc42 für die Entstehung von Filopodien nicht essentiell ist und bei diesem Prozess möglicherweise nur eine redundante Rolle spielt (Goh *et al.*, 2011; Pellegrin *et al.*, 2005). Eine OPHN1-Defizienz muss demnach nicht zwangsläufig die Ursache für eine verminderte Filopodienbildung sein. Weiterhin wurden keine Untersuchungen zur Aktivität der Rho-GTPasen in den humanen Thrombozyten unternommen. Es bleibt demnach ungeklärt, ob diese in den Thrombozyten der Patienten beeinträchtigt ist. Schließlich ist die Anzahl der Probanden mit vier untersuchten Patienten sehr klein. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu belastbaren Befunden zu gelangen.

### **6.3. Regulierung von OPHN1 durch Phosphorylierung**

#### **6.3.1. Tyrosinphosphorylierung von OPHN1 durch Src**

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit behandelte die Frage, wie OPHN1 selbst reguliert wird. In den hierzu durchgeführten Analysen sollte ermittelt werden, ob die GAP-Aktivität von OPHN1 neben der Autoinhibition durch die BAR-Domäne durch weitere Mechanismen reguliert wird. OPHN1 verfügt über zwei potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen. Eine

befindet sich zwischen der PH- und der GAP-Domäne (Y370), die zweite innerhalb der GAP-Domäne (Y480) (Hornbeck *et al.*, 2012). Eine Regulation der GAP-Aktivität von OPHN1 über eine Tyrosinphosphorylierung, wie es für andere GAP-Proteine der Fall ist, ist demnach möglich.

Durch Immunpräzipitation mit einem anti-Tyrosinphosphorylierung-Antikörper (4G10) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass OPHN1 in murinen Thrombozyten an Tyrosin phosphoryliert wird. Nach einer Stimulation der Thrombozyten nahm die Phosphorylierung zu. Eine Aktivierung des Thrombozyten beeinflusst demnach den Phosphorylierungsgrad von OPHN1.

Daraus ergab sich die Frage, welches Enzym für die Phosphorylierung von OPHN1 verantwortlich ist. Da die Tyrosinkinase Src bereits als Regulator des RhoGAP-Proteins p190RhoGAP beschrieben worden ist (Aslan und McCarty, 2012), wurde sie in dieser Arbeit als potentieller Kandidat für die Phosphorylierung von OPHN1 analysiert.

Immunpräzipitationen aus Thrombozytenlysaten konnten zeigen, dass OPHN1 mit Src interagiert und dass diese Wechselwirkung im Laufe einer Aktivierung zunimmt. Die Aktivierungsbedingte Zunahme der Phosphorylierung und die gleichzeitig zunehmende Interaktion mit Src geben Anlass zu der Vermutung, dass die Aktivierung von Thrombozyten zu einer Src-vermittelten Phosphorylierung von OPHN1 führt.

Diese Hypothese konnte durch Überexpressionsstudien gestützt werden, bei denen die Phosphorylierung von OPHN1 in A5-CHO-Zellen nach einer Transfektion von Src deutlich zunahm. Bei einem Einsatz des Src-Inhibitors PP2 konnte die Phosphorylierung von OPHN1 - sowohl in A5-CHO-Zellen als auch in Thrombozyten - nahezu verhindert werden.

Um die Frage zu beantworten, welche der beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen phosphoryliert wird, wurden durch ortsspezifische Mutagenese OPHN1-Konstrukte generiert, in denen die betreffenden Tyrosinreste durch Alanin ausgetauscht waren. Diese wurden zur Überexpression in A5-CHO-Zellen transfiziert. Dabei stellte sich heraus, dass hauptsächlich das Tyrosin an der Position 370, das sich zwischen PH- und GAP-Domäne befindet, phosphoryliert wird. Das Tyrosin an Position 480 wurde nur in einem sehr geringfügigen Maß phosphoryliert. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Bleijerveld *et al.* (2013) überein, bei denen im Rahmen einer proteomischen Analyse von aktivierten Thrombozyten hauptsächlich an Tyrosin 370 phosphoryliertes OPHN1 identifiziert werden konnte.

### 6.3.2. Die Phosphorylierung von Tyrosin 370 beeinflusst die Aktivität von OPHN1

Weiterhin sollte anhand der OPHN1-Phosphomutanten untersucht werden, ob und wie die Tyrosinphosphorylierung die GAP-Aktivität von OPHN1 beeinflusst. Dazu wurden A5-CHO-Zellen mit WT-OPHN1 und der OPHN1-Mutante Y370A, bei der die Phosphorylierungsstelle an Position 370 deletiert war, transfiziert und die RhoA-Aktivität mittels G-LISA® bestimmt. Dabei konnten widersprüchliche Ergebnisse beobachtet werden. Wurden die beiden Konstrukte einzeln transfiziert, wies Y370A über eine mit WT-OPHN1 vergleichbare GAP-Aktivität auf und senkte die Menge an aktivem RhoA stark. Wurden die Konstrukte allerdings zusammen mit Src transfiziert, wies allein das genuine OPHN1 GAP-Aktivität auf. Es ist davon auszugehen, dass die Anwesenheit von Src zur Phosphorylierung von WT-OPHN1 führt. Das Ergebnis spricht dafür, dass die verstärkte Phosphorylierung, die bei WT-OPHN1 und in nur sehr geringem Maß bei der Mutante Y370A auftritt, eine Steigerung der GAP-Aktivität bewirkt.

Eine funktionelle Analyse der Mutante Y370A wurde anhand von *Spreading*-Experimenten mit A5-CHO-Zellen, die mit den Konstrukten transfiziert waren, durchgeführt. Dabei war zu beobachten, dass die mit WT-OPHN1 transfizierten Zellen einen drastischen Adhäsionsdefekt auf Fibrinogen aufwiesen. Dieser wurde bereits von Elvers *et al.* (2012) beschrieben und steht im Einklang mit der oben beschriebenen Analyse der *ophn1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten: Während eine OPHN1-Defizienz zu einer gesteigerten Adhäsion führt, bewirkt ein Überschuss an OPHN1 - wahrscheinlich aufgrund einer verstärkten Inhibition der Rho-GTPasen - eine verminderte Adhäsion. Wurden die Zellen hingegen mit der Mutante Y370A transfiziert, war der Adhäsionsdefekt deutlich schwächer. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Aktivität von OPHN1 durch die Phosphorylierung gefördert wird.

Bei einer Transfektion mit WT-OPHN1 wurden zudem deutlich weniger Pseudopodien ausgebildet als bei Kontrollzellen, was ebenfalls bereits von Elvers *et al.* (2012) gezeigt werden konnte. Auch dieser Effekt ist auf eine verstärkte Inhibition der Rho-GTPasen zurückzuführen. Die Zellen, die mit Y370A transfiziert wurden, zeigten hingegen eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Pseudopodienbildung. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 370 einen verstärkenden Effekt auf die GAP-Aktivität von OPHN1 hat.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass OPHN1 in Thrombozyten durch Aktivierung phosphoryliert wird und dass es mit der Proteinkinase Src interagiert. Überexpressionsstudien konnten außerdem belegen, dass Src in der Lage ist, OPHN1 zu

phosphorylieren. Dies deutet darauf hin, dass Src im Laufe einer Thrombozytenaktivierung OPHN1 phosphoryliert und damit zur Regulation der GAP-Aktivität beiträgt.

Welche Auswirkungen die Phosphorylierung auf die GAP-Aktivität von OPHN1 genau hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Allerdings weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung ein aktivierender Faktor ist, da die von WT-OPHN1 ausgelösten Effekte wie Reduktion der RhoA-Aktivität, Adhäsionsdefekt, reduzierte Pseudopodienbildung bei der Phosphomutante Y370A, die nicht an Tyrosin 370 phosphoryliert werden kann, in verminderter Form oder gar nicht eintraten.

Möglicherweise ist die Phosphorylierung von OPHN1 an Tyrosin 370 nicht der maßgebende Mechanismus zur Regulation der GAP-Aktivität; eher trägt die Phosphorylierung zur Feinregulierung der Aktivität bei.

Es muss angemerkt werden, dass die Untersuchungen der A5-CHO-Zellen bei einer Kotransfektion der OPHN1-Konstrukte mit Src durch das stark schwankende Expressionsniveau der transfizierten Konstrukte erschwert wurden. Die für valide Ergebnisse nötige Anzahl an Experimenten konnte deshalb nicht durchgeführt werden. Aus demselben Grund konnte ausschließlich die Aktivität der Mutante Y370A untersucht werden. Für eine genauere Bestimmung der funktionalen Rolle der Phosphorylierung von OPHN1 sind weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. eine Bestimmung der Aktivität der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 in Anwesenheit der Phosphomutanten.

#### **6.4. Fazit und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde das RhoGAP-Protein OPHN1 in Thrombozyten untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass OPHN1 aufgrund seiner GAP-Aktivität eine kritische, regulatorische Rolle bei Prozessen der zytoskeletalen Reorganisation und der Aktivierung von Thrombozyten spielt. Damit konnten wesentliche Funktionen von OPHN1 in der Thrombozytenfunktion charakterisiert werden.

Die Funktion von OPHN1 als Regulator der Zytoskelettorganisation und von Aktivierungsmechanismen in Thrombozyten macht das Protein zu einem potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antithrombotischer Therapiestrategien.

GPVI wurde bereits als vielversprechendes *Target* zur Behandlung von vaskulären Erkrankungen identifiziert (Ungerer *et al.*, 2013). Dies macht auch die Faktoren, die in der GPVI-vermittelten Signalkaskade involviert sind, für neue antithrombotische Ansätze interessant. Auch ein Zusammenhang zwischen Rac1-Aktivität und OPHN1 würde das Protein zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Therapie von

durchblutungsbedingten Erkrankungen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt machen. So konnte etwa gezeigt werden, dass *Rac1*-defiziente Mäuse vor arterieller Thrombose geschützt sind (Pleines *et al.*, 2009).

Weiterführende Untersuchungen zur Rolle von OPHN1 in Thrombozyten sind deshalb wünschenswert. Ein Ansatz wäre die Identifizierung weiterer Bindungspartner von OPHN1. Damit könnte OPHN1 in bestimmte Signalwege eingeordnet werden. Zum anderen könnten dadurch potentielle OPHN1-regulierende Faktoren ermittelt werden.

Eine detaillierte Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle wie auch die Rezeptorphosphorylierung in *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten mithilfe von Phospho-Arrays könnte weiterhin Aufschluss über die Rolle von OPHN1 in Signaltransduktionsprozessen in Thrombozyten geben.

Interessant wäre auch eine Bestimmung des Aktivierungs-vermittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs in *ophn1<sup>-/-</sup>*-Thrombozyten. Darüber könnte untersucht werden, ob OPHN1 an Prozessen, die zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom – entweder aus intrazellulären Speichern oder aus dem extrazellulären Kompartiment – führen, beteiligt ist.



## 7. Literaturverzeichnis

**Akbar H, Shang X, Perveen R, Berryman M, Funk K, Johnson J F, Tandon N N, Zheng Y.**

(2011) Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation. *PLoS One* 6(7):e22117.

**Aslan J E, McCarty O J.**

(2013) Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost* 11(1): 35-46.

**Badimon J J, Ibanez B, Vilahur G.**

(2007) Pathophysiology of arterial thrombosis, in *Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders: A Clinical Handbook* (Editoren: P. Gresele, V. Fuster, J. A. Lopez, C. P. Page, J. Vermylen), Cambridge University Press

**Barkalow K, Witke W, Kwiatkowski D, Hartwig J.**

(1996) Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein. *J. Cell Biol.* 134:389–99

**Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schoneborn S, Eggermann T, Häusler M, Mull M, Ramaekers V T.**

(2003) Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain* 126(7):1537-44

**Bleijerveld O B, van Holten T C, Preisinger C, van der Smagt J J, Farndale R W, Kleefstra T, Willemsen M H, Urbanus R T, de Groot P G, Heck A J, Roest M, Scholten A.**

(2013) Targeted phosphotyrosine profiling of glycoprotein VI signaling implicates oligophrenin-1 in platelet filopodia formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(7):1538-43.

**Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet M C, Zemni R, Roest Crollius H, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns J P, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J.**

(1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 392(6679):923-6.

**Bishop A L, Hall A.**

(2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348(2): 241-55.

**Born, G V R.**

(1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-9.

**Bos J L, Rehmann H, Wittinghofer A.**

(2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129(5):865-77.

**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.

**Brown T A.**

(2002) *Genomes*, 2nd edition, Oxford: Wiley-Liss.

**Clemetson K J, Clemetson J M.**

(2013) Platelet receptors. in *Platelets*, 3. Ausgabe (Editor Michelson A D), Academic Press

**de Kreuk B J, Schaefer A, Anthony E C, Tol S, Fernandez-Borja M, Geerts D, Pool J, Hambach L, Goulmy E, Hordijk P L.**

(2013) The Human Minor Histocompatibility Antigen1 Is a RhoGAP. *PLoS One* 8(9):e73962.

**Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E.**

(2012) Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol.* 3:130.

**Eberth A.**

(2006) Regulatorische Mechanismen in der Signaltransduktion kleiner GTPasen der Rho-Familie, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

**Eberth A, Lundmark R, Gremer L, Dvorsky R, Koessmeier K T, McMahon H T, Ahmadian M R.**

(2009) A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J.* 417(1):371-7.

**Elvers M, Beck S, Fotinos A, Ziegler M, Gawaz M.**

(2012) The GRAF family member oligophrenin1 is a RhoGAP with BAR domain and regulates Rho GTPases in platelets. *Cardiovasc Res.* 94(3):526-36.

**Emschermann P.**

(1999) *Lexikon der Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag

**Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet M C, Ahmadian M R, Chelly J, Billuart P.**

(2003) The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci.* 23(4):574-86.

**Freyberger H J, Dilling H.**

(2010) *Taschenführer zur ICD-10-Klassifikation psychischer Störungen*, 5. Auflage, Hans Huber Verlag

**Frojmovic M M, O'Toole T E, Plow E F, Loftus J C, Ginsberg M H.**

(1991) Platelet glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3 integrin) confers fibrinogen- and activation-dependent aggregation on heterologous cells. *Blood* 78(2):369-76.

**Flaumenhaft R.**

(2011) Platelets get the message. *Blood* 118 (7): 1712-3.

**Fox J E B.**

(2001) Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thrombosis and Haemostasis* 86(1):198-213

**Gawaz M.**

(1999) *Das Blutplättchen*. Thieme Verlag

**Gerrard J M, White J G, Rao G H, Townsend D.**

(1976) Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol.* 83(2):283-98

**Goh W I, Sudhaharan T, Lim K B, Sem K P, Lau CL, Ahmed S.**

(2011) Rif-mDia1 interaction is involved in filopodium formation independent of Cdc42 and Rac effectors. *J Biol Chem.* 286(15):13681-94.

**Govek E E, Newey S E, Akerman C J, Cross J R, Van der Veken L, Van Aelst L.**

(2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci.* 7(4):364-72.

**Hartwig J, Italiano J.**

(2003) The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 1(7):1580-6.

**Hartwig J H.**

(2013) **Platelet structure.** in *Platelets*, 3. Ausgabe (Editor Michelson A D), Academic Press

**Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T.**

(2011), *Der Experimentator: Neurowissenschaften*, Springer Verlag

**Hornbeck P V, Kornhauser J M, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M.**

(2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse, *Nucleic Acids Res.* 40:D261-70.

**Jackson S P, Schoenwaelder S M.**

(2003) Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov.* 2(10):775-89.

**Jaffe A B, Hall A.**

(2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69.

**Jirouskova M, Shet A S, Johnson G J.**

(2007) A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 5: 661–9.

**Josefsson E C, Dowlind M R, Lebois M, Kile B T.**

(2013) The regulation of platelet life span, in *Platelets*, 3. Ausgabe, Academic Press

**Jurk K, Kehrel B E.**

(2005) Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 31(4):381-92.

**Kauskot A und Hoylaerts M F.**

(2012) Platelet Receptors, in *Antiplatelet Agents (Handbook of Experimental Pharmacology)* (Editoren: P. Gresele, G V R Born, C Patrono, C P Page), Springer-Verlag Berlin Heidelberg

**Kehrel B E.**

(2008) Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* 28: 289-98.

**Khelifaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbron C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P.**

(2007) Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J. Neurosci.* 27(35):9439-50

**Khelifaoui M, Pavlowsky A, Powell A D, Valnegri P, Cheong K W, Blandin Y, Passafaro M, Jefferys J G, Chelly J, Billuart P.**

(2009) Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Hum Mol Genet.* 18(14):2575-83.

**Laemmli U K.**

(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.

**Lexikon der Biologie**

(1999) Spektrum Akademischer Verlag

**Longenecker K L, Zhang B, Derewenda U, Sheffield P J, Dauter Z, Parsons JT, Zheng Y, Derewenda Z S.**

(2000) Structure of the BH domain from graf and its implications for Rho GTPase recognition. *J Biol Chem.* 275(49):38605-10.

**Luo L.**

(2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis, *Nature Reviews Neuroscience* 1, 173-180.

**Macey M G.**

(2007) *Flow cytometry: principles and applications.* Humana Press

**McCarty O J, Larson M K, Auger J M, Kalia N, Atkinson B T, Pearce A C, Ruf S, Henderson R B, Tybulewicz V L, Machesky L M, Watson S P.**

(2005) Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *J Biol Chem.* 280(47):39474-84.

**Michelson A D, Ellis P A, Barnard MR, Matic GB, Viles A F, Kestin A S.**

(1991) Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood* 77(4): 770-9.

**Michelson A D.**

(2011) Advances in antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 62-9.

**Moon S Y, Zheng Y.**

(2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 13(1):13-22.

**Morgenstern E.**

(1999) Morphologie der Thrombozyten, in *Hämostaseologie* (Editoren: G. Müller-Berghaus, B. Pötzsch), Springer-Verlag Berlin Heidelberg

**Mülhardt C.**

(2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

**Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Van Aelst L.**

(2011) Rapid synthesis of the X-linked mental retardation protein OPHN1 mediates mGluR-dependent LTD through interaction with the endocytic machinery. *Neuron.* 72(2):300-15.

**Nelson D, Cox M**

(2001) *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Editoren: D Nelson, M Cox, Springer-Verlag

**Offermanns S.**

(2006) Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. *Circulation Research* 99: 1293-1304.

**Park K, Bavry A A**

(2013) Aspirin: Its risks, benefits, and optimal use in preventing cardiovascular events; *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 80(5) 318-26.

**Pellegrin S, Mellor H.**

(2005) The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol.* 15(2):129-33.

**Peters H C.**

(2004) Transgene induzierbare Expression von dominant-negativen KCNQ2 Kaliumkanal-Untereinheiten im Gehirn der Maus. *Tenea Verlag.*

**Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, Vatter P, Moepps B, Gierschik P.**

(2005) Isozyme-specific stimulation of phospholipase C-gamma2 by Rac GTPases. *J Biol Chem.* 280(47):38923-31.

**Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Nieswandt B.**

**(2009)** Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch* 457(5):1173-85.

**Pleines I, Eckly A, Elvers M, Hagedorn I, Eliautou S, Bender M, Wu X, Lanza F, Gachet C, Brakebusch C, Nieswandt B.**

**(2010)** Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood* 115(16): 3364-73.

**Raju N C, Eikelboom J W, Hirsh J**

**(2008)** Platelet ADP-receptor antagonists for cardiovascular disease: past, present and future. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5(12): 766-80.

**Reininger A J.**

**(2007)** Koagulatorische Aktivität der Thrombozyten. *Hämostaseologie* 27(4): 247-50.

**Rivera J, Lozano L, Navarro-Núñez L und Vicente V.**

**(2009)** Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94(5):700-11

**Ruggeri Z M, Mendolicchio G L**

**(2007)** Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 100(12):1673-85.

**Saiki R K, Gelfand D H, Stoffe S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A.**

**(1988)** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239:487-91.

**Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T.**

**(2012)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-Volume Set*, Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Sanger F, Nicklen S, Coulson A R.**

**(1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.

**Spiering D, Hodgson L.**

**(2011)** Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr.* 5(2):170-80.

**Statistisches Bundesamt, Wiesbaden**

**Stradal T E B, Wehland J**

**(2005)** Aktindynamik und WASP/ WAVE-Proteine, *Biospektrum*, Ausgabe 3, 283-286

**Tcherkezian J, Lamarche-Vane N.**

**(2007)** Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell.* 99(2):67-86.

**Tracy P B, Mann K G.**

(1983) Prothrombinase complex assembly on the platelet surface is mediated through the 74,000-dalton component of factor Va. *Proc Natl Acad Sci* 80(8): 2380–84.

**Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, Goebel S, Vogelmann J, Holthoff H P, Gawaz M, Münch G.**

(2013) The GPVI-Fc fusion protein Revcept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PLoS One* 8(8):e71193.

**Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B.**

(2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3):403-12

**Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B.**

(2009) Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 7(7):1057-66

**Villalonga P, Ridley A J.**

(2006) Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24(3): 159-64.

**Watson S P, Harrison P.**

(2010) The vascular function of platelets, in *Postgraduate Haematology*, 6. Ausgabe (Editoren A. V. Hoffbrand, D. Catovsky, E. G. Tuddenham and A. R. Green), Wiley-Blackwell, Oxford

**White J G.**

(2013) Platelet structure, in *Platelets*, 3. Ausgabe (Editor Michelson A D), Academic Press

**Internet-Datenbanken:**

<https://www.destatis.de>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz möchte ich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel sowie für die fachliche Unterstützung danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Herausforderungen des Laboralltags und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Sandra Beck für ihre umfassende Unterstützung, Qifeng Zhou, Christina Flaum, Klaudia Posavec, Lydia Laptev, Jadwiga Kwiatkowska, Tobias Jürgens, Tanja Schönberger, Catharina Wahle, Mita Chatterjee und Katja Metzger.

Herrn Dr. Patrick Münzer danke ich sehr für die Messungen der ATP-Freisetzung und der Thrombozytenaggregation, Frau Birgit Fehrenbacher und Frau Monika Meinert für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die freundliche Beratung und Herrn Dr. Andreas Mack für die ausführliche Einführung in die Methode der konfokalen Mikroskopie.

Herrn Dr. Pierre Billuart danke ich für die Bereitstellung der *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäuse, Frau Dr. Antje Semrau für die Durchsicht und Korrektur der Tierversuchsanzeige und Sandra Homberger für die Versorgung der Versuchsmäuse.

Mein persönlicher Dank richtet sich an meine Familie und Freunde, insbesondere an Eva für ihre stete Unterstützung und die vielen motivierenden Telefongespräche und an Ursula und meinen Großvater für den moralischen Rückhalt. Ganz besonders möchte ich meiner Mutter für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre wertvollen Ratschläge und für alles andere danken!



## 9. Akademischer Lebenslauf

Name: Anna Fotinos  
geboren: 08.04.1981 in Tübingen

### Schulbildung:

1991 – 2000 Hölderlin-Gymnasium in Heidelberg  
Mai 2000 Abitur

### Studium:

Okt. 2002 – Mai 2003 Zwei Semester Medizinstudium an der Universität  
Pierre et Marie Curie, Paris

Okt. 2003 – Okt. 2006 Bachelorstudium Chemie an der Freien Universität  
Berlin  
Bachelorarbeit zu "Proteomische Charakterisierung  
der MPDZ-PDZ11-Domäne mittels invertierter  
Peptidarrays" am Institut für medizinische  
Immunologie, Charité, Berlin

Okt. 2006 – Jan. 2010 Masterstudium Chemie an der Freien Universität  
Berlin  
Masterarbeit zu „Konstruktion und Analyse von  
abspaltbaren GlykoTags aus  
Glykosylierungsdomänen verschiedener  
Glykoproteine“ am Zentralinstitut für  
Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité,  
Berlin

### Promotion:

Juli 2010 – Dez. 2013 Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaft-  
lichen Fakultät der Eberhard Karls Universität  
Tübingen

### Wissenschaftliche Tätigkeit:

Seit Januar 2014 Wissenschaftliche Angestellte, Universitätsklinikum  
Tübingen, Innere Medizin III, Kardiologie

## 10. Anhang

### 10.1. Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
COX-1	Cyclooxygenase-1
CRP	<i>collagen-related peptide</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTS	<i>dense tubular system</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fg	Fibrinogen
fl	Femtoliter
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GP	Glykoprotein
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>

---

GTC	Guanidiniumthiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LRR	<i>leucine-rich repeated</i>
LIMK	<i>LIM motif-containing protein kinase</i>
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mDia	<i>mammalian diaphanous</i>
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
OD	optische Dichte
OCS	<i>open canalicular system</i>
<i>ophn1<sup>-/-</sup></i>	OPHN1-Knockout (zur Vereinfachung werden in dieser Arbeit auch die männlichen Mäuse mit einem OPHN1-Gen-Knockout <i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse bezeichnet (eigentlich <i>ophn1<sup>-/-y</sup></i> ))
PAK1	<i>p21 activated kinase1</i>
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline, mit Zusatz von 0,1% Tween® 20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C

PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac1	<i>ras related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RhoA	<i>ras homologous A</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>scanning electron microscope</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSC	<i>side scatter</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	<i>transmission electron microscope</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan
U	Einheit
U46	U46619 (PGH <sub>2</sub> -Analogon)
v/v	<i>volume per volume</i>
vWF	von Willebrand factor
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
XLMR	<i>X-linked mental retardation</i>
-/-	Wildtyp
+/+	<i>Knockout</i>

---

**10.2. Buchstaben-Code der Aminosäuren**

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstaben-Code</b>	<b>Einbuchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

**10.3. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 3-1: Thrombozyten (murin) im aktivierten Zustand.....	5
Abbildung 3-2: Aktivierungs-bedingte Ausbildung von Stressfasern, Filopodien und Lamellipodien bei Thrombozyten.....	7
Abbildung 3-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ruhenden Thrombozyten (murin) zur Darstellung der Speichergranula und des offenen kanalikulären Systems. ....	8
Abbildung 3-4: Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten im Bereich einer Gefäßwandsverletzung. ....	10
Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Hauptsignalwege bei der Thrombozytenaktivierung.....	14
Abbildung 3-6: Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen. ....	16
Abbildung 3-7: Effektoren von RhoA und deren Einfluss auf die Aktivierungs-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts von Thrombozyten.....	17
Abbildung 3-8: Effektoren von Rac1 und Cdc42 und deren Einfluss auf die Aktivierungs-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts von Thrombozyten.....	18
Abbildung 3-9: Molekularer Mechanismus der Hydrolyse des Guanosintriphosphats (GTP) einer Rho-GTPase durch ein GAP-Protein. ....	19
Abbildung 3-10: Domänenstruktur von OPHN1 .....	20
Abbildung 5-1: OPHN1 kolokalisiert in Thrombozyten mit filamentösem Aktin.....	48
Abbildung 5-2: OPHN1 interagiert in Thrombozyten mit GP1ba. ....	49
Abbildung 5-3: Nachweis des OPHN1-Gen- <i>Knockouts</i> in <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten.....	50
Abbildung 5-4: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine normale Thrombozytenzahl und ein normales Volumen sowie eine unveränderte Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf.....	50
Abbildung 5-5: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine erhöhte Anfälligkeit für Aktivierung auf. ....	51
Abbildung 5-6: Die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 ist in <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten erhöht. ....	52
Abbildung 5-7: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen nach einer Stimulation mit CRP eine erhöhte Adhäsion und Lamellipodienausbildung beim <i>Spreading</i> auf Fibrinogen auf. ....	54
Abbildung 5-8: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen nach einer Stimulation mit Thrombin eine erhöhte Adhäsivität und Lamellipodienausbildung beim <i>Spreading</i> auf Fibrinogen auf. ....	55
Abbildung 5-9: Unbehandelte <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine verstärkte Pseudopodienausbildung beim <i>Spreading</i> auf Fibrinogen auf.....	56

---

Abbildung 5-10: WT- und <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine vergleichbare Adhäsivität beim <i>Spreading</i> auf Kollagen nach Stimulation mit CRP auf. ....	57
Abbildung 5-11: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine normale Verteilung der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 auf. ....	58
Abbildung 5-12: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine verstärkte Fibrinogenbindung und eine erhöhte Menge an Oberflächen-P-Selectin nach ihrer Aktivierung auf. .	59
Abbildung 5-13: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine verstärkte ATP-Freisetzung nach Aktivierung auf. ....	60
Abbildung 5-14: <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten weisen eine normale Aggregation auf. ....	61
Abbildung 5-15: Vollblut aus <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen weist unter niedrigen Scherraten eine verstärkte Thrombusbildung auf Kollagen auf. ....	62
Abbildung 5-16: Die Tyrosin-Phosphorylierung von PLCγ2 ist in <i>ophn1</i> <sup>-/-</sup> -Thrombozyten nach Stimulation mit CRP verstärkt. ....	63
Abbildung 5-17: OPHN1 wird in Thrombozyten durch Aktivierung mit CRP phosphoryliert. ...	64
Abbildung 5-18: OPHN1 interagiert in Thrombozyten nach einer Aktivierung mit CRP verstärkt mit Src. ....	65
Abbildung 5-19: OPHN1 wird bei einer Src-Überexpression phosphoryliert. ....	66
Abbildung 5-20: Die Phosphorylierung von OPHN1 wird in Thrombozyten durch den Src-Inhibitor PP2 blockiert. ....	66
Abbildung 5-21: Generierung der OPHN1-Mutanten Y370A, Y480A und Y370/480A. ....	67
Abbildung 5-22: Expression der OPHN1-Phosphomutanten Y370A, Y480A und Y370/480A in A5-CHO-Zellen. ....	68
Abbildung 5-23: OPHN1 wird hauptsächlich an Tyrosin 370 phosphoryliert. ....	68
Abbildung 5-24: Einfluss der Mutation von Tyrosin 370 auf die GAP-Aktivität von OPHN1 bei RhoA. ....	69
Abbildung 5-25: Die Mutation von Tyrosin 370 vermindert von OPHN1 induzierte Effekte bei der Adhäsion und Pseudopodienausbildung von A5-CHO-Zellen. ....	70

**10.4. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3-1: Thrombozytäre Rezeptoren und ihre Liganden.....	12
Tabelle 4-1: Geräte .....	24
Tabelle 4-2: Verbrauchsmaterial .....	25
Tabelle 4-3: Software .....	25
Tabelle 4-4: Reagenzien .....	26
Tabelle 4-5: Puffer und Lösungen .....	28
Tabelle 4-6: Agonisten .....	28
Tabelle 4-7: Inhibitoren .....	29
Tabelle 4-8: Kit-Systeme .....	29
Tabelle 4-9: Narkose- und Schmerzmittel .....	29
Tabelle 4-10: Bakterien .....	30
Tabelle 4-11: Vektoren.....	30
Tabelle 4-12: Primer.....	30
Tabelle 4-13: Verschiedene Enzyme.....	31
Tabelle 4-14: Restriktionsenzyme .....	31
Tabelle 4-15: Primäre Antikörper.....	31
Tabelle 4-16: Sekundäre Antikörper .....	32
Tabelle 4-17: Pipettierschema für Polyacrylamid-Gele für die Gelelektrophorese .....	41
Tabelle 10-1: PCR-Ansatz für die Genotypisierung von WT- und <i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	99
Tabelle 10-2: PCR-Programm für die Genotypisierung von WT- und <i>ophn1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	99
Tabelle 10-3: PCR-Ansatz für die Amplifizierung der OPHN1-Nukleotidsequenz ausgehend von komplementärer DNA.....	100
Tabelle 10-4: PCR-Programm für die Amplifizierung der OPHN1-Nukleotidsequenz ausgehend von komplementärer DNA.....	100
Tabelle 10-5: PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese zur Deletion der Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1. ....	101
Tabelle 10-6: PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese zur Deletion der Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1. ....	101



## 10.5. PCR-Protokolle

### Genotypisierung mittels PCR

Zur Bestimmung des Genotyps der transgenen Mäuse wurde ein Fragment des betreffenden Genabschnitts der genomischen DNA aus Ohrbiopsien mittels PCR amplifiziert. Im Fall der *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäuse war das PCR-Produkt durch die integrierte Basensequenz um 100 Basenpaare länger und konnte so vom Wildtyp unterschieden werden (WT: 492; *ophn1<sup>-/-</sup>*: 592 bp)

**Tabelle 10-1: PCR-Ansatz für die Genotypisierung von WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäusen.**

ddH <sub>2</sub> O	13,4 µl
5 x Green GoTaq Flexi Buffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 nM)	2 µl
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, je 10 mM)	0,5 µl
KOF („forward“-Primer, 10 pmol/µl)	1,25 µl
KOR („reverse“-Primer, 10 pmol/µl)	1,25 µl
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
DNA (Eluat aus Säulenaufreinigung)	1,5 µl

**Tabelle 10-2: PCR-Programm für die Genotypisierung von WT- und *ophn1<sup>-/-</sup>*-Mäusen.**

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Hybridisierung	60 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	5 min

35 Zyklen

### Amplifizierung der OPHN1-Nukleotidsequenz ausgehend von komplementärer DNA

Zur Generierung eines OPHN1-Plasmids wurde die Nukleotidsequenz von OPHN1 ausgehend von komplementärer DNA (hergestellt ausgehend von RNA aus WT-Thrombozyten) amplifiziert, um diese anschließend in einen Vektor integrieren zu können.

**Tabelle 10-3: PCR-Ansatz für die Amplifizierung der OPHN1-Nukleotidsequenz ausgehend von komplementärer DNA.**

ddH <sub>2</sub> O	11,7 µl
5x Phusion® HF Buffer	4 µl
dNTPs, je 10 mM	0,4 µl
OPHN1_for („forward“-Primer, 10 pmol/µl)	1 µl
OPHN1_rev („reverse“-Primer, 10 pmol/µl)	1 µl
Phusion® DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl
cDNA aus murinen Thrombozyten (35 ng/µl)	1,7 µl

**Tabelle 10-4: PCR-Programm für die Amplifizierung der OPHN1-Nukleotidsequenz ausgehend von komplementärer DNA.**

Initiale Denaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	15 s
Hybridisierung	68,4 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 min 30 s
Finale Elongation	72 °C	7 min

35 Zyklen

### Basenaustausch durch ortsspezifische Mutagenese

Zur Deletion der Tyrosinphosphorylierungsstellen (Tyrosin 370 und 480) von OPHN1 wurde eine ortsspezifische Mutagenese mittels PCR-Reaktion durchgeführt.

**Tabelle 10-5: PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese zur Deletion der Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1.**

ddH <sub>2</sub> O	41 µl
10× Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs, je 10 mM	1 µl
„forward“-Primer, 10 pmol/µl	1 µl
„reverse“-Primer, 10 pmol/µl	1 µl
PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U/µl)	1 µl
OPHN1-Plasmid (~30 ng/µl)	1,7 µl

**Tabelle 10-6: PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese zur Deletion der Tyrosinphosphorylierungsstellen von OPHN1.**

Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	30 s
Hybridisierung	55 °C	1 min
Elongation	68 °C	8 min
16 Zyklen		

## 10.6. DNA-Sequenzen

### OPHN1 in pcDNA3.1:

Die Ligation der OPHN1-DNA-Sequenz (grau hinterlegt) in den pcDNA3.1-Vektor erfolgte nach einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI*.

```
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGC
TTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTT
AGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA
CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACT
GCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCC
AGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTGCTATTACCATTGGTATGCGGTTTTGGCAGTACAT
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCCACCAAAATCAA
CGGGACTTTCCAAAATGTCTGTAACAACCTCCGCCCATTTAGCGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGCTGGGAGGTTATATAAGCAGAGCTC
TCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTGGCTAGCGTTTTAACTT
AAGCTTACCATGGGGCATCCCCGCTGGAGTTACGCGACTGCTACCTCGACAGCCCCGATTTCCGCCAGAGGCTCAAGTATTATGAAGAGG
AGCTGGAGAGGACCAATAAATTCATCAAAGACGTGATCAAAGACGGCAGCGCGCTTATCAGCGCTATGAGAAATTAATCTCTGCGGTTCA
GAAATTTTCTCAGACACTCCAGTCATTTCAATTTGATTTTCAATTGGAGACACGCTGACCGATGATGAGATTAATATAGCGGAATCATCAAG
GAATTTGCTGAATTGCTCAATGAAGTAGAAAATGAAAGGATGATGATGGTACAAAATGCTAGTACTGCTGATCAAACCCCTGGAAACTT
TTCCGAAGGAACAAATAGGTTTTACAAAAGGAAAGGAAAGAAATTTGAAAAGGATGGTGGAGAGTTTTACTCGTACTGGACCGCCACTT
ACATCTGTCATCCAAAAGAAAGAATCTCAGCTACTAGAGGCAGACCTCCAAGTGGATAAGGAAAGGCACAATTTCTTTGAATCATCTCTT
GACTATGTTTATCAAATTCAGGAAGTCCAGGAGTCAAAGAAGTTCAATATTGTGGAGCCGGTCTTGGCCTTCCTTCATAGCTCTTCATTT
CTAACAGCTTACTGTGGAGCTCACACAGGATTTCTGCCATACAAACAACAGCTGCAGCTCAGCTTACAGAATACAAGAAATCATTTCTC
CAGTACCCGGGAGGAGATGGAAGAACTTAAGAAAAGGATGAAAGAAGCCCTCAGACATGCAAACCTCCAGGACAGCCAACCATTGAAGGC
TATCTCTACACACAGGAGAAATGGGCCCTGGGGATATCCTGGGCGAAATACTATTGTCCGTATGAGAAAGAGACCAGGATGCTCACAATGA
TACCAATGGAACAGAAGCCAGGTGCTAAGCAGGGACCGTGGACTTAACTTTGAAGTACTGCGTGAGAAGGAAGACAGAGTCAATTGACAA
GAGATTCGTGTTTTGATATAGAACTAATGAAAGACCTGGAACCATCACTCTGCAGGCGCCTCCGAAGCCAATAGAAGGCTATGGATGGAA
GCCATGGATGGCAAAGAACCCTATCTACCACACTCCTATAACAAAACAGGAAGAAATGGAGCTGAATGAAGTGGGGTTCAAATTTGTAGGA
AGTGCATCAATTTTATTGAGACCAAGGGATCAAGACAGAAGGGGTGTACCACCGTGGCAGCAACATCCAGTTTCCAGGCTGCTCTA
TGCCTTTTTGATCCAAAATGTCCAGGGATGTTGATTTCCATAACAGTACTGGGACATTAAGACAATCACAAGCTCTTTAAATCTTAC
CTCAGGAATCTCTCAGAACCCTGTCATGACTTATAAGCTCCATAAAGAACTCGTCTCTGCTGCCAAATCTGACAACCTGGATTACCGTCTGG
GGGTATTCACTCCCTAGTATATAAGCTACCAGAAAAGAACCGGGAGATGCTGGAACCTTCTAATCAAACACTTGGTAAATGTGTGTGAGCA
CAGCAAAGAGAATCTTATGACACCTTCCAATATGGGGGTGATCTTTGGGCCACCTGATGAGAGCTCAAGAGGACACTGTGGCTGCTATG
ATGAACATCAAATCCAGAACATTGTGGTAGAAATCCTGATTGAACACTTTGGCAAGATTTATTTAGGTCCACCGAAGATAGCCAAGTAC
CTCCAGTGCCTCCACCTCGAGTGACAGCAAGAAGACACAACCAATCACAATCTCAAAGCGCTTGTGAGAGAAAAGACTGTGTTCTATAC
TTCTTCCCTGGATGAAAATAAAGATGAAAGTACCATCAAACCTCCTAATGGTACAATCACTAGCAACCTGGATCCCCCAAGCTACTGCAG
CACCTCAAACCACCCATGCAAAAAGTGGGGAAACTGACCTGGAAGAAAGTCCCAAGCAGACCTGTTTTCTGACTGTCAATCGGAGCCCT
GCCTAGAGACGGATGTGGGAGGTTGTTATTTAGGTTGACAGGATGGAGGACCAAGGCTACTCCAAAGGCTTCCAATGGACCTGTTCCAGG
CTCTGGACACACAAAGACCTCCTCTTCCATATAAGGAGACCAGCTCCCAGGCCAATGGCTCACCACAAGGAAGGCGATACTGACGGTTTT
AGCAAAGTCCGGCCCCAGGAGAAAAGCAACAATCATCCGTCCCGGTGAGGCCCCAGACCTCCTTGCCGGTCCATCACTCCACAAA
AGCCAGAGCCAAAGCCAGAAACAGGGTCTGGCAATGCAGACGAAATCCCATCATCCGTGGTGGCATCTAGGACCAGATTTCTTGAACAGC
TTCCCGAAAACCTGAAGTTCTCAAGGAAAACCTCCTGGAGATGAGAGTTGATCTAGAGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACT
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCTCTGTTGTTTGCCTCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTTAAT
AAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA
AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGG
CCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCC
CTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTT
ACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGTGTTACGTAAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG
GAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCTTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGATTT
```

TGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGT  
GGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCC  
CAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC GCCCCTAACTCCGCCATCCCCGCCCTAACTCCGCC  
CAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG  
TAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGA  
AAAAGCCTGAACTACCCGCGACGTCTGTGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGA  
AGAACTCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCTCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTAT  
GTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAAGTCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC  
GCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTCTGCAGCCGGTCCGGAGGCCATGGATGCGATCGC  
TGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTATATGCGCG  
ATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTT  
GGGCCGAGGACTGCCCCAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGT  
CATTGACTGGAGCGAGGGATGTTCCGGGATTCCCAATACGAGGTGCCTAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAG  
CAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCT  
ATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTGCATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTGCATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCG  
GCGTACACAAAATCGCCCGAGAAGCGCGGCCGTGAGCCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACCCCCAGCACT  
CGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTTTCGATTCACCCGCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGG  
ACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGTGAGTTCCTCGCCACCCCAACTTGTTTATTCAGCTTATAATGGTTACAA  
ATAAAGCAATAGCATCACAAAATTTACAAAATAAGCATTTTTTTCACTGCATTTAGTTGTGGTTTGTCCAAAACCTCATCAATGTATCTTAT  
CATGTCTGTATACCGTTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAAATC  
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC  
CGCTTTCAGTCGCGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCC  
GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGCGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAG  
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTGTCTGGCGTTTTTCCA  
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT  
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTTCCAGCCGA  
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT  
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCG  
CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGCAA  
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGT  
TAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCTG  
ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCT  
CCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATT  
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCAA  
CGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTT  
ACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCA  
TGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCAATCTG  
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATC  
ATTGAAAAAGCTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGAT  
CTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA  
ATGTTGAATACTCATACTCTCTTTTTTCAATATATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATT  
TAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

**OPHN1 in ptdTomato-N1:**

Die Ligation der OPHN1-DNA-Sequenz (grau hinterlegt) in den ptdTomato-N1-Vektor erfolgte nach einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI*.

```
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCCCT
GGGTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAAT
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA
ATGGCCCCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG
GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGA
GTTTGTTTTGGCACC
AAAAACAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG
CAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTACCATGGGGCATCCCCCGCTGGAGT
TCAGCGACTGCTACCTCGACAGCCCCGATTTCCGCCAGAGGCTCAAGTATTATGAAGAGGAGCTGGAGAGGACCAATAAATTCATCAAAGA
CGTGATCAAAGACGGCAGCGCGCTTATCAGCGCTATGAGAAATTAATCTCTCTGCGGTTTCAGAAATTTCTCAGACTCCAGTCATTTCAA
TTTGATTTTCATTGGAGACAGCTGACCGATGATGAGATTAATATAGCGGAATCATTCAAGGAATTTGCTGAATTGCTCAATGAAGTAGAAA
ATGAAAGGATGATGATGGTACAAAATGCTAGTACTTGTGATCAAACCCCTGGAACTTTTCGGAAAGGACAAAATAGGTTTTACAAAAGGA
AAGGAAGAAGAAATTTGAAAAGGATGGTGAAGGTTTTACTCGTACTGGACCGCCACTTACATCTGTCTCCAAAAGAAAGAAATCTCAG
CTACTAGAGGCAGACCTCCAAGTGATAAGGAAAGGCACAATTTCTTGAATCATCTCTGACTATGTTTTATCAAATTCAGGAAGTCCAGG
AGTCAAAGAAGTTCAATATGTGGAGCCGGTCTTGGCCTTCTTTCATAGCTCTTCAATTTCTAACAGCTTGACTGTGGAGCTCACACAGGA
TTTCTCTGCCATACAAAACAGCTGCAGCTCAGCTTACAGAATACAAGAAATCATTTCTCCAGTACCCGGGAGGAGATGGAAGAACTTAAG
AAAAGGATGAAAGAAGCCCTCAGACATGCAAACCTCCAGGACAGCCAACCATTGAAGGCTATCTCTACACACAGGAGAAATGGGCCCTGG
GGATATCTGGGCGAAATACTATGTGCGTATGAGAAAGAGACCAGGATGCTCACAATGATACCAATGGAACAGAGCCAGGTGCTAAGCA
GGGACCGGTGGACTTAACTTTGAAGTACTGCGTGAAGGAAGACAGAGTCAATTGACAAGAGATTCTGTTTTGATATAGAAACTAATGAA
AGACCTGGAACCATCACTCTGCAGGCGCCTTCCGAAGCCAATAGAAGGCTATGGATGGAAGCCATGGATGGCAAAGAACCTATCTACCACA
CTCTATAACAAAACAGGAAGAAATGGAGCTGAATGAAGTGGGGTTCAAATTTGTTAGGAAGTGCATCAATTTTATTGAGACCAAGGGAT
CAAGACAGAAGGGCTGTACCAGCAGCGTGGCAGCAACATCCAGGTTTCAAGGCTGCTCTATGCCTTTTTTGATCCAAAATGTCAGGGGAT
GTTGATTTCCATAACAGTACTGGGACATTAAGACAATCACAAGCTCTTTAAAATCTACCTCAGGAATCTCTCAGAACCTGTCTGACTT
ATAAGCTCCATAAAGAAGCTGCTCTGCTGCCAAATCTGACAACCTGGATTACCGTCTGGGGGCTATTCACTCCCTAGTATATAAGCTACC
AGAAAAGAACCAGGAGATGCTGGAACCTTAATCAAACACTTGGTAAATGTGTGTGAGCACAGCAAAGAGAATCTTATGACACCTTCCAAAT
ATGGGGGTGATCTTTGGGCCACCTGATGAGAGCTCAAGAGGACTGTGGCTGCTATGATGAACATCAAATTCAGAACATTGTGGTAG
AAATCCTGATTGAACACTTTGGCAAGATTTATTTAGGTCCACCCGAAGATAGCCAAGTACCTCCAGTGCCTCCACCTCGAGTGACAGCAAG
AAGACACAAACCAATCACAATCTCAAAGCGCTTGTGAGAGAAAAGACTGTGTTCTATACTTCTTCCCTGGATGAAAATAAAGATGAAAGT
CACCATCAAACCTCAATGGTACAATCACTAGCAACCTGGATCCCCCAAGCTACTGCAGCACCTCAAACCACCCATGCAAAAAGTGGGG
AAACTGACCTGGAAGAAAGTCCCAAGCAGACCTGTTTTCTGACTGTCAATCGGAGCCCTGCCCTAGAGACGGATGTGGGGAGGTTGTTATT
TAGGTTGCAGGATGGAGGGACCAAGGCTACTCCAAAGGCTTCCAATGGACTGTTCAGGCTCTGGACACAAAAGACCTCCTCTTTCCAT
ATAAGGAGACCAGCTCCAGGCCAATGGCTCACCACAAGGAAGGCGATACTGACGGTTTCAGCAAAGTCCGGCCCCAGGAGAAAAGCAAA
CAATCATCCGTCCCGGTGAGGCCCCAGACCTCCTTCCCGTCCATCACTCCACAAAAGCCAGAGCCAAAGCCAGAAAACAGGGTCTGG
CAATGCAGACGAAATCCCATCATCCGTGGTGGCATCTAGGACCAGATTCTTTGAAACAGCTTCCCGGAAAACCTGGAAGTTCTCAAGGAAAA
CTTCTGGAGATGAGAGTTGAGGCCACAGGTTTGAAGGACTTGGCCTTGGGGACCCTTTTTTGGATGGGAAAGGGTCTACTTCAAACCC
TTGTGAGCGAATTCGAGTGCAGGTTACCGCGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAAGGCGGAGGATCATCAAAGAG
TTATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCA
CCCAGACCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCTGTCCCCCAAGTTCATGTACGGCTCCAAGGC
GTACGTGAAGCACCAGCCGACATCCCGATTACAAGAAGTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGTGAACTTCGAGGAC
GGCGGTCTGGTACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAGCTGATCTACAAGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCGG
ACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCTCCACCGAGCGCTGTACCCCGGACGGCGTGTGAAGGGCAGATCCA
CCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAACCTGCCCGCTAC
TACTACGTGGACACCAAGCTGGACATCACTCCCAACAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACC
TGTTCTGGGGCATGGCACCGGCAGCACCGGCAGCGGACGCTCCGGCACCGCTCCTCCGAGGACAACAACATGGCCGTCAAAAGAGTT
CATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCC
AGACCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCTGTCCCCCAAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTA
```

CGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGC  
GGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAGCTGTACTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCGGACG  
GCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCCTCCACCAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCA  
GGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGCTACTAC  
TACGTGGACACCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTAACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACCTGTT  
CCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTT  
AAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC  
AAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT  
AAGCGTAAATTTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCG  
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGA  
CTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGC  
CGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTACGCGGAAAGCCGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGA  
AAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA  
GGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG  
AGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTAGTTAGG  
GTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGC  
TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTC  
CGCCAGTTCGCCCATTTCTCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCA  
GAAGTAGTGAGGAGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGA  
TGATTGCACGCAGGTTCTCGGCGCTTGGGTGGAGAGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCC  
GTGTTCCGGCTGTACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGC  
GGTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGA  
AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTT  
GATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATG  
ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCGCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTAC  
CCATGGCGATGCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTATCATGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGC  
TATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCG  
CTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGACTCTGGGGTTGAAATGACCGACCAAGCGACG  
CCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCACCCGCCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCCGGCTGGATGA  
TCCTCCAGCGGGGATCTCATGTGGAGTCTTCGCCCCACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAAC  
CCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGCACGGTGTGGGTGCTTTGTTTCATAAACCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCAC  
TCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCC  
CAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTA  
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCC  
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGTGCTTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTG  
TTTTTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTA  
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAATCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC  
GATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC  
CCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGCGA  
CAGGTATCCGGTAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGGAGGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGG  
TTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTGTGACGGGGGGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTTTAC  
GGTCTCGGCTTTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT