

**Westfälische Wilhelms-Universität Münster**

**Biochemie**

**Untersuchungen zum Einfluss von Proteinen und Peptiden  
auf die Aktivierung von  
Thrombozyten und Monozyten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im  
Fachbereich Chemie und Pharmazie der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
MARTIN BRODDE  
aus Telgte

Münster 2004

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. F. Spener
Zweite Gutachterin:	Prof. Dr. B. Kehrel
Tag der mündlichen Prüfung:	3., 8., 14.06.2004
Tag der Promotion:	14.06.2004

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Thrombozyten.....	3
2.2 Thrombozytenadhäsion.....	6
2.3 Thrombozytenaggregation.....	7
2.4 Thrombozytensekretion.....	8
2.5 Prokoagulanter Zustand.....	8
2.6 Gerinnelse retraktion.....	10
2.7 Fibrinolyse.....	11
2.8 Gegenregulation der Aktivierung.....	12
2.9 Interaktion mit anderen Blutzellen.....	12
2.10 Monozyten und ihre Rolle bei der Entzündung.....	13
2.11 Heparin.....	14
2.12 Thrombospondin-1.....	16
2.13 Glykoproteinspaltung.....	18
2.14 Zielsetzung der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Geräte.....	22
3.2 Chemikalien.....	23
3.3 Antikörper.....	23
3.4 Präparation der Thrombozyten, Monozyten und des Plasmas.....	25
3.4.1 Isolierung der Thrombozyten aus Plättchenreichem Plasma (PRP).....	25
3.4.2 Isolierung der Thrombozyten durch Waschen.....	25
3.4.3 Isolierung der Thrombozyten durch Gelfiltration.....	26
3.4.4 Isolierung der Monozyten.....	27
3.4.5 Zellzählung.....	28
3.5 Thrombozytenaggregation.....	28
3.6 Durchflusszytometrie.....	29
3.6.1 Probenvorbereitung für die Untersuchung der Zellen.....	32
3.6.2 Zellaktivierung.....	32
3.6.2.1 Thrombin.....	33
3.6.2.2 Kollagen.....	33

3.6.2.3	ADP.....	34
3.6.2.4	C-terminales TSP-1-Peptid RFYVVMWK.....	34
3.6.2.5	Plättchenaktivierung durch Matrixmetalloproteinasen.....	34
3.6.2.6	TRAP.....	35
3.6.2.7	Plättchenaktivierung durch Heparin .....	35
3.6.2.8	Ristocetin.....	35
3.6.3	Nachweis der Plättchenaktivierung.....	36
3.6.3.1	Bindung des Fibrinogens.....	36
3.6.3.2	Bindung des von Willebrand Faktors (vWF).....	37
3.6.3.3	Expression von Membranproteinen der Granula als Marker für die Sekretion.....	38
3.6.3.3.1	$\alpha$ -Granula-Sekretion, CD62P-Expression.....	38
3.6.3.3.2	Sekretion der elektronendichten Granula, CD63- Expression.....	38
3.6.3.4	Expression des CD40 Ligand.....	38
3.6.3.5	Rückbindung des aus den Granula freigesetzten Proteins Thrombospondin-1.....	39
3.6.3.5.1	Bindung von extern zugesetztem TSP-1.....	39
3.6.3.5.2	Quantitative Bestimmung des Plättchen- oberflächen-gebundenen TSP-1.....	39
3.6.3.6	Prokoagulanter Zustand.....	39
3.6.3.6.1	Messung von Annexin V .....	40
3.6.3.6.2	Messung des Faktors Va .....	40
3.6.3.6.3	Messung des Faktors Xa.....	41
3.6.3.7	Phosphorylierung von VASP.....	41
3.6.3.8	Messung von Thrombozytenmikropartikeln.....	41
3.6.3.9	Spaltung von GPIIb $\alpha$ infolge der Plättchenaktivierung.....	42
3.6.3.10	Spaltung von GPV infolge der Plättchenaktivierung.....	42
3.6.3.11	Assoziatbildung der Thrombozyten mit Monozyten.....	42
3.6.4	Nachweis der Monozytenaktivierung.....	43
3.6.4.1	Bindung des Fibrinogens.....	43
3.6.4.2	Bindung des TSP-1.....	43
3.6.4.3	Tissue Faktor Expression.....	43
3.6.4.4	Bindung des Faktors VIIa.....	43

3.6.4.5	Detektion der gebildeten Monozytenmikropartikel.....	44
3.7	Elektrophorese.....	44
3.7.1	Durchführung der Elektrophorese.....	44
3.7.2	Silberfärbung der Proteine.....	46
3.7.3	Das Western-Blot Verfahren.....	47
3.7.3.1	Proteinanfärbung über alkalische Phosphatase-Konjugate nach dem Blotting-Verfahren.....	48
3.8	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	50
3.9	Proteinreinigungsverfahren.....	51
3.9.1	Aufreinigung des humanem TSP-1.....	51
3.9.2	Reinigung von humanem GPV und humanem GPIb $\alpha$ .....	53
3.10	ELISA-Verfahren.....	54
3.11	Statistische Absicherung der experimentellen Daten.....	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Einfluss des Thrombospondin-1 auf die Aktivierung von Blutplättchen durch Heparin.....	57
4.1.1	Aufreinigung von humanem Thrombospondin-1.....	57
4.1.2	Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Heparin induzierte Plättchenaggregation.....	59
4.1.3	Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten.....	62
4.1.4	Ist die Heparin-Bindungsdomäne des Thrombospondin-1 für die Wirkung von TSP-1 auf die Heparin induzierte Aggregation verantwortlich? .....	62
4.1.5	Kann die durch Zugabe von Thrombospondin-1 plus Heparin induzierte Plättchenaggregation inhibiert werden?.....	63
4.1.5.1	Einfluss von Vitronectin.....	63
4.1.6	Beeinflusst Vitronectin die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen?.....	66
4.1.7	Bedeutung des Fc-Rezeptors für die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Plättchenaktivierung.....	66
4.1.8	Wird die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen durch den Heparin-bindenden Rezeptor GPIb vermittelt? .....	67

4.1.9	Wird die Plättchenaggregation, die durch Zugabe von Thrombospondin-1 plus Heparin ausgelöst wird, durch den TSP-1 Rezeptor CD36 vermittelt? .....	70
4.1.10	Wird die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen durch CD36 vermittelt?.....	71
4.1.11	Kann die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung durch Inhibierung von Signaltransduktionswegen gehemmt werden?.	72
4.2	Wirkung des Thrombospondin-1 Peptids RFYVVMWK auf Zellen.....	74
4.2.1	Einfluss von RFYVVMWK auf die Plättchenaktivierung.....	74
4.2.1.1	Bindung des Fibrinogen.....	74
4.2.1.2	Granula-Sekretion.....	75
4.2.1.3	Bindung des TSP-1 an die Plättchenoberfläche.....	77
4.2.1.4	CD40 Ligand Expression der Thrombozyten.....	77
4.2.1.5	Ausbildung des prokoagulanten Zustands.....	78
4.2.1.6	VASP Phosphorylierung.....	80
4.2.2	Monozyten-Thrombozyten Assoziatbildung.....	81
4.2.3	Einfluss von RFYVVMWK auf Monozyten.....	82
4.2.3.1	Bindung des Fibrinogens an Monozyten.....	82
4.2.3.2	Bindung des Thrombospondin-1.....	83
4.2.3.3	Expression des Tissue Faktors und Bindung des Faktor VIIa	84
4.2.3.4	Mikropartikelformation.....	85
4.2.3.5	Untersuchung des Zellaktivierungs-Mechanismus.....	86
4.2.3.5.1	Einfluss von RGDS.....	86
4.2.3.5.2	Zellaktivierung durch RFYVVMWK über CD36?	87
4.2.4	Welche Thrombozytenproteine binden an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK? .....	90
4.3	Untersuchungen zur Spaltung des Glykoprotein V.....	93
4.3.1	Aufreinigung von humanem GPV <sub>fl</sub> und Glykocalicin.....	93
4.3.2	GPV-Spaltung: durchflusszytometrische Messung der Bindung GPV-spezifischer Antikörper.....	96
4.3.3	Untersuchung der entstehenden GPV-Fragmente.....	97
4.3.4	In welcher zeitlichen Reihenfolge erfolgt die Abspaltung der GPV-Fragmente, die durch Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin und/oder Kollagen induziert wird?.....	98

4.3.5	Gibt es eine zeitliche Reihenfolge, in welcher die Fragmente gespalten werden?.....	100
4.3.6	Wird die Spaltung des GPV bei jeder Plättchenaktivierung beobachtet? .....	102
4.3.7	Inhibierung der GPV-Spaltung durch unterschiedliche Aktivierungs-Antagonisten.....	104
4.3.7.1	Aktivierung der Adenylat Cyclase.....	104
4.3.7.2	Inhibierung des Thromboxanwegs.....	107
4.3.7.3	Inhibierung des ADP-Wegs.....	108
4.3.8	Zusammenhang zwischen dem Glykoproteinkomplex Ib/V/IX und zytosolischem Calmodulin? .....	109
4.3.9	Welche Protease spaltet das Glykoprotein V transmembrannah?.....	111
4.3.9.1	Calpain? .....	111
4.3.9.2	Matrixmetalloproteinasen? .....	112
4.3.10	Biologische Rolle des Glykoprotein V und seiner Fragmente.....	115
4.3.10.1	Einfluss auf die Plättchenaktivierung.....	116
4.3.10.2	Einfluss auf die von Willebrand Faktor Bindung.....	119
5	Diskussion.....	120
5.1	Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Aktivierung von Blutplättchen durch Heparin.....	120
5.2	Wirkung des Thrombospondin-1 Peptids RFYVVMWK auf Zellen.....	130
5.2.1	Einfluss des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Thrombozyten.....	130
5.2.2	Einfluss des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Monozyten.....	133
5.3	Untersuchungen zur Spaltung des Glykoprotein V.....	137
6	Ausblick.....	146
7	Abkürzungsverzeichnis.....	148
8	Literaturverzeichnis.....	151

## 1. Zusammenfassung

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung, sind aber auch an Entzündungsreaktionen maßgeblich beteiligt. Während in den vergangenen Jahren das wissenschaftliche Hauptinteresse bei den Mechanismen lag, welche die Hämostase und Entzündungsreaktionen initiieren, sollte in dieser Arbeit das Augenmerk auf Prozesse gerichtet werden, die in der Spätphase der Thrombozytenaktivierung stattfinden. In dieser Phase wird Thrombospondin-1 (TSP-1) aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzt und das Membranglykoprotein V (GPV) proteolytisch extrazellulär gespalten.

Ziel dieser Arbeit war es, physiologische und pathophysiologische Funktionen des freigesetzten TSP-1 aufzudecken, näher zu charakterisieren und den Spaltungsvorgang des GPV zu untersuchen.

Heparin ist bis heute das Standardantikoagulant für Patienten mit einer Thromboseneigung. Es konnte gezeigt werden, dass TSP-1 die klinisch gefürchtete Aktivierung von Thrombozyten durch Heparin deutlich verstärkt. Fehlt dem TSP-1 die Heparinbindende Domäne, so dass beide Proteine nicht aneinander binden können, tritt dieser Effekt nicht auf, wie ich mit rekombinantem TSP-1 zeigen konnte.

Die Aktivierung der Plättchen durch den Komplex aus Heparin und TSP-1 verläuft nicht, wie bei Plättchenfaktor 4-Immunglobulin G-Heparinkomplexen beschrieben, über den Fc-Rezeptor. Das Heparin und TSP-1 bindende Glykoprotein Ib ist nicht an der Aktivierung der Plättchen durch den Heparin-TSP-1 Komplex beteiligt. Vermutlich vermittelt der Thrombospondinrezeptor CD36 den oben beschriebenen Aktivierungsweg, denn dieser ließ sich mit zwei monoklonalen Antikörpern, welche die Bindung von TSP-1 an CD36 inhibieren, vollständig blockieren. Die TSP-1-Heparinkomplex induzierte Plättchenaktivierung wird über die PI-3 Kinase vermittelt und war durch Adenylat Cyclase Reaktion inhibierbar.

Zusätzlich konnte im TSP-1 Molekül eine Peptidsequenz – RFYVVMWK – identifiziert werden, die sowohl die Thrombozyten, als auch die Monozyten aktiviert.

Wurden Thrombozyten mit diesem Peptid inkubiert, so sezernierten sie die Inhaltsstoffe ihrer Granula, exprimierten die Entzündungsmediatoren P-Selektin und CD40 Ligand, aggregierten und wurden prokoagulant.

Auch mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK behandelte Monozyten wurden so stark aktiviert, dass sie prokoagulatorisch und proinflammatorisch verändert wurden. Sie banden Fibrinogen und exprimierten Gewebsthromboplastin (Tissue Faktor).



Die durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte Plättchenaktivierung wird nicht durch die Thrombospondinrezeptoren CD47, CD36 oder  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin ausgelöst.

Eine Plättchenaktivierung durch das TSP-1-Peptid RFYVVMWK führt zu einer Spaltung des Membranglykoprotein V der Thrombozyten. Diese kann auch durch Thrombin gespalten werden, aber die abgespaltenen Fragmente sind unterschiedlich lang.

Aktivierung mit anderen, nicht proteolytisch wirkenden Plättchenagonisten ergab, dass die GPV Spaltung vermutlich ein allgemeiner Vorgang der Plättchenaktivierung ist.

Untersuchung der Spaltreihenfolge ergab, dass erst transmembrannah GPV<sub>s</sub> abgespalten wird und dieses Fragment dann anschließend durch Thrombin weiter fragmentiert wird.

Desweiteren konnte gefunden werden, dass die Aktivierung der Adenylat Cyclase teilweise zu einer Inhibierung der Spaltung führte, Hemmung des ADP- oder des Thromboxanwegs bei starker Plättchenaktivierung jedoch keinen Einfluss auf die Spaltung hatte.

Antagonisierung von Calmodulin löste eine GPV Spaltung aus. Vermutlich wird entweder durch die Spaltung die Bindung von Calmodulin an GPV reguliert oder Calmodulin wirkt sogar der GPV Spaltung entgegen.

Zusätzlich wurde gefunden, dass nicht Calpain die Protease ist, die GPV transmembrannah spaltet, sondern eine Matrixmetalloproteinase, vermutlich eine Gelatinase.

Die in dieser Arbeit gefundenen Aspekte zur Hämostase und Entzündungsreaktion liefern Anhaltspunkte für neue Strategien zur Bekämpfung von Thrombosen und überschießenden Entzündungsreaktionen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Thrombozyten

Die kleinsten zellulären Elemente des Blutes sind die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt. Sie spielen sowohl eine zentrale Rolle bei der Thrombusbildung, Thrombolyse, als auch eine wichtige Rolle in der Atherogenese und der Progression atherosklerotischer Läsionen. Gebildet werden diese Zellen aus den Megakaryozyten, am Ende ihrer Lebenszeit werden sie in Leber, Lunge oder Milz vom retikuloendothelialen System abgebaut (Akkerman et al. 1987). Ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert und steht im ununterbrochenen Austausch mit dem zirkulierenden Anteil. Die normale Plättchenzahl liegt zwischen  $150-350 \times 10^9 \cdot l^{-1}$ , und die Lebensdauer der Plättchen beträgt annähernd 8-10 Tage.

Ruhende, unstimulierte Plättchen haben mit einem Durchmesser von 1-3  $\mu m$  eine diskoide Form (Abb. 2.1) und ein durchschnittliches Volumen von 5-6 fl. Das mittlere Plättchenvolumen liegt bei 8  $\mu m^3$ .



Abb.2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von ruhenden, unstimulierten Thrombozyten (nach: <http://platelet page>).

Im Gegensatz zu Leukozyten und anderen eukaryonten Zellen, weisen Blutplättchen keinen Zellkern auf und sind dadurch nicht oder nur sehr eingeschränkt (Rest an mRNA aus Megakaryozyten, Mitochondrien) zur Neusynthese von Proteinen fähig.

Aktivierung von Plättchen ist durch lösliche Agonisten, wie z.B. Thrombin, der wichtigsten Protease in der Hämostase, oder ADP möglich. Aber auch durch immobilisierten von Willebrand Faktor (Savage et al. 1992), immobilisiertes Fibrinogen (Savage et al. 1992) und durch hohen Scherstress (Ruggeri und Ware 1993) kann eine Aktivierung erzielt werden. Diese Aktivierung führt zu einem Formwandel („shape change“), wobei sich Pseudopodien bilden. Diese Pseudopodien stellen Ausstülpungen der Plasmamembran dar (Abb. 2.2).

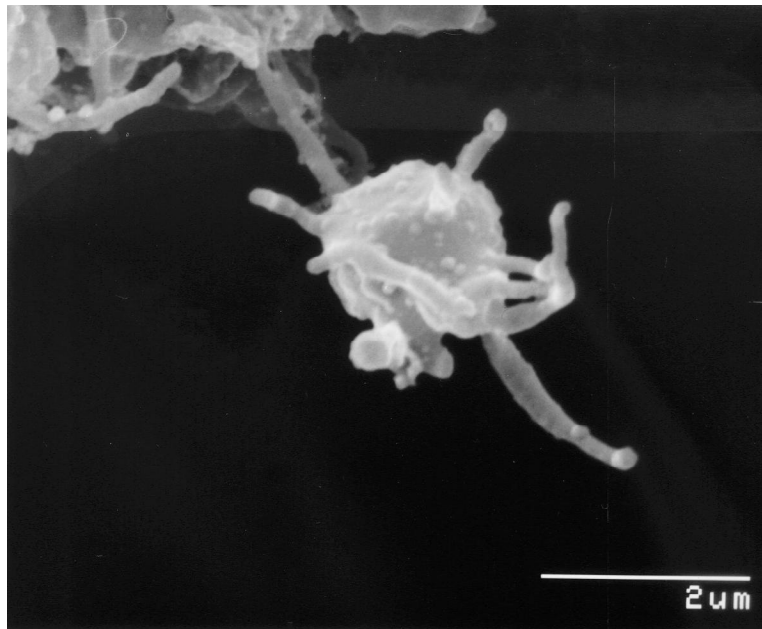


Abb. 2.2: Aktivierter Thrombozyt, EM-Bild (B. Kehrel), zu erkennen sind die Pseudopodien, die wie Arme von dem Thrombozyten abgehen.

Im ruhenden Zustand besitzen Thrombozyten das offene Kanalsystem (OCS), Einstülpungen der Oberflächenmembran in das Plättcheninnere.

Man kann die Struktur der Thrombozyten in vier morphologische Bereiche einteilen:

- a) die periphere Zone,
- b) die strukturelle Zone,
- c) die Zone der Organellen und
- d) die Membransysteme.

a) Die periphere Zone besteht aus der Zytoplasmamembran. Sie ist mit einer Schicht belegt, die aus verschiedenen Glykoproteinen (GP), Proteinen und Mukopolysacchariden aufgebaut ist (Glykokalyx). Die Membran selber ist aus einer Phospholipiddoppelschicht aufgebaut, in welcher die Membranproteine verankert sind. Werden Thrombozyten aktiviert, ändert sich die Zusammensetzung dieser Doppelschicht, Faktoren der Signalübertragung („second messenger“) werden neben Arachidonsäure freigesetzt, Rezeptoren werden aktiviert und gespeicherte Adhäsionsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, von Willebrand Faktor) gelangen an die Oberfläche.

b) In der strukturellen Zone befinden sich Mikrotubuli, die unter der Membran liegen. Das Zytoskelett besteht aus Aktin, Aktin-Bindungsproteinen und Myosin (Fox et al. 1988). Im Falle der Aktivierung bilden sich Aktin-Filamente.

c) In der Zone der Organellen befinden sich Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei unterschiedliche Formen von Speichergranula, die  $\alpha$ -Granula, die elektronendichte Granula („dense bodies“) und die Lysosomen. Sie sind Speicherorte für Proteine, die für die Plättchenfunktionen essentiell sind.

Die  $\alpha$ -Granula enthalten Adhäsionsproteine, wie z.B. Thrombospondin-1, Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor, Enzyme (Antitrypsin, Antiplasmin), Zytokine/Chemokine (RANTES), Membranproteine (CD40 Ligand), Koagulationsfaktoren (Faktor V, Faktor XIII, Plasminogen) und Wachstumsfaktoren (PDGF und TGF $\beta$ ). In den elektronendichten Granula sind niedermolekulare Verbindungen enthalten. Zu ihnen gehören ATP, ADP, Serotonin, Phosphat und  $\text{Ca}^{2+}$ . In den Lysosomen sind hydrolytische Enzyme enthalten, wie z.B. Galactosidase, Elastase und Kollagenase.

d) Das intrazelluläre Membransystem enthält das offene kanalikuläre System („open canalicular system“, OCS), das dichte tubuläre System (DTS) und die Membranen der verschiedenen Granula. Aus Einstülpungen in der Thrombozytenoberfläche, die in das Zellinnere des Thrombozyten reichen, bildet sich das OCS. Das DTS ist ein Abkömmling des endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. In ihm ist die Hauptmenge an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gespeichert, die in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der Aktivierung

eine zentrale Rolle spielen. Erhöht sich die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, bilden sich Pseudopodien aus und der Thrombozyt ändert seine Form.

## 2.2 Thrombozytenadhäsion

Der erste Schritt der primären Hämostase ist die Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand (primäre Adhäsion), danach folgt die Anlagerung der schon aktivierten Thrombozyten an das Subendothel (sekundäre Adhäsion). Dies führt zur Aktivierung der adhärenen Plättchen, gefolgt von Prozessen wie der Ausbreitung, der Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen und der Aggregation.

Wegen der Strömungsbedingungen in den Blutgefäßen und dem dadurch bedingten Scherstress ist zur Adhäsion von Blutplättchen eine schnelle und stabile Kontaktaufnahme zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwand notwendig. Gesteuert wird die Adhäsion durch die Membranglykoproteine der Thrombozyten (Abb. 2.3). Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors mit dem kollagenimmobilisierten von Willebrand Faktor (vWF) und dem Glykoproteinkomplex GPIb/V/IX wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwandläsion hergestellt (Clemetson 1995). Dabei ist die Bindung zwischen dem vWF und dem Glykoproteinkomplex sehr avide und ermöglicht so die Adhäsion unter hohen Scherkräften. Patienten, die Defizienz oder Defekte des vWF haben (von Willebrand Jürgens Syndrom) und Patienten mit GPIb Defekt (Bernard Soulier Syndrom) haben daher eine erhöhte Blutungsneigung.

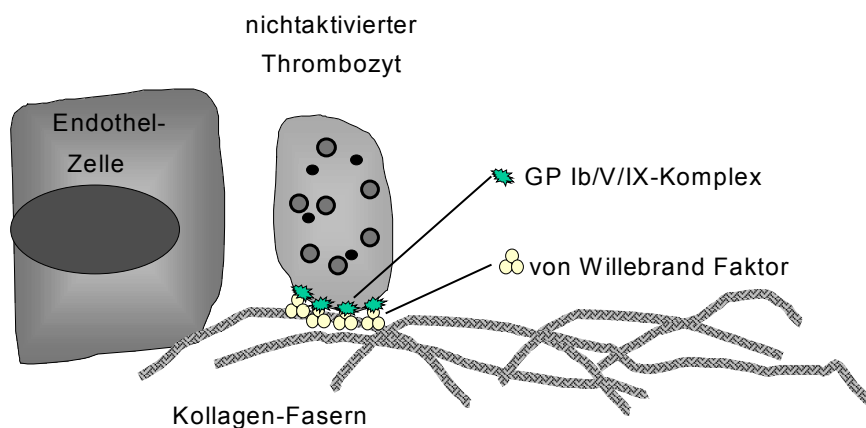


Abb. 2.3: Schematisches Bild der Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel und Anbindung des von Willebrand Faktors über GPIb/V/IX.

Über Kollagenrezeptoren, Fibrinogenrezeptoren, Lamininrezeptoren und Fibronectinrezeptoren erfolgt eine Stabilisierung der Adhäsion. Diese membranständigen Adhäsionsrezeptoren werden der Rezeptorfamilie der Integrine zugeordnet. Die Anbindung des Kollagens an den Kollagenrezeptor führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten und ihrem Formwandel. Bei diesem Wandel verändert sich die diskoide Form in eine kugelige Form mit Pseudopodien, welche die Abdichtung der Läsionen deutlich begünstigt. Das anhaftende Plättchen ist aktiviert und bildet aus verfügbarer Arachidonsäure Thromboxan  $A_2$ . Dieses bindet an seinen Rezeptor, was zu einer weiteren und verstärkten Thrombozytenaktivierung führt. Das Medikament Daltroban hingegen wirkt dem Aktivierungsweg über Thromboxan  $A_2$  entgegen, da es den Thromboxan-Rezeptor blockiert.

Während der Adhäsion werden ebenfalls Granula-Inhaltsstoffe sezerniert. Diese Sekretion führt dazu, dass noch ruhende Plättchen aus der Zirkulation angelockt werden, um mit schon anhaftenden Thrombozyten zu aggregieren (Aggregation). Serotonin und ADP werden freigesetzt. Dabei ist ADP besonders wichtig, da es der bedeutendste Agonist für die Verstärkung der eingeleiteten Plättchenaktivierung ist (Gachet 2001). An schon adhärenente Plättchen binden zirkulierende Plättchen über den Glykoproteinkomplex GPIIb/IIIa, sofern kein Scherstress vorliegt. Unter hohen Scherkräften erfolgt die Anbindung über den vWF, GPIb und GPIIb/IIIa (Clemetson et al. 1995) oder über Thrombospondin-1, GPIb (Jurk et al. 2003).

### **2.3 Thrombozytenaggregation**

Als Aggregation bezeichnet man den Vorgang der Adhäsion zweier Thrombozyten. Die Aneinanderbindung zweier Thrombozyten im lockeren Zustand über Fibrinogenbrücken ist die primäre Aggregation. In diesem Stadium ist der Vorgang der Aggregation noch reversibel. Fängt einer der beiden Thrombozyten an, Inhaltsstoffe aus der Granula freizusetzen, beginnt die sekundäre Aggregation.

Für die Aggregation sind drei Voraussetzungen notwendig: zum einen muss die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Thrombozyten in Kontakt treten, sehr hoch sein. Zum zweiten müssen  $Ca^{2+}$ -Ionen anwesend sein, und drittens müssen vWF oder Fibrinogen, die Brückenbildner zwischen zwei aggregierenden Thrombozyten, anwesend sein. Beim Fehlen

einer dieser Grundlagen kommt es zu keiner Thrombozytenaggregation, wie z.B. bei Patienten mit Afibrinogenämie. Patienten dieser Art leiden an erhöhter Blutungsneigung. Fibrinogen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen liegen sowohl im Blutplasma, als auch in den Granula vor und werden bei der primären Aggregation lokal freigesetzt. Sind die Plättchen dann aktiviert, kommt es im Bereich des GPIIb/IIIa-Komplexes zur Präsentation von Bindungsstellen für Fibrinogen, die ein ruhendes Plättchen nicht besitzt. Nach Aktivierung kommt es daher zu einer Fibrinogenanbindung an den GPIIb/IIIa-Komplex, die auch von der Calcium-Konzentration abhängt (Coller 1990, 1992, 1997; Phillips et al. 1998).

So bindet dann Fibrinogen an die GPIIb/IIIa-Bindungsstellen zweier Thrombozyten, um sie zu verbrücken. Die Fibrinogen Bindung an Thrombozyten kann durch das Peptid RGDS inhibiert werden, da es kompetitiv an den Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa bindet. RGDS ist die Peptidsequenz im Fibrinogenmolekül, die von dem Rezeptor GPIIb/IIIa erkannt wird.

Fehlt Patienten der GPIIb/IIIa-Komplex, so spricht man vom Morbus-Glanzmann-Naegli-Syndrom. Sie haben eine erhöhte Blutungsneigung.

## **2.4 Thrombozytensekretion**

Wie oben erwähnt beginnt der Thrombozyt nach Aktivierung Inhaltsstoffe aus seinen Granula freizusetzen. Diese Freisetzung wird Degranulation oder Sekretion genannt. Die Sekretion läuft ab, indem die Granula durch Verschmelzung mit dem offenen Kanalsystem die Inhaltsstoffe in den Extrazellularraum abgeben und Membranproteine durch Verschmelzung der Granulamembran mit der Plasmamembran direkt auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert werden. Durch die Degranulation wird der Aktivierungsprozess forciert und die sekundäre Phase der Aggregation eingeleitet. Zuerst werden die Inhaltsstoffe der  $\alpha$ -Granula und der elektronendichten Granula, danach der Lysosomen freigesetzt. Abhängig ist diese Reihenfolge von der Calcium-Konzentration.

Die Sekretion findet vor und während der Aggregation statt und führt durch Aktivierung, Rekrutierung von noch zirkulierenden Thrombozyten und durch Förderung der Fibrinbildung zur Konsolidierung der Thromben.

## **2.5 Prokoagulanter Zustand**

Durch die Bildung eines undurchlässigen Thrombozytenaggregates ist die sekundäre Phase der Hämostase charakterisiert. Dabei ist das Aggregat von Fibrinfäden durchdrungen und umgeben. Es kommt zu einer kontrollierten Bildung von Thrombin, so dass weitere

Thrombozyten aktiviert werden, Mikropartikel entstehen und Fibrinfäden hergestellt werden, die den Thrombus stabilisieren (Monroe et al. 2002; Bouchard und Tracy 2001).

Thrombozyten besitzen spezifische Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren, schützen gebundene Faktoren vor Inaktivierung, limitieren die Gerinnung auf den Ort der Verletzung und amplifizieren den initialen Stimulus durch Vervielfältigung der Thrombinbildung. Während der Thrombozytenaktivierung werden negativ geladene Phospholipide, insbesondere Phosphatidylserin, an die Oberfläche der Plättchen gebracht. Sie besitzen eine hohe Bindungsaktivität für die Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Zu diesen zählen die Gerinnungsfaktoren Va, VIIa, IX und Xa.

Der Faktor Xa, der auf Tissue Faktor tragenden Zellen gebildet wurde, wird, wenn er zur Plättchenoberfläche diffundiert, durch den Inhibitor des Gewebefaktor Reaktionsweg (TFPI) inhibiert. Nur der Faktor Xa, der durch den Faktor VIIa/IXa Komplex in Nachbarschaft zum Faktor Va gebildet wird, ist in der Lage, in den Prothrombinasekomplex eingebaut zu werden, in welchem auf der Thrombozytenoberfläche Thrombin in großen Konzentrationen gebildet wird (Scandura und Walsh 1996). Somit bindet also der Ko-Faktor Va an die Phospholipide der Membran von aktivierten Plättchen und bildet zusammen mit Faktor Xa und Prothrombin den Prothrombinasekomplex. Faktor Xa spaltet dann Prothrombin und es entsteht Thrombin (Abb. 2.4). Die aktivierungsabhängige Änderung der Phospholipidzusammensetzung der Plättchenmembran kann mit Annexin V verfolgt werden, welches spezifisch an Aminophospholipide bindet, die bei Aktivierung in das äußere Blatt der Plasmamembran gelangen (Dörmann et al. 1998).

Durch Bildung so genannter Plättchen-Mikropartikel wird die prokoagulatorische Aktivität im Bereich eines Aggregats gesteigert. Sie entstehen, indem aktivierte Thrombozyten kleine Membranvesikel abschnüren, die durch die Fähigkeit Faktor V und VIIa binden zu können, eine hohe prokoagulatorische Aktivität besitzen (Holme et al. 1997; Sims et al. 1989).



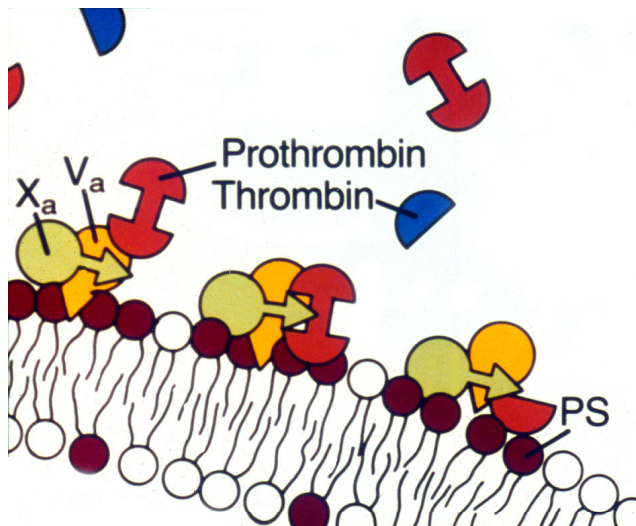


Abb. 2.4: Schematischer Verlauf der Ausbildung des prokoagulanten Zustands (zur Verfügung gestellt von E. M. Bevers). Faktor Va und Faktor Xa lagern sich an Phosphatidylserin (PS) der Plasmamembran und können so das in der Umgebung befindliche Prothrombin binden. Nach der Anbindung des Prothrombins an die Koagulationsfaktoren wird es zu Thrombin gespalten.

Die Thrombozytenmembran besitzt für die Gerinnungsfaktoren Proteinrezeptoren, die die Anbindung der Faktoren regulieren. Die Bildung von Thrombin durch Prothrombin, Faktor Va und Faktor Xa wird von aktivierten Plättchen durch deren Interaktion mit Gerinnungsfaktoren katalysiert. Das entstandene Thrombin spaltet in einem Plättchenaggregat aus Fibrinogen das monomere Fibrin, welches zu Fibrinfäden polymerisiert, und sorgt somit für die Verfestigung des Thrombus.

## 2.6 Gerinnselretraktion

Nachdem Fibrin durch Spaltung des Fibrinogens durch Thrombin gebildet ist, wird die Zusammenziehung des Plättchen-Pfropfens (Gerinnselretraktion) veranlasst. Dabei wird das Gerinnsel (Abb. 2.5) auf 1/10 seines initialen Volumens verringert (Morgenstern et al. 1984).

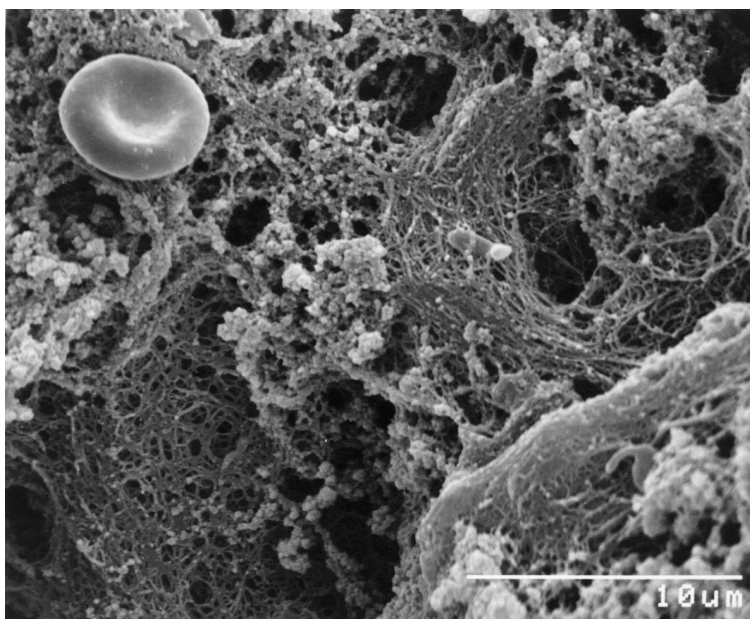


Abb. 2.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gerinnsels (B. Kehrel). Zu erkennen sind neben den aggregierten Thrombozyten auch ein roter Blutkörper und Fibrinfäden.

Die Assoziation der Fibrin(ogen)-Rezeptor-Komplexe an das kontraktile Zytoskelett und die Ausbildung eines zusammengeschnürten Bereichs führen zur Gerinnselretraktion durch die Internalisierung der Fasern (Morgenstern et al. 1990). Das Serum wird dabei aus dem Gerinnsel herausgepresst und somit „ausgeschwitzt“. Der Glykoproteinkomplex GPIIb/IIIa ist dabei das Bindeglied zwischen den kontraktile Mitspielern in den Thrombozyten (Zytoskelett) und den Fibrinfäden während der Retraktion.

## 2.7 Fibrinolyse

Das aus Fibrinogen gebildete Fibrin (Spaltung durch Thrombin) wird durch Plasmin, dem Hauptenzym der Fibrinolyse, in zahlreiche Proteinfragmente und Peptide gespalten. Das gebildete Gerinnsel wird somit lysiert.

Durch den gewebsabhängigen Plasminogen Aktivator (t-PA) oder den Urokinase Plasminogen Aktivator (u-PA) wird das im Plasma vorhandene Plasminogen zu Plasmin gespalten (Booth 1999).

Plasminogen und t-PA binden an das im Thrombus vorhandene Fibrin, reagieren miteinander und beginnen lokal mit der Gerinnsel-Lyse. Plasminogen und u-PA hingegen binden noch in der flüssigen Phase aneinander und bilden Plasmin, was daraufhin zur Thrombusauflösung führen kann. Die Rolle des u-PA in der Hämostase ist allerdings noch weitgehend ungeklärt.

Der im Plasma vorhandene Gegenspieler des Plasmin ist  $\alpha_2$ -Antiplasmin, die Gegenspieler der t-PA und u-PA sind die Plasminogen Aktivator Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) (Abb. 2.6).

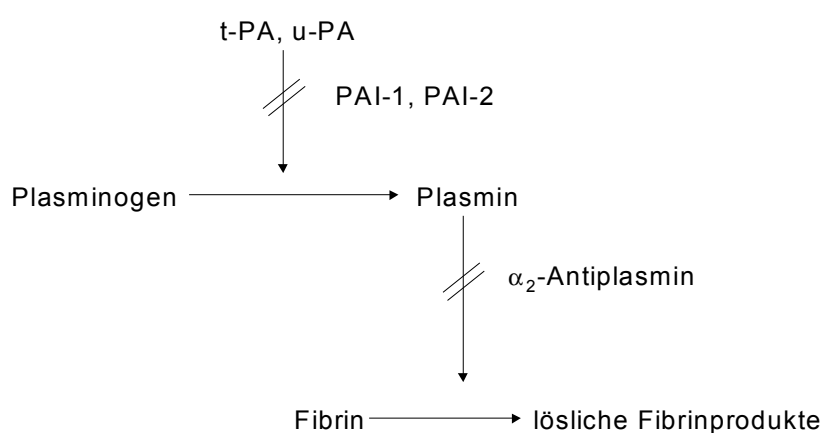


Abb. 2.6: Schema des fibrinolytischen Systems

## 2.8 Gegenregulation der Aktivierung

Verminderung der Thrombozytenaktivierung, der -aggregation und der -sekretion wird durch den Anstieg an cAMP oder cGMP erreicht (Aszodi et al. 1999; Schwarz et al. 2001). Dabei verringert cAMP die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem geschlossenen tubulären System. Sowohl cAMP- als auch cGMP-Anstieg führen zu verstärkter Phosphorylierung von unterschiedlichen Substraten für cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen. Substanzen wie Prostacyclin fördern die Synthese von cAMP durch die Adenylat Cyclase.

Eine weitere Gegenregulation der Plättchenaktivierung ist das Aktivieren des Plättchen/Endothelzell Adhäsionsmoleküls-1 (PECAM-1) auf der Thrombozytenoberfläche. PECAM-1 befindet sich auf der Plättchenoberfläche und trägt ein konserviertes Sequenzmotiv, das ITIM („immunreceptor tyrosine-based inhibitory motif“) genannt wird. Werden Plättchen, z.B. durch Kollagen, aktiviert, kommt es zu einer Quervernetzung der PECAM-1 Moleküle. Diese Vernetzung führt zu einer Phosphorylierung der ITIM-Sequenzen. Die Zunahme phosphorylierter ITIM-Motive, die antagonistisch wirken, resultiert in einer Hemmung der Plättchenaggregation und -sekretion (Cicmil et al. 2002).

## 2.9 Interaktion mit anderen Blutzellen

Die Zellen im Blut teilt man in weiße Blutzellen, rote Blutzellen (Erythrozyten) und Thrombozyten ein. Zu den weißen Blutzellen gehören die Monozyten, die Granulozyten und die Lymphozyten. Die Kommunikation unter den Blutzellen führt oft zu Aktivierungen, aber auch zur Abschwächung von Aktivierungszuständen. Eine Interaktion kann über Adhäsionsmoleküle erfolgen, oder es werden Rezeptor vermittelte Signale transferiert. Die Kommunikation findet jedoch ausschließlich bei Vorhandensein einer aktivierten Zelle statt, die im Anschluss weitere Zellen aktiviert. Als Beispiel ist die Assoziation eines ruhenden Monozyten gezeigt, an den aktivierte Plättchen assoziiert sind. Die Assoziation führt zu einer Aktivierung des Monozyten (Abb. 2.7).

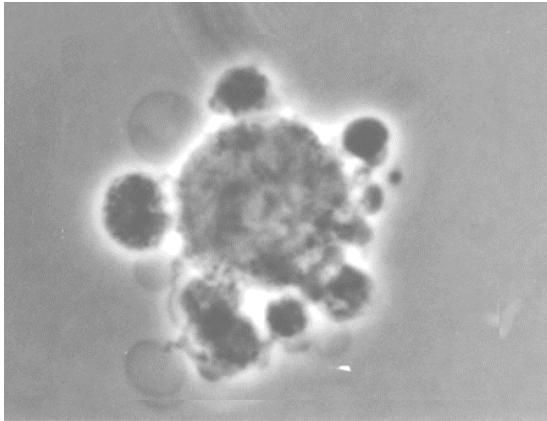


Abb. 2.7: Lichtmikroskopisches Bild der Adhäsion von Thrombozyten an einen Monozyten (B. Kehrel). Im Zentrum befindet sich der Leukozyt, ringsherum sieht man die satellitenförmige Anheftung von Thrombozyten.

Bei der direkten Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten ist das Hauptbindeglied das P-Selektin (CD62). Dieser Glykoproteinrezeptor befindet sich in der  $\alpha$ -Granulamembran der Thrombozyten und wird bei Aktivierung auf die Oberfläche der Plasmamembran transferiert. Darüber hinaus ist P-Selektin auch auf Endothelzellen lokalisiert. Es fördert die Anlagerung von Leukozyten an aktiviertes Endothel und induziert inflammatorische Reaktionen in Leukozyten.

Bei der indirekten Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten beruht die Interaktion auf Adhäsionsbrückenmolekülen, zu denen das Fibrinogen gehört. Es liegt sowohl im Plasma vor, wird aber auch aus den Thrombozyten-Granula während der Aktivierung sezerniert. Diese Bindung erfolgt über Integrine, Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass auch Thrombospondin-1 als Adhäsionsmolekül Zellen miteinander verbinden kann.

## 2.10 Monozyten und ihre Rolle bei der Entzündung

Monozyten sind in der Lage, aus dem Blutgefäß durch das Endothel zu wandern. Diese Wanderung der Leukozyten aus dem Blutkreislauf durch das Endothel bildet eine Schlüsselfunktion bei Entzündungsreaktionen, dessen Regulation Zelladhäsionsmoleküle und Zellaktivierungsprozesse übernehmen.

Monozyten, die aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen, verlassen zu einem bestimmten Zeitpunkt das Blutgefäß und können sich in nahezu allen Geweben ansiedeln. Sie differenzieren sich dort und reifen zu Makrophagen. Aufgabe der Monozyten ist unter anderem, eingedrungene Mikroorganismen und andere Fremdkörper durch

Phagozytose unschädlich zu machen. Das phagozytierte Material wird nicht komplett abgebaut, sondern wieder an der Oberfläche zusammen mit dem MHCC („major histocompatibility complex“) präsentiert und so die spezifische Abwehr eingeleitet. Monozyten besitzen Rezeptoren für den Komplementfaktor C3b, Komplement-markierte Antigene werden daher bevorzugt phagozytiert. Die Monozyten können Sauerstoffradikale, proteolytische Enzyme, NO und Defensine bilden, mit denen sie fremde und eigene Zellen schädigen können. Aktivierte Monozyten/Makrophagen sezernieren eine breite Palette an Mediatoren, Interleukinen, Wachstumsfaktoren und anderen Effektormolekülen und beeinflussen damit Entzündungs-, Abwehr- und Regenerationsprozesse in vielfältiger Weise. Sie exprimieren an ihre Oberfläche Adhäsionsprozesse, die ihnen die Transmigration durch das Endothel ins Gewebe erleichtern.

Bei dem klassischen Modell der Entzündung betrachtet man die Interaktion zwischen den Leukozyten und dem Endothel. Dabei adhären zuerst zirkulierende Leukozyten am aktivierten Endothel über einen Selektin-vermittelten Prozess. Aktiviertes Endothel präsentiert an der Oberfläche P-Selektin und E-Selektin. Die Leukozyten können über ihre entsprechenden Rezeptoren wie z.B. P-Selektin-Ligand-1 mit dem Endothel interagieren und ermöglichen ein Rollen der Leukozyten auf dem Endothel. Während des Rollens werden die Leukozyten aktiviert und exprimieren Integrine vermehrt auf ihre Oberfläche (z.B. den Mac-1 Komplex). Durch Veränderung der Integrinkonformation wird die Bindungsaffinität erhöht und die Leukozyten werden fest auf dem Endothel angebunden, wo sie sich ausbreiten, um durch die Verbindungsregion der Endothelzellen zu wandern. Bei diesem Prozess der Transmigration spielen hauptsächlich PECAM-1 und das Intergin-assoziierte Protein (CD47) eine entscheidende Rolle.

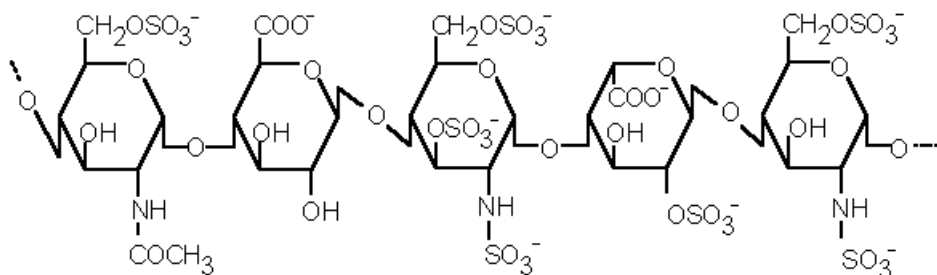
Aktivierte Thrombozyten können über P-Selektin auf ihrer Oberfläche ebenso den Roll-Vorgang der Monozyten unterstützen. Somit wurde deutlich, dass auch Plättchen Entzündungsprozesse mit beeinflussen können.

## **2.11. Heparin**

Heparine gehören zum Grundinstrumentarium in der Prävention und Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen, vor allem bei der frühen Phase der Antikoagulationsbehandlung.

Unfraktioniertes Heparin (UF-Heparin) besteht aus einer Mischung komplexer Moleküle mit unterschiedlicher Struktur und Molekulargewicht. Lediglich ein Teil dieser Moleküle ist in der Lage, die Gerinnung zu inhibieren. Hierbei wird durch die Bindung von Heparin an den physiologischen Protease-Inhibitor Antithrombin die Inhibition von Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren erhöht.

Heparin ist chemisch und biologisch kein einheitlicher Arzneistoff, sondern besteht aus einem Gemisch von sulfatierten Glukosaminoglycanen, die sich erheblich in ihrer Länge unterscheiden. In der Polysaccharidkette sind abwechselnd sulfatierte Glukosamin- und Uronsäurebausteine miteinander verknüpft (Abb. 2.8). Wegen der hohen Anzahl an sauren Gruppen zählt Heparin zu den starken physiologischen Säuren. Unfraktioniertes Heparin besitzt ein relatives Molekulargewicht zwischen 12000 und 15000 Dalton, wobei die Spannbreite von 3000 bis 30000 Dalton reicht. Durch chemische oder enzymatische Spaltung von unfraktioniertem Heparin gelangt man zu niedermolekularem Heparin (NM-Heparin). Auch das NM-Heparin ist noch ein Substanzgemisch. Die einzelnen sulfatierten Polysaccharidketten sind aber kürzer.



**Abb. 2.8:** Ausschnitt aus einem Heparinmolekül

Als unerwünschte Nebenwirkung des Heparin bei der Antikoagulation ist die Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) bekannt. Dabei unterscheidet man 2 Formen, wobei eine nicht-immunologische Form durch eine direkte Wechselwirkung von Heparin mit Thrombozyten ausgelöst wird (HIT I). Die zweite, immunologische HIT wird durch Antikörper verursacht, die sich gegen einen Komplex aus Heparin mit Proteinen, zumeist dem Plättchenfaktor 4, bilden (HIT II). Diese Antikörper führen zu einer Thrombozytenaggregation und -aktivierung, was durch einen extremen Abfall der Thrombozytenzahl gekennzeichnet ist und sowohl in venösen als auch arteriellen Gefäßen Verschlüsse auslösen kann.

## 2.12 Thrombospondin-1

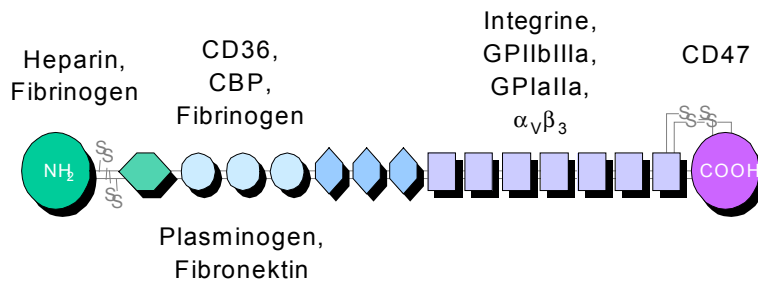
Die Abkürzung für das Thrombospondin-1, TSP-1, geht auf Baenziger zurück, der 1971 erstmals das „Thrombin-sensitive Thrombozytenprotein“ (TSP) entdeckte. Es sind heute fünf unterschiedliche Thrombospondine, TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 und COMP, das „cartilage oligomeric matrix protein“ (oder TSP-5) (Adams 1997) bekannt. Von diesen fünf Thrombospondinen ist TSP-1 jenes, das in großen Mengen aus humanen Plättchen freigesetzt wird. Es ist ein Adhäsionsprotein, das als Monomer eine Masse von 180 kDa hat, aber als Trimer mit einer Masse von 420-450 kDa vorliegt. Thrombospondin-1 ist durch seine Vielzahl an Bindungsstellen für unterschiedliche Proteine ein multifunktionelles Protein (Bornstein 2001).

Es liegt nicht nur in der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten vor, sondern wurde auch in Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten gefunden (Kehrel et al. 1996). Etwa ein Viertel der Menge aller bei der Degranulation freigesetzten Proteine ist das Thrombospondin-1 (TSP-1) (Kehrel et al. 1996).

Die Spaltung von TSP-1 an der aminoterminalen Seite ergibt ein 25 kDa großes Stück. Dieses Fragment hat eine hohe Affinität zu Heparin und ist daher als Heparin-Bindungsdomäne bezeichnet worden. Die Spaltung durch Trypsin ergibt ein 47 kDa großes Fragment, dabei wird TSP-1 carboxyterminal gespalten. Chymotrypsin hingegen spaltet TSP-1 so, dass ein 70 kDa großes Mittelfragment entsteht.

TSP-1 besitzt am aminoterminalen Ende eine Region, an der sich die Heparin- und Fibrinogenbindungsstellen befinden (Abb. 2.9). Gefolgt wird diese von einer prokollagenähnlichen Domäne und danach folgt eine properdinähnliche Domäne. Der properdinähnlichen Domäne folgend besitzt TSP-1 Bindungsstellen für CD36, Plasminogen, Fibronectin, das „CSVTCG Bindungsprotein“ (CBP) und eine weitere für Fibrinogen. Danach befindet sich im Mittelteil des Moleküls eine EGF („epithel growth factor“)-Domäne, darauf folgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne, an der verschiedene Integrine, wie z.B. die Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa und Ia/IIa, anbinden können. Am Carboxyterminus besitzt TSP-1 noch eine Bindungsstelle für CD47, das Integrin assoziierte Protein (IAP).

A:



B:

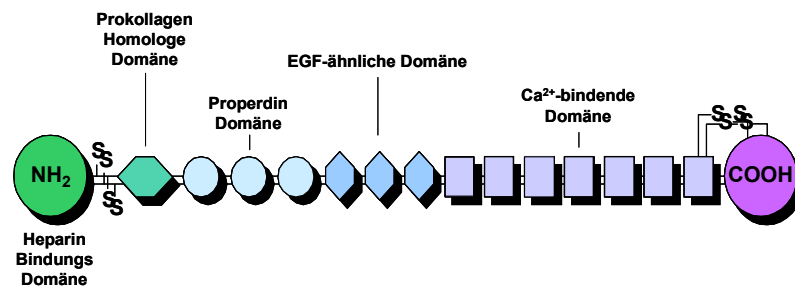


Abb. 2.9: Die schematische Abbildung des humanen Thrombospondin-1 illustriert (A) die Bindungsstellen und (B) die Domänen des Proteins (modifiziert nach J. Lawler).

Die Konformation von TSP-1 ist sehr stark von Ca<sup>2+</sup>-Ionen abhängig. Diese Eigenschaft kann sowohl die Zelladhäsionsfähigkeit, als auch die Protease-inaktivierende Wirkung regulativ beeinflussen. TSP-1 besitzt inhibierende Eigenschaften, so gilt es als langsamer, festbindender Inhibitor von Plasmin, Elastase und Cathepsin G.

TSP-1, TSP-2 und TSP-3 besitzen alle im Carboxyterminus die Sequenz RFYVVMWK (Abb. 2.10). Über diese Sequenz wird IAP auf Zellen gebunden. In TSP-4 und COMP (TSP-5) liegt die Sequenz FYVVMWK vor, die dieselbe Funktion besitzt.

TSP-1 bewirkt eine Vielzahl von Interaktionen mit Makromolekülen. Es spielt eine Rolle bei der Plättchenaggregation, vermittelt die Plättchenadhäsion an das Subendothel und vermittelt die Plättchenadhäsion an Leukozyten. Es wirkt anti-angiogenetisch (Volpert et al. 2002) und ist beteiligt an der Inhibierung des Tumorwachstums. TSP-1 wirkt regulatorisch und modulatorisch und vermittelt die „Kommunikation“ unter verschiedenen Zellen.



**N-Terminus**

```

10      20      30      40      50      60
MGLAWGLGVL FLMHVCCTNR IPESGGDNSV FDI FELTGAA RKGSGRRLVK GPDPSSPAPR
70      80      90      100     110     120
IEDANLIPPV PDDKFDQLVD AVRTEKGFL L ASLRQMKKT RGTLLALERK DHSGQVFSVV
130     140     150     160     170     180
SNGKAGTLDL SLTVQGGQHV VSVEEALLAT GQWKSITLFV QEDRAQLYID CEKMEAEELD
190     200     210     220     230     240
VPIQSVFTRD LASIARLRIA KGGVNDNFQG VLQNVRFVFG TTPEDILRNK GCSSSTSVLL
250     260     270     280     290     300
TLDNNVNGS SPAIRTNYIG HKTLDLQAIC GISCELSM VLELRGLRTI VTTLQDSIRK
310     320     330     340     350     360
VTEENKELAN ELRRPPLCYH NGVQYRNNEE WTVDSCTECH CQNSVTICKK VSCPIMPMSN
370     380     390     400     410     420
ATVPDGECCP RCWPFDSADD GSWPSEWTS CSTSCGNGIQ QRGRSCDSL NRCGSSVQT
430     440     450     460     470     480
RTCHIQCEDK RFKQDGGWSH WSPSSCSVT CGDGVITRIR LCNSPSPQMN GKPCGEARE
490     500     510     520     530     540
TKACKKDACP INGGWGPWSP WDICSVTCGG GVQKRSRLCN NPTPQFGKDV CVGDVTENQI
550     560     570     580     590     600
CNKQDCPIDG CLSNPCFAGV KCTSYPDGSW KOGACPPGYS GNGIQCTDVD ECKEVPDACP
    
```

```

610     620     630     640     650     660
NHNGEHRCE N TDPGYNCLPC PPRFTGSQPF GQGV EHTAN KQVCKPRNPC TDGTHDCNKN
670     680     690     700     710     720
AKCNYLGHYS DPMYRCECKP GYAGNGIICG EDIDL DGPEN ENLVCVANAT YHCKKDNCPN
730     740     750     760     770     780
LPNSGQEDYD KDGIGDADD DDDNDKIPDD RDNC PFHYNP AQYDYDRDDV GDRCDNCPYN
790     800     810     820     830     840
HNPDAQADTN NGEGDACAAD IDGGILNER DNCQYVYVND QRD TMDGVG DQCDNCPLEH
850     860     870     880     890     900
NPDQLSDSD RIGTCDNNQ DIEDGHQNN LDNCPYV PNA NQADHKD GK GDACD HDDD
910     920     930     940     950     960
DGI PDKDNC RLV PNDQKD SDGDGRGDAC KDDP DHDVSD DIDDICPEN V DISETDFRRF
970     980     990     1000    1010    1020
QMIPLDPKGT SQNDPNWVVR HQGKELVQTV NCDPGLAVGY DEFNAVDFSG TFFINTERDD
1030    1040    1050    1060    1070    1080
DYAGVFVGYQ SSSRFYVVMW KQVTQSYWDT NPTRAQYSG LSVKVVNSTT GPGEHLRNAL
1090    1100    1110    1120    1130    1140
WHTGNTFGQV RTLWHDPRHI GWKDFPAYRW RLSHRPKTGF IRVVMYEGKK IMADSGPIYD
1150    1160    1170
KTYAGRLGL FVFSQEMVFF SDLKYECRDP
    
```

**C-Terminus**

Abb. 2.10: Aminosäure-Sequenz des humanen Thrombospondin-1, rot unterlegt ist die Sequenz RFYVVMWK (AS 1034-1041).

**2.13 Glykoproteinspaltung**

Eine Vielzahl von Glykoproteinen liegt auf der Plättchenmembran vor, die sich teilweise mit anderen Glykoproteinen quervernetzen und Komplexe bilden. Zu diesen Verbindungen gehört neben dem GPIIb/IIIa-Komplex, dem Rezeptor für Fibrinogen, der GPIa/IIa Komplex, der als Kollagenrezeptor dient, und der Glykoprotein Ib/V/IX Komplex, der als Rezeptor für den von Willebrand Faktor eine wichtige Rolle in der Gerinnung einnimmt.

Der letztere wird aus 4 Untereinheiten gebildet, dem GPIb $\alpha$ , dem GPIb $\beta$ , dem GPV und dem GPIX (Abb. 2.11). Das Verhältnis von GPIb zu GPIX zu GPV beträgt 2:2:1, wobei GPIb $\beta$  und GPIX nichtkovalent miteinander (Moddermann et al. 1992) und GPIb $\alpha$  und GPIb $\beta$  über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

GPIb $\alpha$  und GPV sind durch unterschiedliche Agonisten in der späteren Phase der Thrombozytenaktivierung spaltbar (Wicki et al. 1985). Ein Thrombozyt besitzt ca. 30.000 Kopien dieses Komplexes, von denen sich der größte Teil in der Plasmamembran, der Rest in der Membran des OCS befindet.

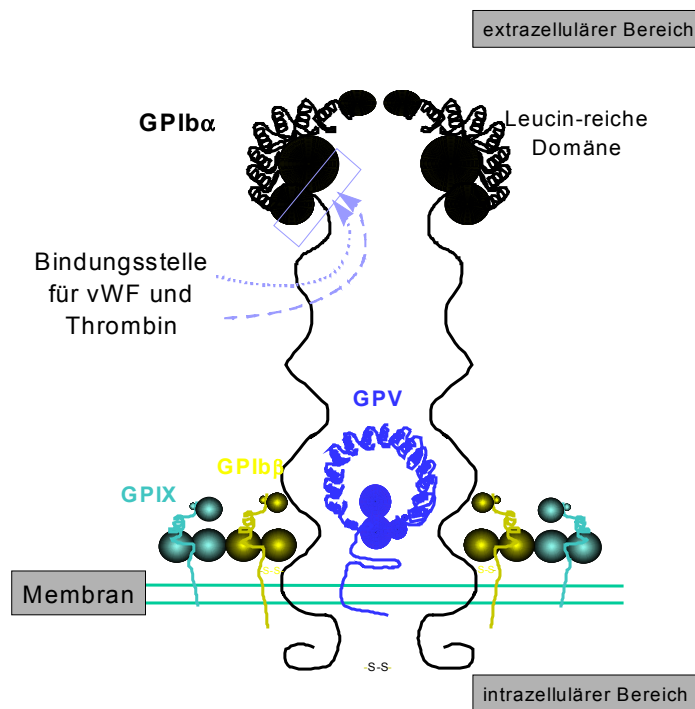


Abb. 2.11: Schematischer Aufbau des Glykoproteinkomplexes Ib/V/IX, dem Rezeptor für den von Willebrand Faktor (modifiziert nach K. J. Clemetson).

Werden Thrombozyten aktiviert, kommt es zu einer Veränderung unterschiedlicher Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche. So kann die Reorganisation des Zytoskeletts bewirken, dass sich die Rezeptoren in der Plasmamembran in dem Bereich des offenen Kanalsystems umverteilen. Zusätzlich können die Glykoproteine Ib $\alpha$  und V von der Membran durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne dieser Rezeptoren abgetrennt werden. Die Protease, die für die Spaltung des Glykoproteins Ib $\alpha$  nach Stand der Literatur verantwortlich ist, ist möglicherweise das Calpain (Fox et al. 1983). Spaltung durch diese Protease ergibt das 135 kDa-Fragment Glykocalicin, was von weiteren, bisher unbekannt Proteasen, weiter abgebaut werden kann.

Das Glykoprotein V kann durch zwei unterschiedliche Proteasen gespalten werden. Thrombin, die Hauptprotease der Hämostase, spaltet GPV zu einem 69 kDa Fragment, GPV<sub>f1</sub>. Aber zusätzlich gibt es noch eine membrannahe Spaltstelle. Bislang hat man angenommen, dass die dafür verantwortliche Protease, wie beim GPIb $\alpha$ , Calpain sei. Spaltung an der betreffenden Stelle ergibt ein 79 kDa Fragment, GPV<sub>s</sub> (Abb. 2.12).

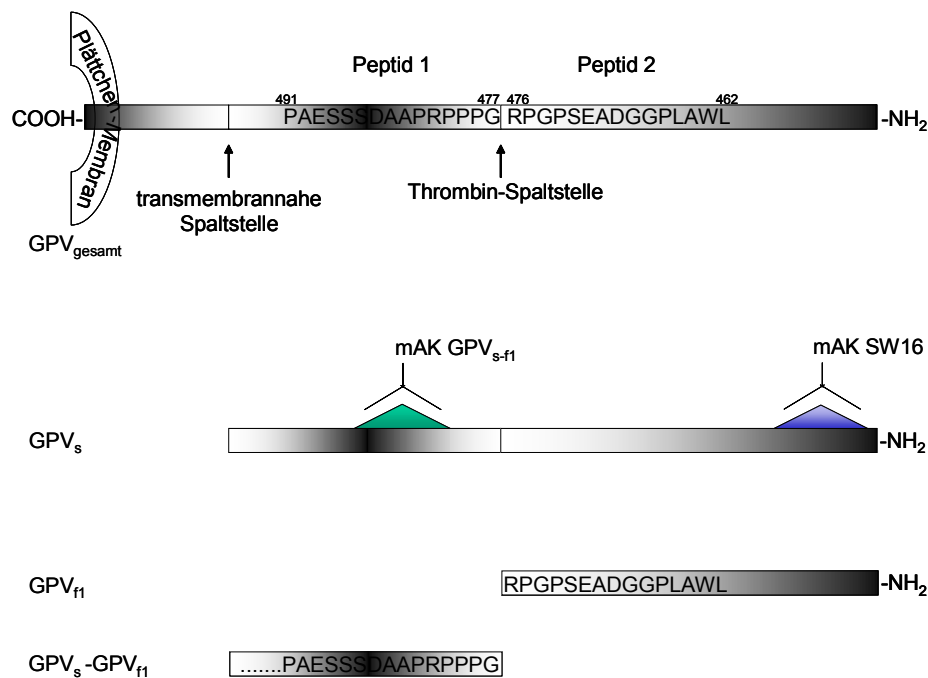


Abb. 2.12: Spaltprodukte, die in der späten Phase der Hämostase aus dem GPV entstehen können. Das Gesamtprotein besitzt eine Größe von 82 kDa, die Spaltprodukte GPV<sub>s</sub> von 79 kDa, GPV<sub>f1</sub> von 69 kDa und das kleinste Fragment eine Größe von etwa 10 kDa. Eingezeichnet sind die Aminosäure-Sequenzen der beiden Peptide 1 und 2, die sich vor und hinter der Thrombinspaltstelle befinden. Farblich gekennzeichnet sind zwei Epitope für monoklonale anti GPV Antikörper.

## 2.14 Zielsetzung der Arbeit

Bei Aktivierung der Blutplättchen werden Inhaltsstoffe der Speichergranula freigesetzt und Proteine der Plasmamembran durch Konformationsänderung und/oder Abspaltung von Proteinteilen verändert.

Das quantitativ am häufigsten in den  $\alpha$ -Granula gespeicherte TSP-1 wird bei dieser Aktivierung freigesetzt. Ein großer Teil des Proteins bindet an die Plättchenoberfläche zurück. Welche Rolle TSP-1 bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Thrombozyten in der Hämostase und der Entzündung spielt, ist aber weitestgehend noch unbekannt. Das klassische Medikament zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen ist Heparin. Dieses aktiviert aber als negative Nebenwirkung Thrombozyten.

TSP-1 geht mit Heparin eine hoch affine Bindung ein. Es war daher Zielsetzung der Arbeit zu untersuchen, ob TSP-1 die Aktivierung der Blutplättchen durch Heparin beeinflusst.

Aus dem von Thrombozyten freigesetzten TSP-1 kann die zytoplasmatische Sequenz RFYVVMWK glatte Muskelzellen aktivieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung eines TSP-1 Peptides mit dieser Sequenz auf Blutplättchen und Monozyten zu untersuchen.

Wie beschrieben führt die Plättchenaktivierung zur proteolytischen Spaltung des GPV. Wie dieser Vorgang abläuft und ob abgespaltene GPV<sub>f1</sub>-Fragmente eine physiologische Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. In dieser Arbeit sollten daher beide Aspekte, die die Spätphase der Plättchenaktivierung charakterisieren, näher untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte

#### Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer/FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Computersystem/HP9000 (Hewlett Packard, Böblingen)
- Computersystem/PowerMac7600/132 (Apple, USA)
- Steuer- und Auswerteprogramm/FACScan und CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Drucker/HP3000-Printjet und HP1600CM-Deskjet (Hewlett Packard, Böblingen)

#### Elektrophorese- und Blotgeräte

- Vertikalelektrophoresekammer/SE (Hofer, USA)
- „Tank“-Blotkammer/TE50 (Hofer, USA)
- Kühlung/LKB2219 Multitemp II (Pharmacia LKB, Schweden)
- Gelrockner/543 (Bio-Rad, München)
- Netzgeräte/LKB197, LKB2103 (Pharmacia LKB, Schweden)

#### Aggregometrie

- Lumi-Aggregometer/P.I.C.A. (Chrono-Log, Nobis, Endingen)
- Auswerteeinheit und Computerprogramm/Aggrolink (Nobis, Endingen)

#### Chromatographiegeräte

- Photometer und optische Einheit/UV1 (Pharmacia, Freiburg)
- Peristaltische Pumpe/P1 (Pharmacia, Freiburg)
- Fraktionssammler/FRAC-100 (Pharmacia, Freiburg)
- Fraktionssammler/Model 2110 (Bio-Rad, München)
- Zwei-Kanal-Schreiber/REC102 (Pharmacia, Freiburg)

#### ELISA

- Photometer/MRX (Dynatech, Denkendorf)

### Zentrifugengeräte

- Zentrifuge/Avanti J, HP-30i (Beckmann, München)
- Zentrifuge/B4i (Jouan, Frankreich)
- Zentrifuge/3K1 (Sigma, Osterode)

### Weitere Geräte

- Analysenwaage/AE50 (Mettler-Toledo, Schweiz)
- Eismaschine/Scotsman AF10 (Fisher Scientific, Nidderau)
- Folienschweißgerät/Polystar 234 (Waldeck, Münster)
- PH-Meter/STH600 (WTB, Weilheim)
- Photometer/4060 (Biochrom, USA)
- Photometer (Eppendorf, Hamburg)
- Waage/2355 (Sartorius, Göttingen)
- Wasseraufbereitungsanlage/Elix10 und Milli-Q-bioce1 (Millipore, Eschborn)
- Zellzählgerät/System 9000 (Serono Baker Diagnostics, USA)

## 3.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bio-Rad (München), Calbiochem (Bad Soden), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), ICN (Meckenheim), Loxo (Dossenheim), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Protein Sciences (Meriden, USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

## 3.3 Antikörper

Antigen	Spezifität	<u>monoklonal/</u> polyklonal (Spezies)	Klon-Name	Konjugation	Bezugsquelle
GPIb	human	m. Maus	SZ2		Immunotech, Hamburg
GPIb	human	p. Kaninchen			Geschenk von Prof. Clemetson, Bern
GPV	human	m. Maus	SW16		CLB
GPV	human	m. Maus	GPV <sub>s-fl</sub>		selbst hergestellt

GPV	human	p.Kaninchen				selbst hergestellt
GPIX	human	m. Maus	Beb 1	PE		Becton
				FITC		Dickinson, Heidelberg
CD 14	human	m. Maus	MΦP9	FITC		Becton Dickinson, Heidelberg
CD36	human	m. Maus	IVC7	FITC		Caltag Lab., Bulingame , USA
CD40L	human	m. Maus	24-31	PE		Calbiochem,
CD42a	human	m. Maus	Beb1	PerCP		Becton Dickinson, Heidelberg
CD62P	human	m. Maus	CLB-thromb/6	FITC		Immunotech, Hamburg
				PE		
CD63	human	m. Maus	CLB-gran/12	FITC		Immunotech, Hamburg
Thrombo- spondin-1	human	m. Maus	P10	PE		Immunotech, Hamburg
Thrombo- spondin-1	human	m. Maus	2126-332			B. Kehrel Münster
Thrombo- spondin-1	human	p. Kaninchen				Calbiochem
Tissue Faktor	human	m. Maus	4508CJ	FITC		american diagnostic, Dossenheim
VASP (phosphoryliert)	human	m. Maus	VASP-16C2			Nanotools, Teningen
Von Willebrand Faktor	human	m. Maus	4F9			Immunotech, Hamburg

Tab. 3.1: Monoklonale und polyklonale Antikörper, die in der Dissertation verwendet wurden

### 3.4 Präparation der Thrombozyten, Monozyten und des Plasmas

Für die Gewinnung von Blutzellen bzw. Blutplasma wurde freiwilligen Probanden oder Patienten venöses Blut mit Hilfe eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbestecks (Venofix/Braun, Melsungen) abgenommen. Für die meisten Experimente wurde 110 nM Natrium-Citrat als Antikoagulanzen (1:10) gewählt. Zur Inhibition von Thrombin wurde rekombinantes Hirudin (Loxo, Dossenheim) in einer Endkonzentration von 10 U/ml als Antikoagulanzen eingesetzt.

Um größere Mengen an Blutzellen zu gewinnen, wurden frische Vollblutkonserven, die nach der Entfernung der Erythrozyten mit Leukozyten und Thrombozyten angereichert waren („buffy coats“), vom Deutschen Roten Kreuz, Münster, zur Verfügung gestellt.

#### 3.4.1 Isolierung der Thrombozyten aus Plättchenreichem Plasma (PRP)

Antikoaguliertes Vollblut wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 190 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Plättchenreiche Plasmaüberstand wurde vom Leukozyten- und Erythrozytenrückstand durch Abpipettieren getrennt. Bei der Thrombozytengewinnung aus „buffy coats“ wurde den Zellen zur weiteren Zellstabilisierung im Verhältnis 5:3 ein Waschpuffer zugesetzt:

##### Lösungen:

BC-Waschpuffer	Na <sub>3</sub> -Citrat	30 mM
pH 6,5	Natriumchlorid	100 mM
	Kaliumchlorid	3 mM
	D(+)-Glukose	9,6 mM
	EDTA	2 mM

#### 3.4.2 Isolierung der Thrombozyten durch Waschen

Hierbei wurden die Plasmaproteine und an Plättchen haftender vWF entfernt. Die verdünnten PRPs wurden vereinigt und bei 1000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert („gewaschen“). Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, verworfen und die abzentrifugierten, pelletierten Thrombozyten schonend mit 3 ml CGSE-Puffer resuspendiert. Nach Vereinigung der Suspensionen und zweimaligem Waschen wurde eine nahezu vollständige Isolierung der Plättchen von den Plasmaproteinen erreicht.



Lösungen:

CGSE-Puffer	Na <sub>3</sub> -Citrat	29 mM
pH 6,5	D(+)-Glukose	30 mM
	Natriumchlorid	120 mM
	EDTA	5 mM

**3.4.3 Isolierung der Thrombozyten durch Gelfiltration**

Im Vergleich zum „Waschen“ der Thrombozyten bietet die Gelfiltration eine schonendere Trennung der Plättchen von Plasmaproteinen (Timmons und Hawiger 1989). Eine Entfernung von Plättchen-anhaftendem vWF ist hierbei nicht möglich, bedingt durch die Plättchenschermung am Säulenmaterial und die Größe der vWF Multimere.

Sepharose 2B (Pharmacia, Freiburg) wurde mit 154 mM NaCl gewaschen und in eine silikonisierte Glassäule (26 cm Länge, 2,5 cm Innendurchmesser) luftblasenfrei gefüllt. Als Äquilibrierungs- und Elutionspuffer wurde Hepes/Tyrode-Puffer benutzt, je nach Versuch mit oder ohne Serumalbumin. Aus 20-100 ml Citrat-Vollblut gewonnenes PRP wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und eluiert. Aufgrund der Größe konnten die Thrombozyten als getrübbes Zelleluat vor den Plasmaproteinen fraktioniert aufgefangen werden.

Die Reinigung des Säulenmaterials erfolgte mit 154 mM NaCl (0,02 % (w/v) Natriumazid). Zur vollständigen Regeneration wurde das Säulenmaterial dann mit 0,1 M NaOH und anschließend mit 3 % Wasserstoffperoxid behandelt. Äquilibriert wurde mit 154 mM NaCl.

Lösungen:

Hepes/Tyrode-Puffer	Natriumchlorid	154 mM
pH 7,4	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	0,42 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
	BSA	0,35 %

### 3.4.4 Isolierung der Monozyten

Die Isolierung von Leukozyten wurde nach dem Elutriationsverfahren mit einem speziellen Elutriator-Rotor mit angeschlossenem Schlauchsystem, einer Pumpe, sowie einer Stroboskop-Lampeneinrichtung durchgeführt.

Dabei wird die zu trennende Zellsuspension mit einer Pumpe in die Elutionskammer des Elutriator-Rotors bei konstanter Rotorgeschwindigkeit transportiert. Die Fließkraft des Zellsuspensionsstroms, die durch die Pumpe erzeugt wurde, und die Zentrifugalkraft in der Elutionskammer sind dabei entgegengesetzt. Bei der Anreicherung der Zellen in der Elutionskammer ist die Zentrifugalkraft größer als die Elutionsgeschwindigkeit, so verbleiben sämtliche Zellen gemäß ihrer Größe und Dichte in bestimmten Zonen innerhalb der Kammer und werden konzentriert. Überwiegt die Geschwindigkeit der durch die Pumpe erzeugten Fließkraft, werden die ersten Zellen, die am nächsten an der Ausflussöffnung liegen, eluiert. Mit kontinuierlicher Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit werden die Zellen mit zunehmender Größe und Dichte eluiert.

Die Methoden von Yasaka et al (1981) und Schmitz et al (1987) dienten als Grundlage für die Isolierung der Monozyten. Die gesamte Menge eines humanen „buffy coats“ wurde mit PBS-Puffer auf 200 ml aufgefüllt und die Erythrozyten mit Dextran 500 sedimentiert. Hierzu wurden 8 ml 8 % Dextran-Lösung mit 42 ml verdünnter Blutzellsuspension gemischt, 40 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Überstände von jeweils zwei 50 ml Dextran-Zell-Suspensionsröhrchen danach vereinigt. Nach Auffüllen mit 30 ml Hank`s-Puffer wurde 10 min bei 400 g und 20°C zentrifugiert, die sedimentierten Zellen mit Hank`s-Puffer resuspendiert und auf insgesamt 20 ml aufgefüllt.

Die Elutriatorgeschwindigkeit betrug 1950 rpm bei 18°C mit einer Anfangspumpengeschwindigkeit von 7 ml/min. Die Zellen wurden bei nicht laufender Pumpe injiziert und anschließend mit 60 ml Hank`s-Puffer bei einer Flussrate von 7 ml/min äquilibriert. Die Pumpengeschwindigkeit wurde auf 10 ml/min erhöht. Nach Verwerfung von 150 ml wurde die Pumpengeschwindigkeit kontinuierlich erhöht. Jeweils 150 ml Zellsuspension, aufgeteilt in drei Fraktionen, wurden bei Flussraten von 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 15 und 21 ml eluiert.

Die Fraktionen wurden bei 200 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Zellen mit je 5 ml Hank`s-Puffer resuspendiert und die Leukozytenverteilung im Durchflusszytometer (s. Kap. 3.6) quantitativ ermittelt. Die Fraktionen mit den reinsten Monozytenpopulationen wurden



Zur Wirkungsprüfung der Antagonisten wurde diese Suspension mit den entsprechenden Antagonisten für 5 min vorinkubiert. Zuerst wurde der Nullabgleich mit dem Referenzpuffer, Hepes/Tyrode-Puffer, durchgeführt. In die zweite Messküvette wurden die entsprechenden Agonisten einpipettiert und der Aggregationsverlauf innerhalb von 5 min aufgezeichnet.

#### Lösungen:

Hepes/Tyrode-Puffer                      s. Kap. 3.4.3

### **3.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der man optische Eigenschaften einzelner Zellen bzw. Partikel in Suspension bestimmen und analysieren kann. Durch die Anregung mit Laserlicht können Größe und Morphologie von Zellen und die Fluoreszenzintensitäten von markierten Zellen simultan detektiert werden.

Dies ist für mehr als 10.000 Zellen in weniger als einer Minute möglich. Unterscheidbar sind sogar Partikel von weniger als 0,5 µm Durchmesser, so dass auch Bakterien und Zellfragmente bestimmt werden können.

Da die ermittelten Daten auf relativen Messsignalen beruhen, ist indirekt mit Hilfe von Standard-Kügelchen, so genannte „Beads“, eine Bestimmung absoluter Werte bezüglich eines Parameters für eine Zelle möglich.

Eine monodisperse Partikel- oder Zellsuspension wird in einem Probenröhrchen über eine Edelstahl-Kapillare durch Druck in die Messküvette gesogen. Die Trägerflüssigkeit, mit der die Zellen umspült werden, beschleunigt die Zellen so stark, dass diese aufgetrennt und aneinandergereiht Zelle für Zelle am Laserlichtstrahl vorbeigeführt werden (hydrodynamische Fokussierung). Der in dieser Arbeit verwendete FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) ist mit einem Argonlaser ausgestattet, dessen Hauptlinie bei 488 nm eine angemessene Quelle für monochromatisch blaues Licht bildet und somit für die Anregung gängiger Fluorochrome, wie z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll (PerCP) geeignet ist.

Sobald eine Zelle oder ein Partikel den fokussierten Laserstrahl passiert, wird die Richtung und die Wellenlänge des anregenden Lichts verändert, so dass die charakteristische Streuung des blauen Lichts in Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) aufgetrennt wird.

Das Vorwärtsstreulicht mit einem Winkel von 3-15° zum Laserstrahl wird von einer Photodiode detektiert. Das Seitwärtsstreulicht mit einem Winkel von 80-100° zum Exzitationsstrahl wird in einer Photomultiplier-Röhre fokussiert und elektronisch verstärkt. Das Vorwärtsstreulicht gibt dabei Informationen über die Größe, das Seitwärtsstreulicht über die Morphologie, wie z.B. Granularität oder Membraneigenschaften von Zellen, an.

Binden Fluorochrom-konjugierte Antikörper an Zellantigene, absorbieren die Fluorochrome das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht mit charakteristischen Wellenlängen. Nach Leitung durch spezielle Filter und Fokussierung in Photomultiplier-Röhren wird das Fluoreszenzlicht elektronisch verstärkt. In dem in dieser Arbeit verwendeten FACScan existierten 4 Filter: für das Seitwärtsstreulicht ein 488/10-BP-Filter, für FITC-Konjugate ein 530/30-BP-Filter, für PE-Konjugate ein 585/45-BP-Filter und für PerCP-Konjugate ein 620/LP-Filter. Somit ist die Detektion von 4 Parametern einer Zelle oder eines Partikels möglich.

Ist eine Zelle oder ein Zellpartikel mit mehreren Fluorochrom-Konjugaten markiert, kann aufgrund von Überlappung der Emissionspektren der verschiedenen Fluorochrome dies zu falschen quantitativen Ergebnissen führen. Zur Verhinderung dieses Fehlers führt man eine Signal-Kompensation durch, indem man die elektronisch überlappenden Fluoreszenzsignale voneinander subtrahiert. Um die zu untersuchenden Zellen oder Zellpartikel von elektronischem Grundrauschen (electronic noise) zu trennen, wird ein Schwellenwert für das Vorwärtsstreulicht gesetzt.

Ein Durchflusszytometer ist in der Lage, Signale sowohl im logarithmischen als auch im linearen Modus zu messen. Kleine Zellen, wie Thrombozyten oder Zellmikropartikel, werden im logarithmischen Modus gemessen. Schwache Signale (von kleinen Zellen) werden gespreizt und starke Signale komprimiert. Größere Zellen, wie z.B. Leukozyten, werden im linearen Modus gemessen. Hier werden stärkere Signale gespreizt und besser aufgelöst. Für die Detektion der Immunfluoreszenzen wird immer die logarithmische Verstärkung gewählt, da sie den dynamischen Messbereich derart vergrößert, dass sowohl schwächere als auch stärkere Signale mit derselben Skalierung erfasst werden können. Die analogen Signale werden digitalisiert, bevor sie im Computer mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogramms analysiert werden. Die Auflösung der erhaltenen Daten hängt dabei vom jeweiligen Konverter ab.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACScan wurden sämtliche Signale auf 1024 (0-1023) Kanäle aufgeteilt.

Die Zweiparameterdarstellung von FSC zu SSC zur Unterscheidung von Zellpopulationen wird in Form eines Punktehistogramms („Dot-plot“) herangezogen. Durch eine spezifische Antikörpermarkierung kann zusätzlich eine Zelldifferenzierung einzelner Zelltypen erfolgen. Durch Eingrenzen („gaten“) einer Zellpopulation während oder nach einer Messung kann man separat interessierende Zellen getrennt von anderen betrachten.

Bei den meisten Parameteruntersuchungen wird zur Auswertung die Zellzahl (Ordinate) gegen die Kanäle (Abszisse) aufgetragen, man erhält ein Histogramm (Einparameterdarstellung). Bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung in Form eines Punktehistogramms können neben der Korrelation von FSC mit SSC auch Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen untereinander oder mit Streulichteigenschaften verglichen werden.

Für die statistische Auswertung wird je nach Parametercharakteristik entweder der Median der Signalintensität, oder die Anzahl der Ereignisse als relative Prozentanteile bestimmt. Dabei entspricht der Median der Verteilungsklasse, bei der 50 % der Werteverteilung darüber und 50 % darunter liegen. Er gibt eine realistische Abschätzung des Signalwertes der Hauptpopulation von Zellen an, da er von so genannten „Ausreißern“ am wenigsten beeinflusst wird. Der prozentuale Anteil von selektierten Ereignissen innerhalb einer Zellpopulation wird dann als Auswertekriterium herangezogen, wenn sich die Zellpopulation bezüglich eines Funktionsparameters nicht homogen verhält (Raffael, 1988; Keij und Herweijer, 1992; Ormerod, 1994; Schmitz und Rothe, 1994).

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die aktivierungsabhängige Anbindung von Antikörpern oder Adhäsionsproteinen an Thrombozyten und Leukozyten zu erfassen und um quantitativ die Assoziante dieser Zelltypen zu bestimmen.

Um eine Vergleichbarkeit von an verschiedenen Tagen gemessenen Proben zu gewährleisten, wurde die Durchflusszytometereinheit regelmäßig mit dem „Quantum™ 26 Premixed-Kit“ (FCSC San Juan, PR) geeicht. Die Bestimmung der Antikörper-Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des „Quantum™ Simply Cellular Kit“ (FCSC San Juan, PR).

### 3.6.1 Probenvorbereitung für die Untersuchung der Zellen

Die Zellzahl der aus PRP gewonnenen oder durch Gelfiltration gereinigten Thrombozyten wurde mit Puffer auf 25.000/ $\mu$ l eingestellt und die Zellen mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert (s. Kap. 3.6.2). Die Zellzahl in der Suspension wurde so eingestellt, dass Zell-Zell-Kontakte vermieden wurde. Das Abstoppen der Aktivierung wurde durch Zugabe von 1 % Formaldehyd im Verhältnis 1:1 (v/v) erreicht, die Zellen wurden für 30 min fixiert. Da durch Bewegungen die Zellen aktiviert werden konnten, mussten jegliche Erschütterungen der Probenröhrchen während der Aktivierung und der Fixierung vermieden werden. Durch Verdünnung der Zellsuspension mit 1 ml Puffer und Zentrifugation bei 20°C für 10 min bei 1000 g wurden die Zellen gewaschen.

Die Zellzahl der elutrierten Monozyten wurde mit HEPES/Tyrode-Puffer auf 3000 Zellen/ $\mu$ l eingestellt und mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert. Auch bei diesen Zellen wurde die Aktivierung durch Zugabe von 1 % Formaldehyd im Verhältnis 1:1 (v/v) gestoppt. Nach 30 min Fixierung wurden die Zellen mit 1 ml Puffer verdünnt und bei 750 g für 10 min zentrifugiert. Der überstehende Puffer wurde entfernt und das Zellpellet resuspendiert.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Diese Bestimmungen werden durch Detektion von Membranglykoproteinen und deren Rezeptoren direkt oder indirekt durchgeführt. Dabei werden Zu- oder Abnahme von Bindungen und Anbindungsstellen spezifischer Antikörper oder Adhäsionsmolekülen untersucht. Das Ergebnis dieser Quantifizierung wird durch den Median, den mittleren Fluoreszenzwert, angezeigt. Thrombozyten und Monozyten wurden mit Hilfe der Streulichteigenschaften FSC und SSC identifiziert.

### 3.6.2 Zellaktivierung

Thrombozyten und Monozyten wurden mit unterschiedlichen Agonisten für die durchflusszytometrische Bestimmung stimuliert.

### 3.6.2.1 Thrombin

Thrombin spielt bei der Thrombozytenaktivierung eine entscheidende Rolle. Es wird aus Prothrombin durch den Prothrombinasekomplex (Komplex aus Faktor II, Faktor Xa, Faktor Va) gespalten und ist die wichtigste aller Thrombozytenproteasen.

Um bei Thrombinaktivierungen die Aneinanderlagerung einzelner Fibrinmoleküle zu verhindern, die zu einer Fibrinpolymerisation und somit zur Gerinnungsbildung führen würde, wurden 1,25 mM des Peptids GPRP mit den Thrombozyten vorinkubiert, welches die Fibrinpolymerisation inhibierte.

$\alpha$ -Thrombin (aus dem Rind, SIGMA, Deisenhofen) wurde für 3 min bei gefilterten Plättchen oder PRP in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 2 U/ml vorgelegt. Die Thrombozytensuspension wurde aufgegeben und nach der Aktivierungszeit mit Formaldehyd fixiert.

#### Lösungen:

Thrombin-Stammlösung	$\alpha$ -Thrombin in 154 mM NaCl	100 U/ml
GPRP-Stammlösung	GPRP in 154 mM NaCl	125 mM

### 3.6.2.2 Kollagen

Ein anderes Protein, das Plättchen aktiviert, ist methyliertes Kollagen Typ I, welches in unserem Labor nach Rauterberg et al 1968 hergestellt wurde.

PRP oder gefilterte Plättchen wurden mit methyliertem Typ I Kollagen für 5 min im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2  $\mu$ g/ml aktiviert. Die Aktivierung wurde mit Formaldehyd gestoppt.

#### Lösungen:

Kollagen-Stammlösung	methyliertes Kollagen Typ I in 154 mM NaCl und 0,05 % Essigsäure	200 $\mu$ g/ml
----------------------	--	----------------



### 3.6.2.3 ADP

Auch Adenosindiphosphat ist ein milder Plättchenaktivator. Die Aktivierungszeit betrug 3 min. Sie wurde mit ADP in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Reaktion wurde ebenfalls mit Formaldehyd gestoppt und die Plättchenmembran fixiert.

#### Lösungen:

ADP-Stammlösung	ADP	1 mM
	in 154 mM NaCl	

### 3.6.2.4 C-terminales TSP-1-Peptid RFYVVMWK

Das C-terminale TSP-1-Peptid RFYVVMWK aktiviert sowohl Thrombozyten (Chung et al. 1997, Dorahy et al. 1996), als auch Monozyten. PRP, gelfiltrierte Plättchen oder Monozyten wurden mit dem Peptid in einem Konzentrationsbereich von 12,5 bis 150  $\mu\text{M}$  für 3 min aktiviert. Die Aktivierung wurde durch Zugabe von Formaldehyd gestoppt.

#### Lösungen:

Peptid-Stammlösung	RFYVVMWK	3 mM
	in 154 mM NaCl	

### 3.6.2.5 Plättchenaktivierung durch Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spalten unterschiedliche Proteine und aktivieren hierbei Thrombozyten. In dieser Arbeit wurden die Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 (MMP 2 / MMP 9) verwendet. Die Aktivierungszeit betrug 30 min, der Einsatzbereich lag zwischen 0,5 und 2  $\mu\text{g/ml}$ . Die Aktivierung wurde durch Zugabe von Formaldehyd gestoppt.

Matrixmetalloproteinasen müssen, um in der Lage zu sein, Proteine zu spalten, aktiviert werden. Dazu wurden die MMPs mit 1 mM APMA (4-Aminophenyl Quecksilberacetat) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Lösungen:

MMP-Stammlösung	MMP 2 / MMP 9	100 $\mu\text{g/ml}$
	in 154 mM NaCl	

APMA-Lösung	APMA gelöst in 5 % Essigsäure	100 mM
-------------	----------------------------------	--------

### 3.6.2.6 TRAP

Die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin wird über mehrere Rezeptoren vermittelt. Zu diesen Rezeptoren gehört unter anderem der „protease activating receptor-1“ (PAR-1). Durch Spaltung dieses Rezeptors wird eine Thrombozytenaktivierung induziert, da ein Peptid, das aus den Aminosäuren SFLLRN besteht, freigelegt wird und an den Rezeptor bindet. Dieses Peptid (TRAP-6, „thrombin receptor activatable peptide-6“) kann auch extern zugesetzt werden und aktiviert dann PAR-1. Thrombozyten wurden mit TRAP-6 für 5 min bei Raumtemperatur aktiviert. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 25 bis 150  $\mu$ M. Die Aktivierung wurde durch Fixierung mit Formaldehyd gestoppt.

#### Lösungen:

TRAP-Stammlösung	TRAP in Dimethylsulfoxid (DMSO); vor der Aktivierung wurde die Stammlösung 1:100 in PBS-Puffer verdünnt	100 mM
------------------	--	--------

### 3.6.2.7 Plättchenaktivierung durch Heparin

Leicht voraktivierte Thrombozyten können mit Heparin (Braun, Melsungen) weiter aktiviert werden. Je nach Versuch wurden für 5 min 10  $\mu$ g/ml TSP-1 oder anderen Adhäsionsproteinen, wie Vitronectin (0-20  $\mu$ g/ml), mit den Zellen inkubiert. Zur Voraktivierung wurde der Plättchensuspension 0,2 mM  $Zn^{2+}$  gegeben und für weitere 2 min vorinkubiert. Anschließend wurde Heparin in Konzentrationen von 0-2 U/ml zugegeben. Nach 30 min Reaktionszeit wurden 500  $\mu$ l Hepes-Tyrode-Puffer zugegeben und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.6.2.8 Ristocetin

Ristocetin A ist ein Antibiotikum, das eine Konformationsänderung am von Willebrand Faktor auslöst und damit dessen Anbindung an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht. Die Thrombozyten wurden mit 0-2 mg/ml Ristocetin für 5 min aktiviert. Die Aktivierung wurde durch Fixierung mit Formaldehyd gestoppt. Nach einem Waschschrift wurden die Plättchen mit 5  $\mu$ g/ml anti vWF Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, gewaschen und

anschließend mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Plättchen durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.6.3 Nachweis der Plättchenaktivierung

Der qualitative und quantitative Nachweis der Thrombozytenaktivierung ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich. Dabei werden Veränderungen an Membranproteinen direkt oder indirekt detektiert. Je nach Zielparameter wird eine Abnahme oder ein Zuwachs von Proteinen oder Antikörpern auf der Plättchenoberfläche bestimmt.

#### 3.6.3.1 Bindung des Fibrinogens

Der GPIIb/IIIa-Komplex ist ein aktivierungsabhängiges Antigen auf der Oberfläche der Thrombozyten und ist Hauptrezeptor für Fibrinogen. Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GPIIb/IIIa-Komplex wurde durch Bindung von zugesetztem, humanem, Fluorochrom-konjugiertem Fibrinogen an aktivierte Thrombozyten gemessen. Die Anbindung des FITC an Fibrinogen wurde nach der Methode von Xia et al (1996) durchgeführt.

10 mg humanes, lyophilisiertes Fibrinogen (Kordia, Niederlande) wurde in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und mit 5 mg FITC (Fluorisothiocyanat) an Celite (Calbiochem, Bad Soden) versetzt. Die Suspension wurde 24 h bei 4°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Die nicht gelösten Reagenzien wurden bei 13.000 g für 10 min bei 20°C abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde das mit FITC-konjugierte Fibrinogen von Celite-gebundenem FITC abgetrennt.

Die Proteinlösung wurde bei 280 nm und 495 nm photometrisch gemessen und das FITC-Protein-Verhältnis nach

$$F/P \text{ (molar)} = \frac{OD_{495} \times \epsilon \text{ (Fibrinogen)} \times MG \text{ (Fibrinogen)}}{\epsilon \text{ (FITC)} \times MG \text{ (FITC)} \times (OD_{280} - 0,35 \times OD_{495})}$$

bestimmt.

F/P (molar)	Anzahl der FITC-Moleküle pro Proteinmolekül	
MG (Fibrinogen)	333 kDa	
MG (FITC)	390 Da	
$\epsilon$ (Fibrinogen)	$OD_{280} - (0,35 \times OD_{495}) / \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}$	
$\epsilon$ (FITC)	200	(nach Peters und Baumgarten, 1990)

Dabei erhielt man durchschnittlich eine Konjugation von 5 bis 7 FITC-Molekülen an ein Fibrinogen-Molekül.

Zur Untersuchung der Thrombozytenaktivierung wurde die FITC-Fibrinogen-Suspension in einer finalen Konzentration von 150 µg/ml zugesetzt. Die Inkubationszeit mit den Thrombozyten betrug 5 min.

#### Lösungen:

PBS-Puffer	s. Kap. 3.4.4	
Hepes/Tyrode-Puffer	s. Kap. 3.4.3	
Kopplungspuffer:	PBS-Puffer	4,5 ml
pH 7,8	Natriumcarbonat-Lösung	24 µl
	Natriumcitrat-Lösung	0,5 ml
Natriumcarbonat-Lösung	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 % (w/v)
Natriumcitrat-Lösung	Na <sub>3</sub> -Citrat	110 mM

#### **3.6.3.2 Bindung des von Willebrand Faktors (vWF)**

Auch Bindung des vWF an Thrombozyten ist aktivierungsabhängig, sie erfolgt dabei über das Glykoprotein GPIb $\alpha$  und den GPIIb/IIIa-Komplex. Die Anbindung des vWF wurde mit Hilfe des monoklonalen anti vWF Antikörpers Klon 4F9 durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei wurden die fixierten Thrombozyten mit einer sättigenden Konzentration an Klon 4F9 (10 µg/ml) für 1 h bei 20°C inkubiert, mit 1 ml PBS-Puffer versetzt, für 10 min bei 2200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die gewaschenen Thrombozyten wurden mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper, anti-Maus-IgG (1:100), für 1 h bei 20°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde die vWF-Anbindung durchflusszytometrisch bestimmt.

#### Lösungen:

PBS-Puffer	s. Kap. 3.4.4
------------	---------------

### **3.6.3.3 Expression von Membranproteinen der Granula als Marker für die Sekretion**

#### **3.6.3.3.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion, CD62P-Expression**

Auch die Sekretion von Granulaproteinen ist ein Marker für die Aktivierung von Thrombozyten. Die Expression von P-Selektin (CD62P), einem Membranprotein der  $\alpha$ -Granula, auf die Oberfläche, wurde mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen anti CD62P Antikörper durchflusszytometrisch quantifiziert. Zu aktivierten, fixierten und danach gewaschenen Thrombozyten wurde der Klon CLB/thromb/6 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  gegeben, für 1 h bei 20°C inkubiert und nach erneutem Waschen die Anbindung des Antikörpers im Durchflusszytometer bestimmt.

#### **3.6.3.3.2 Sekretion der elektronendichten Granula, CD63-Expression**

Werden Thrombozyten stark genug aktiviert, verschmilzt die Membran der elektronendichten Granula mit der Plättchenoberflächenmembran, und CD63, Granulophysin, wird auf die Thrombozytenoberfläche exprimiert. Je stärker Thrombozyten aktiviert werden, desto größer ist die Menge an exprimiertem CD63. Mit Hilfe des FITC-konjugierten, monoklonalen anti CD63 Antikörpers (Klon CLB/gran/12) konnte die Menge an Granulophysin durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Dabei wurden zu aktivierten, fixierten und gewaschenen Thrombozyten 5  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper gegeben, für 1 h bei 20°C inkubiert, gewaschen und die Anbindung des Antikörpers im Durchflusszytometer detektiert.

#### **3.6.3.4 Expression des CD40 Liganden**

CD40 Ligand (CD40L, CD154) wurde ursprünglich auf stimulierten CD4<sup>+</sup>T Zellen gefunden. Aber auch auf aktivierten Mast-Zellen und Basophilen ist CD40 Ligand qualifiziert worden. 1998 berichteten Henn et al, dass auch CD40L auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten quantifiziert werden konnte.

Thrombozyten wurden aktiviert, fixiert und gewaschen. Den „pelettierten“ Zellen wurden in sättigenden Konzentrationen der PE-konjugierte monoklonale anti CD40L Antikörper (Klon 24-31) zugegeben, für 60 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert und danach ungebundener Antikörper abgewaschen. Angebundener Antikörper wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

### 3.6.3.5 Rückbindung des aus den Granula freigesetzten Proteins Thrombospondin-1

#### 3.6.3.5.1 Bindung von extern zugesetztem TSP-1

TSP-1 wurde wie Fibrinogen mit dem Fluorochrom FITC konjugiert (s. Kap. 3.6.3.1). Dabei wurde in diesem Fall kein Citrat zugesetzt, sondern 1 mg TSP-1 in TBS-Puffer und unter Zusatz von 2 mM Calciumchlorid mit 0,5 mg Celite-adsorbiertem FITC für 24 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben und FITC-TSP-1 von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt. Die Endkonzentration des FITC-TSP-1, das den Thrombozyten extern zugesetzt wurde, betrug 50 µg/ml. Die Vorinkubationszeit mit den Zellen betrug 5 min.

#### Lösungen:

TBS-Puffer	Natriumchlorid	154 mM
pH 7,4	Tris/HCl	50 mM
	Zusatz: Calciumchlorid	2 mM

#### 3.6.3.5.2 Quantitative Bestimmung des Plättchenoberflächen-gebundenen TSP-1

Für den Nachweis der aktivierungsbedingten Sekretion von TSP-1 aus den  $\alpha$ -Granula wurde der Phycoerythrin (PE) konjugierte anti TSP-1 Antikörper (Klon P10) in sättigenden Konzentrationen von 2,5 µg/ml eingesetzt. Die Inkubationszeit mit den aktivierten, fixierten und gewaschenen Thrombozyten betrug bei 20°C 1 h. Nach Waschen der Thrombozyten wurde die Menge an Oberflächen-gebundenem TSP-1 durchflusszytometrisch ermittelt.

#### 3.6.3.6 Prokoagulanter Zustand

Der erhöhte Anteil des negativ geladenen Phosphatidylserins auf der Außenseite der Thrombozytenmembran verwandelt diese in eine prokoagulatorische Oberfläche.

Diese stellt Bindungsstellen für den Prothrombinasekomplex zur Verfügung.

Der Komplex setzt sich aus dem aktivierten Faktor X, dem Faktor Va und Prothrombin zusammen. Durch diese Komplexbildung kann Prothrombin zu Thrombin gespalten werden. Auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten kann dann der Koagulationsfaktor XIII binden, der wiederum bei der Fibrin-Polymerisation die Rolle der Gerinnsel-Stabilisierung übernimmt.

### 3.6.3.6.1 Messung von Annexin V

Zum Nachweis von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Plasmamembran dient Annexin V, das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phosphatidylserinreste bindet. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/ $\mu\text{l}$  mit „Prokoagulationspuffer“ eingestellt und je 100  $\mu\text{l}$  nach Zusatz von 1,25 mM GPRP mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FITC-Annexin V (Bender Med Systems, Wien) für 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml „Prokoagulationspuffer“ wurde die FITC-Annexin V Anbindung durchflusszytometrisch bestimmt.

#### Lösungen:

“Prokoagulationspuffer” pH 7,35	Natriumchlorid	127 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	0,42 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
	Magnesiumchlorid	1 mM
	Calciumchlorid	6 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM

### 3.6.3.6.2 Messung des Faktors Va

Humaner Faktor Va wurde zuerst mit FITC konjugiert. Dazu wurden 1 mg Faktor Va mit 0,5 mg FITC an Celite in TBS-Puffer gelöst und bei mäßigem Schütteln für 24 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde der mit FITC-konjugierte Faktor Va von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt.

Die Endkonzentration an zugesetztem FITC-FVa betrug 1 U/ml (das entspricht 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Vorinkubation mit den Zellen betrug 5 min. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/ $\mu\text{l}$  mit Prokoagulationspuffer eingestellt und je 100  $\mu\text{l}$  mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Prokoagulationspuffer wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen und gebundener Faktor Va bestimmt.

### 3.6.3.6.3 Messung des Faktors Xa

Humaner Faktor Xa wurde zuerst direkt mit FITC konjugiert. Dazu wurden 1 mg Faktor Xa mit 0,5 mg FITC an Celite in TBS-Puffer gelöst und bei mäßigem Schütteln für 24 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde der mit FITC-konjugierte Faktor Xa von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt.

Die Endkonzentration an zugesetztem FITC-FXa betrug 1 U/ml (das entspricht 1 µg/ml). Zusätzlich wurden 1 U/ml Faktor Va (unkonjugiert) zugesetzt. Die Vorinkubation mit den Zellen betrug 5 min. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/µl mit Prokoagulationspuffer eingestellt und je 100 µl mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl Prokoagulationspuffer wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen und gebundener Faktor Xa quantitativ bestimmt.

### 3.6.3.7 Phosphorylierung von VASP

Kommt es bei Thrombozyten zu einer Aktivierung und Formänderung, erfolgt eine Phosphorylierung des Vasodilator-stimulierten Proteins (VASP). Um den Phosphorylierungszustand von VASP im Inneren der Thrombozyten zu bestimmen, wurde ein spezifischer Antikörper ins Zellinnere gebracht. Dazu wurden die Plättchen nach der Aktivierung und Fixierung mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 500 µl 0,4 % Triton X-100 in PBS als Detergenz versetzt. Nach Waschen mit PBS und Abnahme des Überstandes wurde die Zellsuspension mit dem monoklonalen anti VASP Antikörper (Klon VASP-16C2) in einer Sättigungskonzentration von 5 µg/ml für 30 min inkubiert. Die Proben wurden nach einem Waschschrift anschließend mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper, anti-Maus-IgG (1:100), für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben durchflusszytometrisch vermessen.

### 3.6.3.8 Messung von Thrombozytenmikropartikeln

Bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Zell-Zell-Kontakt können Mikropartikel entstehen. Diese Vesikelbildung nimmt aktivierungsabhängig zu. Die gebildeten Thrombozytenmikropartikel wurden in Durchflusszytometer durch Eingrenzen der intakten Zellen und der kleineren entstandenen Partikel prozentual bestimmt.



### 3.6.3.9 Spaltung von GPIb $\alpha$ infolge der Plättchenaktivierung

Der Plättchenglykoproteinkomplex GPIb/V/IX, der Rezeptor für den vWF, spielt in der frühen Phase der Hämostase eine wichtige Rolle. Kommt es im Gerinnungssystem zur Freisetzung einer bislang unbekannt Protease, kann diese unter anderem das Glykoprotein Ib $\alpha$  und das Glykoprotein V spalten. Dabei entstehen Glykoproteinfragmente, deren physiologische Bedeutungen bislang unerkannt sind.

Thrombozyten wurden mit PBS auf eine Zellzahl von 25.000/ $\mu$ l eingestellt und nach Aktivierung mit unterschiedlichen Agonisten und Vorinkubation mit variierenden Antagonisten fixiert. Nach dem Waschen der Zellsuspension wurde der monoklonale anti GPIb Antikörper (Klon SZ2) zugegeben (Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml) und für 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG (1:100) für 1 h bei Raumtemperatur markiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung von Bindungsstellen für Klon SZ2 auf dem GPIb $\alpha$ .

### 3.6.3.10 Spaltung von GPV infolge der Plättchenaktivierung

Thrombozyten wurden mit PBS auf eine Zellzahl von 25.000/ $\mu$ l eingestellt und nach Aktivierung mit unterschiedlichen Agonisten und Vorinkubation mit variierenden Antagonisten fixiert. Nach dem Waschen der Zellsuspension wurde der monoklonale anti GPV Antikörper (Klon SW16) zugegeben (Endkonzentration 0,25  $\mu$ g/ml) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ wurde der anti GPV Antikörper (Klon GPV<sub>s-fl</sub>) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml für 1 h bei RT zugegeben. Die Proben wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG (1:100) für 1 h bei Raumtemperatur markiert. Einem erneuten Waschschrift erfolgte die Quantifizierung der Bindungsstellen für die beiden Primärantikörper im Durchflusszytometer.

### 3.6.3.11 Assoziatbildung der Thrombozyten mit Monozyten

Thrombozyten wurden mit PBS-Puffer auf 30.000/ $\mu$ l, die Zellkonzentration der Monozyten mit HBSS-Puffer auf 3.000/ $\mu$ l eingestellt. Zu den Thrombozyten wurde der monoklonale, Thrombozyten-spezifische anti GPIX Antikörper (Klon Beb1) in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml, der mit PerCP konjugiert war, zugesetzt. Die Monozyten wurden mit einem monoklonalen, Monozyten-spezifischen, PE-konjugierten anti CD 14 Antikörper (Klon M $\Phi$ P9) in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml markiert, der FITC konjugiert war.

100 µl der eingestellten Thrombozyten wurden aktiviert, fixiert, gewaschen und zu 100 µl der elutrierten Monozyten gegeben. Die Inkubationszeit betrug bei RT 20 min. Zu den Proben wurde schließlich 500 µl PBS-Puffer gegeben und die Assoziatbildung im Durchflusszytometer quantifiziert.

### **3.6.4 Nachweis der Monozytenaktivierung**

#### **3.6.4.1 Bindung des Fibrinogens**

Die Anbindung dieses Adhäsionsmoleküls wurde analog, wie für Thrombozyten beschrieben (Kap. 3.6.3.1) durchgeführt. Die Endkonzentration an FITC-Fibrinogen in der Zellsuspension betrug ebenfalls 150 µg/ml, die Inkubationszeit mit den Monozyten 5 min.

#### **3.6.4.2 Bindung des TSP-1**

FITC-TSP-1 (s. Kap. 3.6.3.5.1) wurde der Monozytensuspension in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Die Vorinkubationszeit mit den Zellen betrug 5 min.

#### **3.6.4.3 Tissue Faktor Expression**

Monozyten exprimieren nach Aktivierung Tissue Faktor, den primären Initiator der Hämostase, und präsentieren ihn auf der Oberfläche. Zum Nachweis dieses Faktors wurden Monozyten für 20 min mit einem Agonisten aktiviert. Die Aktivierung erfolgte unter kräftigem Schütteln. Den unfixierten Proben wurden in einer gesättigten Konzentration der monoklonale anti Tissue Faktor Antikörper (Klon 4508CJ) zugegeben, für 15 min unter kräftigem Schütteln inkubiert, 500 µl PBS-Puffer zugegeben und der Tissue Faktor durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **3.6.4.4 Bindung des Faktors VIIa**

An den Oberflächen-gebundenen Tissue Faktor bindet der Faktor VIIa. Dieser wurde direkt mit FITC konjugiert. Dazu wurden 4,8 mg (das entspricht 240.000 IE) zu einer 1 mg/ml Suspension in destilliertem Wasser gelöst und mit 1,25 mg FITC an Celite für 16 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde der mit FITC-konjugierte Faktor VIIa von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt. Mit einer Endkonzentration von 150 µg/ml wurde der Faktor zu der Monozytensuspension gegeben, 5 min vorinkubiert und dessen aktivierungsabhängige Anbindung durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.6.4.5 Detektion der gebildeten Monozytenmikropartikel**

Bei der Monozytenaktivierung entstehen analog zur Thrombozytenaktivierung Zell-Mikropartikel. Diese Vesikelbildung nimmt aktivierungsabhängig zu.

Monozyten wurden in beschriebener Weise aktiviert. Die unfixierten, mit PE-konjugierten, anti CD14 Antikörper markierten Zellen wurden im Durchflusszytometer detektiert und kleinere Mikropartikel in prozentualer Korrelation zu den intakten Monozyten durch Eingrenzen nach der Größe quantifiziert.

## **3.7 Elektrophorese**

Bei dem Elektrophoreseverfahren nach Laemmli (1970) werden Proteine nach Ladung und Größe getrennt, da ein Protein im angelegten elektrischen Feld zu der ihm entgegengesetzt geladenen Elektrode wandert. Je größer das Verhältnis von Ladung zu Masse ist, desto schneller bewegt es sich. Als Matrix für die Gelelektrophorese wird Polyacrylamid verwendet, welches durch Zusatz von Bisacrylamid quervernetzt. In Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Dieses anionische Detergenz, das auch die Tertiärstruktur der Proteine zerstört, bindet an die Oberfläche der Proteine und überdeckt deren Eigenladung. Die aufgetrennten Proteine können über verschiedene Detektionsverfahren qualifiziert werden.

### **3.7.1 Durchführung der Elektrophorese**

Das Gel für die Elektrophorese besteht aus Trenn- und Sammelgel. Das Trenngel bestand in dieser Arbeit aus 7,5 % Acrylamid mit einem Zusatz von 0,2 % Bisacrylamid. Zur Gewährleistung einer geraden Geloberfläche wurde das gegossene Trenngel mit destilliertem Wasser überschichtet, bis es vollständig polymerisiert war. Nach Entfernen des Wassers wurde ein 4,5 % acrylamidhaltiges Sammelgel aufgegeben und ein Probenkamm eingesetzt. Die Polymerisationsreaktion im Trenn- und Sammelgel wurde durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator Tetramethyldiamin (TEMED) gestartet.

Zur Auftrennung von Proteinproben im nicht-reduzierten Zustand wurde pro 100 µl Proteinprobe in Auftragspuffer 10 µl einer 40 mM NEM-Lösung gegeben. Diese Lösung wurde für 5 min gekocht und nach dem Abkühlen für 10 min mit je 5 µl einer 14 mM Bromphenolblau (BPB)-Lösung inkubiert.

Zur Auftrennung der Proteinproben im reduzierten Zustand, bei der die Disulfidbrücken aufgebrochen werden, wurde zu je 100 µl Proteinprobe in Auftragspuffer 5 µl einer 200 mM DTE-Lösung gegeben und für 5 min bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden erneut 5 µl der DTE-Lösung zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Zum Wegfangen nicht umgesetzter DTE-Moleküle wurden pro 100 µl Probe 10 µl einer 778 mM Iodacetamid (IAA)-Lösung zugegeben und für 15 min inkubiert.

Zur Korrelation der unterschiedlich weit gewanderten Proteine wurde in eine Gelspur ein Molekulargewichtsstandard gegeben, der für die Proteindetektion durch Silberfärbung unkonjugiert und für die Proteindetektion auf einem Western-Blot biotinyliert war.

Nach der Aufgabe der Proteinproben in die Sammelgeltaschen wurde an das Gel eine Stromstärke von 15 mA angelegt. Sobald die Bromphenolblaubande in das Trenngel gewandert war, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Hatte die Markierungsbande den Boden des Trenngels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet und entweder das Gel für mindestens 1 h in Methanol-Essigsäure-Lösung fixiert, oder zum Western-Blotting direkt weiterverwendet.

#### Lösungen:

Trenngel-Puffer pH 8,8	SDS Tris/HCl	7 mM 750 mM
Sammelgel-Puffer pH 6,8	SDS Tris/HCl	7 mM 250 mM
Radikalstarter-Lösung	APS	0,092 mM

Trenngel (7,5%)	Acrylamid (30 %)- Bisacrylamid (0,8 %)	15 ml
	Trenngel-Puffer	30 ml
	Aqua bidestillata	13 ml
	TEMED	30 µl
	Radikalstarter-Lösung	2 ml

Sammelgel (4,5%)	Acrylamid (30 %)-	3,8 ml
	Bisacrylamid (0,8 %)	
	Sammelgel-Puffer	12,5 ml
	Aqua bidestillata	7,9 ml
	TEMED	30 µl
	Radikalstarter-Lösung	825 µl
Auftrags-Puffer	Harnstoff	8 M
	Tris/HCl	100 mM
	SDS	70 mM
DTE-Lösung	DTE	200 mM
	in Auftragspuffer	
IAA-Lösung	IAA	778 mM
	in Auftragspuffer mit BPB	7 mM
BPB-Lösung	BPB	14 mM
	in Auftragspuffer	
NEM-Lösung	NEM	40 mM
	in PBS-Puffer	
Gelfixier-Lösung	Methanol	12,5 M
	Essigsäure (konz.)	1,7 M

### 3.7.2 Silberfärbung der Proteine

Die Proteinbandenmuster nach SDS-PAGE wurden nach der Methode von Blum et al (1987) detektiert. Bei dieser Methode wird die Reduktion der Silberkationen zu elementarem Silber unter dem Einfluss der Proteine durch Entwicklung ausgenutzt, die Proteinbanden werden braun, grau oder schwarz.

Dazu wird das fixierte Gel (Trenngel) nach der SDS-PAGE dreimal in einer Ethanol-Lösung gewaschen und anschließend mit Thiosulfatlösung einminütig inkubiert, um eine

Hintergrundfärbung zu verhindern. Dem Entfernen des Thiosulfat durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser folgte eine 20 min Inkubation mit Silbernitratlösung. Vor Zugabe der Entwicklerlösung wurde nochmals dreimal mit Wasser gewaschen. Nach ausreichender Entwicklung wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendet. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach einem Fixierungsschritt mit Foto-Fix (Tetanal, Norderstedt) für 10 min und Waschen für 30 min in Wasser wurde das Gel für 2 h bei 80° C im Gelrockner 543 (Bio Rad, München) getrocknet.

#### Lösungen:

Ethanol-Lösung:	Ethanol	6,522 M
Thiosulfatlösung:	Thiosulfat	80 mM
Silbernitratlösung:	Silbernitrat	12 mM
	Thiosulfat	0,016 mM
	Formaldehyd	5 mM
Entwicklerlösung:	Natriumcarbonat	566 mM
	Thiosulfat	0,016 mM
	Formaldehyd	5 mM
Stopplösung:	EDTA	13 mM
Foto-Fixierlösung:	Foto-Fix	10 %

### **3.7.3 Das Western-Blot Verfahren**

Das Blotting nennt man den Transfer und Immobilisierung von großen Molekülen auf die Oberfläche einer immobilisierten Membran. Diese Methode erweitert die Nachweismöglichkeit für elektrophoretisch getrennte Fraktionen, weil die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle von SDS befreit und frei zugänglich für großmolekulare Liganden, wie Antigene oder Antikörper, werden können. Als Membran kann Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrocellulose verwendet werden. Nach dem Transfer auf die Membran können dann spezifisch gesuchte Proteine angefärbt werden.

Benutzt man eine PVDF-Membran, muss diese auf Grund ihrer Hydrophobie durch 10 min Waschen in 96 % Ethanol benetzbar gemacht werden, da beim Blotting hydrophile Lösungen benutzt werden. Das Ethanol wird anschließend durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt und vor dem Start des Blotting die Blotmembran in Blotpuffer für 10 min getränkt. Wird eine Nitrocellulose-Membran gebraucht, wird diese für 10 min ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Auf 2 Lagen Blot-Papier (Whatman, England) wurde die Membran gelegt, darauf das Gel, und darauf erneut 2 Lagen Blot-Papier. Dieser Aufbau wurde mit 2 Schaumstoffplatten ummantelt, zwischen zwei Kunststoffgitter gelegt und fixiert. Dabei war auf Luftblasen zu achten und diese gegebenenfalls zu entfernen. Dieser Versuchsaufbau, auch „Sandwich“ genannt, wurde mit der Membran in Richtung Anode in einen Blottank gehängt, der mit Blotpuffer gefüllt war. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde entweder bei einer Stromstärke von 300 mA für 16 h, oder bei einer Stromstärke von 1,5 A für 1,5 h durchgeführt. Dabei musste mit Kühlung gearbeitet werden, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

#### Lösungen:

Blot-Puffer	Tris/HCl	20 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %

#### **3.7.3.1 Proteinfärbung über alkalische Phosphatase-Konjugate nach dem Blotting-Verfahren**

Die auf die Membrane transferierten Proteine wurden mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen humane Thrombozytenantigene nachgewiesen. Nach der Anbindung der Primäantikörper wurden Sekundäantikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren, behandelt. Über ein 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz/p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Substrat (BCIP/NBT) reagierte die alkalische Phosphatase zu einem violetten Komplex, der die gesuchten Proteine sichtbar machte.

Die Membranen wurden nach dem Blotting dreimal in PBS/Tween 20 für 10 min gewaschen. Die nicht abgesättigten Bindungsstellen auf den Membranen wurden durch Behandlung mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA) für mindestens 1 h geblockt. Nach erneutem Waschen der Membranen, diesmal in PBS/Tween 20/Ziegeneserum (NGS, Gibco, Eggenstein), wurde mit

dem jeweiligen Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden hier verwendet:

Monoklonaler anti TSP-1 Antikörper (Klon 2126-332) in einer Konzentration von 1 µg/ml, polyklonaler anti GPV Antikörper (selbst hergestellt) in einer Verdünnung von 1:500 und polyklonaler anti GPIb Antikörper (von Prof. Clemetson, Bern) in einer Verdünnung von 1:1000, polyklonaler anti TSP-1 Antikörper in einer Verdünnung 1:500.

Nach der Inkubationszeit wurde nicht angebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBS/Tween 20/NGS entfernt. Anschließend wurde für 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert. Dabei wurden monoklonale Maus-Primärantikörper mit anti Maus-IgG-alkalische Phosphatase-Zweitantikörper (1:1000 in PBS/Tween 20) inkubiert und polyklonale Kaninchen-Primärantikörper mit anti Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Zweitantikörper (1:500 in PBS/Tween 20) inkubiert. Die biotinylierten Referenzmarkerproteine wurden mit Avidin-alkalischer Phosphatase (1:2000 in PBS/Tween 20) konjugiert.

Nach dreimaligem Waschen in PBS/Tween 20/NGS wurde die Substratlösung auf die Membrane gegeben und die Reaktion nach Anfärbung durch Waschen in destilliertem Wasser gestoppt. Die Membranen wurden anschließend getrocknet.

#### Lösungen:

PBS/Tween 20-Lösung	Tween20 in PBS-Puffer, pH 7,4	0,05 %
PBS/Tween 20/NGS-Lösung	NGS Tween20 in PBS-Puffer, pH 7,4	1 % 0,05 %
Blockierungs-Puffer	BSA in PBS/Tween 20	3 %
BCIP-Stammlösung	BCIP in Dimethylformamid (DMF, 70 %ig)	1,5 %



NBT-Stammlösung	NBT in Dimethylformamid (DMF, 70 %ig)	3 %
Carbonat-Puffer pH 9,8	Natriumhydrogencarbonat Magnesiumchlorid	100 mM 1 mM
Substratlösung :	NBT-Lösung BCIP-Lösung in Carbonat-Puffer	1 % (v/v) 1 % (v/v)

### 3.8 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des gesamten Proteingehalts einer Probe erfolgte mit Hilfe des BCA (Bicinchoninic Acid)-Tests nach der Methode von Smith et al (1985) und Wiechelmann et al (1988). Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure bildet mit Cu-Ionen, die von den Aminosäuren Serin, Cystein oder Threonin der Proteine von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden, in alkalischer Lösung einen farbigen Komplex. Dieser Farbkomplex wurde bei 562 nm photometrisch detektiert und mittels einer Standardkurve graphisch der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe errechnet. Es wurde ein BCA-Kit (Pierce, Niederlande) verwendet. Dabei wurden je 25  $\mu\text{l}$  Proteinstandard mit BSA-Konzentrationen zwischen 25 und 800  $\mu\text{g/ml}$ , bzw. von Proben unbekannter Konzentration, mit je 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz auf einer Mikrotiterplatte inkubiert und für 30 min bei 37°C reagieren gelassen. In einem „ELISA-Reader“ wurden anschließend die Proben photometrisch gemessen. Anhand der Extinktion der Standardlösungen wurde eine Standardkurve erstellt und mit der erhaltenen Geradengleichung die Konzentrationen der zu bestimmenden Proteinproben ermittelt.

#### Lösungen:

BSA-Standardlösung:	Rinderserumalbumin Natriumchlorid Natriumazid	2 % 155 mM 8 mM
BCA-Testreagenz A:	Natriumcarbonat Bicinchoninsäure Natrium-Tartrat	Konzentrationen unbekannt: Kit-Zusammensetzung

BCA-Testreagenz B:	Kupfersulfat	128 mM
BCA-Reagenzlösung:	BCA-Testreagenz A:	98 % (v/v)
	BCA-Testreagenz B:	2 % (v/v)

### 3.9 Proteinreinigungsverfahren

#### 3.9.1 Aufreinigung des humanen TSP-1

Thrombozyten wurden aus „buffy coats“ gewaschen (s. Kap. 3.4.2) und nach Isolierung mit Thrombin aktiviert (Saglio and Slayter, 1982). Bei der danach angewandten Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose wird die hohe Affinität des TSP-1 für Heparin ausgenutzt. Mit einem NaCl-Gradienten wurde das Thrombospondin dann zuerst von anderen Proteinen, die bei der Aktivierung sezerniert wurden, und anschließend vom Heparin getrennt.

Aus 40 „buffy coats“ wurden 90 % aller Thrombozyten gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Plättchen-Pellet in insgesamt 70 ml Aggregationspuffer resuspendiert und der pH Wert auf 7,6 eingestellt, einem pH-Wert, bei dem Thrombin, mit dem die Aggregation ausgelöst wurde, sein Wirkungsoptimum besitzt. Mit 2,4 U/ml  $\alpha$ -Thrombin (Rind, Sigma, Deisenhofen) wurden die Thrombozyten bei 37°C für 10 min aktiviert und aggregiert. Um anschließend aktives Thrombin zu binden und die Aktivität des Thrombin zu hemmen wurden 12 U/ml Hirudin (rekombinant, Loxo, Dossenheim) zugegeben, damit Thrombin nach der Spaltung von Fibrinogen nicht das TSP-1 angreift. Die Aggregate wurden bei 1000 g für 10 min bei 20°C abzentrifugiert und der Überstand für mindestens 20 min bei -80°C eingefroren, um das entstandene Fibringerinnsel nach dem Wiederauftauen abzutrennen.

Eine anschließende 30 min Zentrifugation bei 80.000 g und 4°C wurde zur Entfernung des Membranskeletts und entstandener Plättchenmikropartikel durchgeführt. Der Überstand wurde auf eine mit Hapes/Tyrode-Puffer äquilibrierten Heparin-Sepharose-Säule (Pierce, Niederlande) aufgetragen und nach dem Einlaufen der Proteinsuspension diese erneut äquilibriert. Mit einer Pumpengeschwindigkeit von ca. 0,7 ml/min wurden drei NaCl-

Stufengradienten in aufsteigender Konzentration eingesetzt. Die NaCl-Konzentration betrug zuerst 0,25 M, dann 0,35 M und schließlich 0,6 M in Hepes/Tyrode-Puffer.

Bei jedem Isolierungsschritt und auch bei der Äquilibrierung wurde den Puffern 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, und zur Protease-Inhibierung 2 µM Leupeptin und 2,5 mM PMSF (nur bei den ersten beiden Elutionsschritten) zugesetzt. Die je 1 ml eluierten Fraktionen des 0,6 M NaCl-Gradienten wurden gelelektrophoretisch untersucht (s. Kap. 3.7), die Fraktionen mit dem aufgereinigten TSP-1 vereinigt, umgepuffert (Vivaspin 30.000 D, Sartorius, Göttingen), so dass die NaCl-Konzentration bei 150 mM lag und bei -80°C gelagert.

#### Lösungen:

Aggregationspuffer: pH 7,6	Natriumchlorid	150 mM
	Tris/HCl	20 mM
	D(+)-Glukose	5 mM
	Calciumchlorid	2 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM
Äquilibrierungspuffer pH 7,4	Natriumchlorid	154 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	0,42 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
Zusatz:	PMSF	5 mM
	Leupeptin	2 µM
Elutionspuffer : pH 7,4	Natriumchlorid	1. 250 mM
	Natriumchlorid	2. 350 mM
	Natriumchlorid	3. 600 mM
	Tris/HCl	20 mM
	D(+)-Glukose	5 mM
	Calciumchlorid	2 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM

### 3.9.2 Reinigung von humanem GPV und GPIb $\alpha$

Die Aufreinigung der Glykoproteine V und Ib $\alpha$  (Spaltprodukt Glykocalicin) erfolgte nach Bienz et al (1986). Thrombozyten aus ca. 40 „buffy coats“ wurden gewaschen (s. Kap. 3.4.2) und in Mes-Puffer aufgenommen. Ein Drittel dieser Suspension wurde auf 4°C abgekühlt und 2 min lang mit einem Ultraschallgerät (Branson Son Power, Danbury, Conn) beschallt (Duty Cycle: 50%, Micro Tip Limit Output Control: 7), um aktivierende Proteasen freizusetzen. Diese beschallten Plättchen (1/3) wurden zu den übrigen ruhenden Plättchen (2/3) gegeben und mit einer Endkonzentration von 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub> für 20 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Aktivierung wurden sowohl PMSF, als auch N-Ethylmaleimid (NEM) zugegeben. Diese Suspension wurde 30 min bei 80.000 g ultrazentrifugiert, um vorhandene Zytoskelettproteine und aus Plättchen beim Aktivierungsprozess entstandene Membranpartikel zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und zur Komplexierung der Calcium-Ionen mit EDTA (Endkonzentration 5 mmol/L) versetzt. Zum Abtrennen des ausfallenden Feststoffes wurde erneut bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Chromatographie aufgetrennt (Bienz et al 1986).

Weizenkeimagglutinin (Wheat germ agglutinin) ist ein Lektin, das N-Acetylglucosamin und Sialinsäure erkennt. Glykoproteine mit solchen Zuckerresten, wie GPV und GPIb $\alpha$ , werden an dieses Lektin gebunden. WGA-Sepharose-4B, aufgenommen in TBS-Puffer, wurde in eine silanisierte Glassäule (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) gegeben und mit TBS-Puffer äquilibriert. Der „Aktivierungs-Überstand“ wurde auf das Säulenmaterial gegeben. Nach anschließender Äquilibration mit TBS-Puffer erfolgte die Elution mit 2,5 % N-Acetylglucosamin in TBS-Puffer. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 6 ml/h, die Fraktionen hatten ein Volumen von 1 ml. Die Proteine wurden durch Erfassung der Extinktion bei 280 nm mit einer optischen Einheit detektiert.

An einen Ionenaustauscher, der aus einer unlöslichen Matrix besteht, sind unterschiedlich geladene Gruppen kovalent gebunden. Diese geladenen Gruppen sind mit mobilen Gegenionen assoziiert. Sie können reversibel gegen andere Ionen derselben Ladung ausgetauscht werden, ohne die Matrix zu verändern. DEAE-Sephacel ist ein solcher Anionenaustauscher.

Die GPV und GPIb $\alpha$ -haltigen Elutionsfraktionen aus der Lektin-Affinitätschromatographie wurden vereinigt und auf die DEAE-Sephacel-Säule gegeben. Zur Elution wurde ein 0-0,7 mol/L NaCl-Gradient in Äquilibrationpuffer angelegt. Das GPV-Fragment wurde bei einer

Konzentration von 0,1-0,2 mol/l NaCl von der Säule eluiert (Bienz et al 1986), das stärker anbindende Glykocalicin zwischen 0,3 und 0,5 M NaCl. Um die NaCl-Konzentration auf unter 20 mmol/L zu bringen, wurden die gesammelten Fraktionen mit einem Volumen von 24 ml auf 1:25 verdünnt und danach erneut auf die Säule gegeben. Das Aufgabevolumen betrug 600 ml.

Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht (s. Kap. 3.7) und qualifiziert. Die GPV-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die GPI $\beta$ -haltigen Fraktionen wurden ebenfalls vereinigt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Lösungen:

Mes-Puffer: pH 6,5	2-[N-Morpholino]- ethansulfonsäure (Mes) D(+)-Glukose Natriumchlorid	10 mM  4,8 mM 147 mM
TBS-Puffer pH 7,4	Natriumchlorid Tris/HCl	154 mM 50 mM
Elutionspuffer 1	TBS-Puffer Natriumchlorid	 - - -
Elutionspuffer 2	TBS-Puffer ( s. oben) Natriumchlorid	 700 mM

### **3.10 ELISA-Verfahren**

Mit dem hochsensitiven ELISA- („enzyme-linked-immunosorbent-assay“) Verfahren ist es möglich, Antigene und/oder Antikörper im Nanogramm-Bereich nachzuweisen. Dazu werden Antigene oder Antikörper an der Bodenfläche einer ELISA-Platte, den so genannten „wells“, immobilisiert, an welche die gesuchten Proteine spezifisch anbinden können. An die so immobilisierten Substanzen werden Antikörper-Enzymkomplexe gebunden und nach folgender Chromogen-Farbreaktion kann die Menge der nachzuweisenden Proteine, oder eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung, photometrisch bestimmt werden (Engvall et al 1971; Van Weeman und Schuurs 1971; Avrameas und Guilbert 1971).

An eine Streptavidin-beschichtete ELISA Platte wurde pro Vertiefung mit je 100 µl biotinylierten TSP-1 Peptid (RFYVVMWK) in PBS-Puffer (Konzentration 1 µg/ml) für 1 h bei RT behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden die freien Bindungsstellen mit je 200 µl 3 % BSA-Lösung für 1 h geblockt. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer wurden je 100 µl TSP-1 in unterschiedlichen Konzentrationen in PBS-Puffer (+ 2 mM Ca<sup>2+</sup>-Zusatz) aufgegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 100 µl des polyklonalen anti TSP-1 Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 aufgegeben und für 1 h inkubiert. Einem erneuten Waschschrift erfolgte die Aufgabe von je 100 µl anti Kaninchen Antikörper, Peroxidase konjugiert, in einer Verdünnung von 1:1000. Nach weiterem Waschen wurden je 100 µl der Substratlösung zugegeben. Die enzymatische Peroxidase-Umsetzung des Substrats o-Phenylendiamin (OPD) ergab mit Wasserstoffperoxid eine gelb/orange Farbreaktion. Nach Farbumsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gestoppt und bei 490 nm im ELISA-Reader photometrisch analysiert.

#### Lösungen:

PBS-Puffer	s. Kap. 3.4.4	
Blockierlösung:	BSA	3 % (w/v)
	in PBS-Puffer, pH 7,4	
Waschpuffer:	Tween 20	0,05 %
	in PBS-Puffer, pH 7,4	
Substratlösung:	Citronensäure	0,1 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 % (w/v)
	p-Phenylendiamin	0,4 % (w/v)
Stopplösung:	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 N

### **3.11 Statistische Absicherung der experimentellen Daten**

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse durch den Vergleich der Mittelwerte (sowohl für die Aggregometrie als auch für die Durchflusszytometrie) wurde der t-Test für ungepaarte Daten verwendet. Die Signifikanzen wurden mit dem Programm Sigma Stat 2.0 berechnet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Einfluss des Thrombospondin-1 auf die Aktivierung der Blutplättchen durch Heparin**

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Heparin-Wirkung auf Thrombozyten durch das Heparin-bindende TSP-1 beeinflusst wird.

TSP-1 wird während der Plättchensekretion aus den  $\alpha$ -Granula in das Blut freigesetzt und kann an die Membran aktivierter Plättchen zurück binden. Es hat jedoch eine Domäne, die mit hoher Affinität an Heparin bindet. Heparine, eingesetzt zur Prophylaxe von Thrombosen, haben die Nebenwirkung, dass sie Thrombozyten aktivieren und dabei auch TSP-1 freisetzen können.

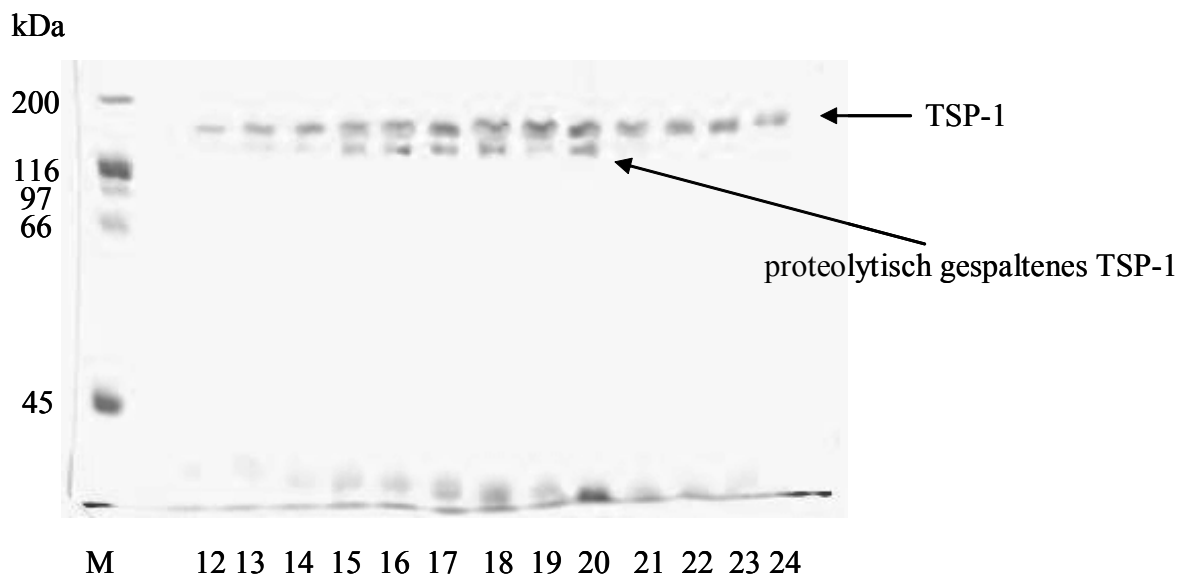
Wir stellten die Arbeitshypothese auf, dass das aus Thrombozyten freigesetzte TSP-1 die Aktivierung der Thrombozyten durch Heparin beeinflusst. Daher wurde zuerst TSP-1 aus humanen Thrombozyten angereichert und zur Verwendung für die Untersuchungen weiter gereinigt.

#### **4.1.1 Aufreinigung von humanem Thrombospondin-1**

Die Eigenschaft an Heparin zu binden, wurde bei der Aufreinigung des TSP-1 ausgenutzt.

Durch Gelfiltration wurden Thrombozyten von Plasmaproteinen getrennt und die gereinigten Thrombozyten aktiviert. Der Aktivierungsüberstand enthielt, wie erwartet, große Mengen an TSP-1, das über Heparin-Affinitätschromatographie weiter angereichert wurde (Abb. 4.1.1.1). Silberfärbung der Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE zeigte nur geringe Beimengungen von Fremdproteinen, während bei einer aparenten molekularen Masse von 180 kDa deutlich eine TSP-1 Bande zu sehen war.

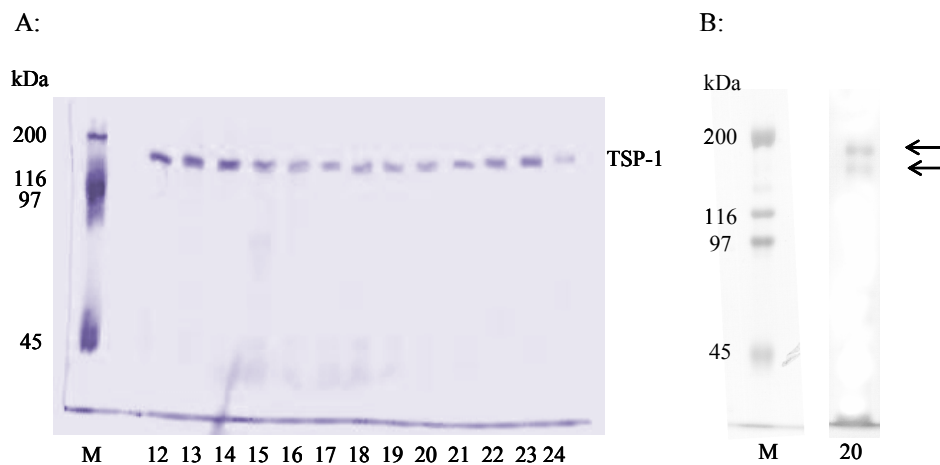




**Abb. 4.1.1.1: TSP-1 und ein proteolytisches Fragment von TSP-1 konnten nach Affinitätschromatographie aus dem Überstand aktivierter Thrombozyten angereichert werden.**

Thrombospondin-1 in einer SDS-PAGE (7,5% Acrylamid); Silberfärbung. Aufgetragen wurden die Fraktionen 12 – 24 nach Heparin-Affinitätschromatographie (Elution mit 0,6 M NaCl). M, Molekulargewichtsmarker. Aufgegeben wurden 12  $\mu$ l je Fraktion pro Spur, reduzierendes Gel.

Unterhalb der TSP-1 Bande war eine zweite Bande sichtbar (Abbildung 4.1.1.1).



**Abb. 4.1.1.2: Durch Markierung mit einem monoklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in Abb. 4.1.1.1 dargestellten Protein um TSP-1 handelt. Markierung mit einem polyklonalen Antikörper zeigte, dass die Proteinbande unterhalb der TSP-1 ein Abbauprodukt des TSP-1 ist.**

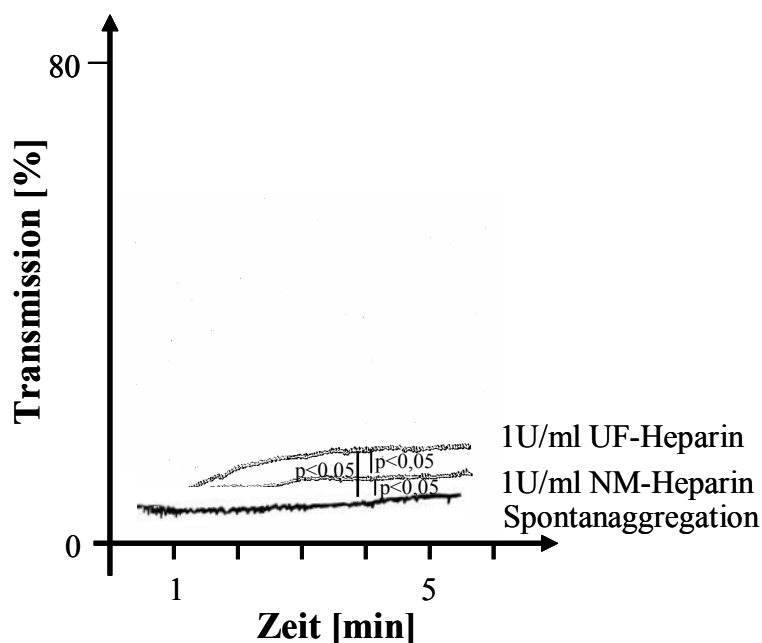
Western Blot von Thrombospondin-1. Aufgetragen wurden die Fraktionen 12 – 24 (A) nach Heparin-Affinitätschromatographie (Elution mit 0,6 M NaCl). M, Molekulargewichtsmarker. Aufgegeben wurden 12  $\mu$ l jeder Fraktion pro Spur, die Proben wurden reduziert behandelt. Die Proteine wurden mit 1  $\mu$ g/ml des monoklonalen Antikörpers 2126-332 (A), bzw. 5  $\mu$ g/ml eines polyklonalen anti TSP-1 Antikörpers (B) markiert und durch Anfärbung mit alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht.

Durch Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Abbauprodukt von TSP-1 handelt.

Abbildung 4.1.1.2 A zeigt einen Western Blot nach SDS-PAGE mit dem monoklonalen anti TSP-1 Antikörper (Klon 2126-332). Man erkennt auf dem Western Blot die Homologie der Proteinbanden zum Gel. Die Abbaubande trägt das Epitop für den Antikörper 2126-332 nicht, daher ist hier nur das vollständige Molekül zu erkennen. Abb. 4.1.1.2 B zeigt einen Western Blot nach SDS-PAGE mit einem polyklonalen anti TSP-1 Antikörper. Es ist neben dem gesamten TSP-1 Molekül auch das proteolytisch gespaltene Abbauprodukt zu erkennen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Fraktionen wurden die reinsten und höchstkonzentriertesten Proben vereinigt, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus 40 frischen „buffy coats“ wurden bis zu 15 mg intaktes TSP-1 aufgereinigt.

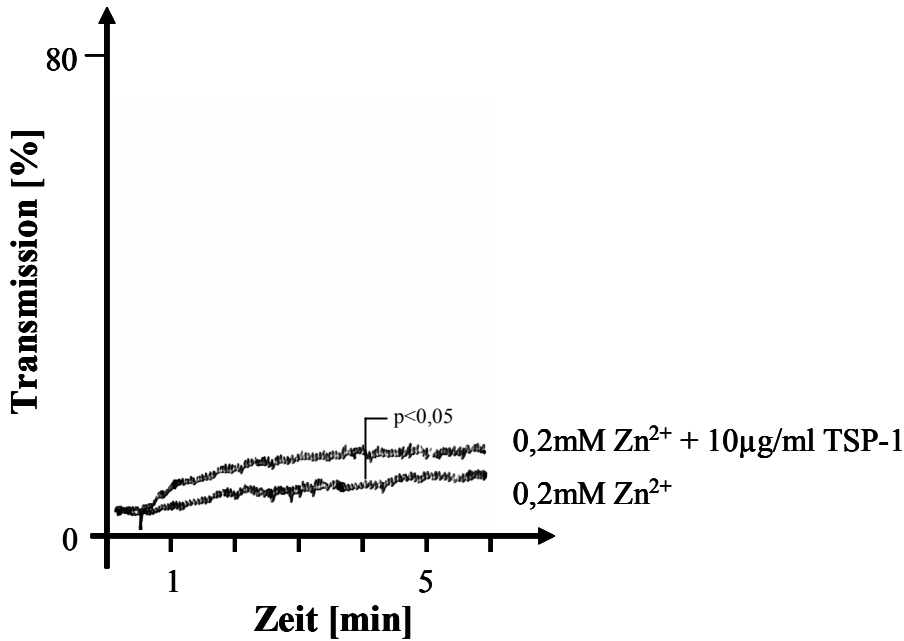
#### 4.1.2 Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Heparin induzierte Plättchenaggregation

Für die Messung der Aktivierung von Thrombozyten im Aggregometer wurden gelfiltrierte Thrombozyten verwendet.



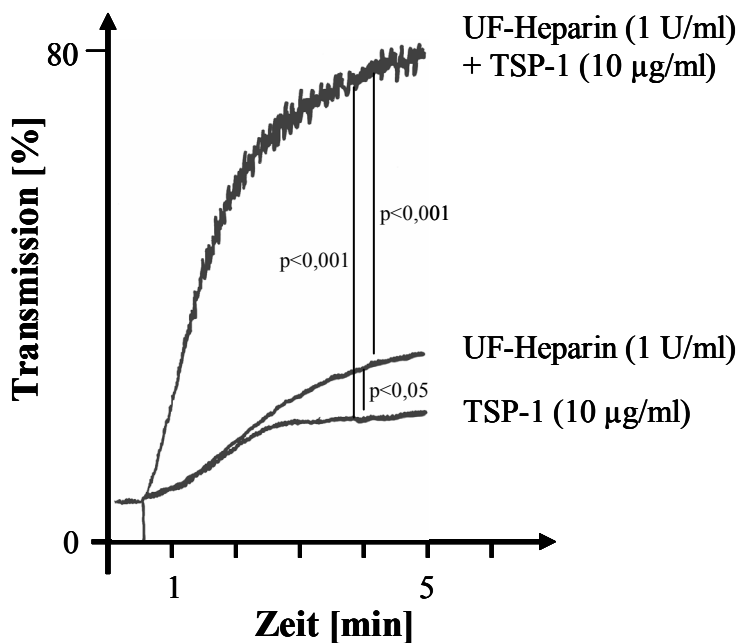
**Abb. 4.1.2.1: Gelfiltrierte durch  $\text{Zn}^{2+}$ -voraktivierte Thrombozyten aggregieren durch Zusatz von UF- und NM-Heparin.** Aggregationskurven gelfiltrierter Thrombozyten, die mit unfraktioniertem Heparin (UF- Heparin, 1 U/ml) und niedermolekularem Heparin (NM-Heparin, 1 U/ml) in Anwesenheit von  $0,2 \text{ mM } \text{Zn}^{2+}$  versetzt wurden,  $n=3$ . Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Leicht voraktivierte Plättchen, hier durch  $\text{Zn}^{2+}$ -Gabe hergestellt, werden durch Heparin geringfügig aggregiert. Dabei ist die aggregierende Wirkung von unfraktioniertem Heparin (UF-Heparin) größer als die von niedermolekularem Heparin (NM-Heparin).



**Abb. 4.1.2.2: Mit  $Zn^{2+}$ -voraktivierte, gefilterte Thrombozyten zeigen eine leichte Aggregation durch TSP-1 Zusatz.** Aggregationskurven gefilterter Thrombozyten, die mit TSP-1 ( $10\mu\text{g/ml}$ ) und  $0,2\text{ mM } Zn^{2+}$  oder nur mit  $0,2\text{ mM } Zn^{2+}$  versetzt wurden,  $n=3$ .

TSP-1 Zusatz zu  $Zn^{2+}$ -voraktivierten Plättchen löste ebenfalls eine ganz geringfügige Plättchenaggregation aus. Aufgrund der nur geringen Unterschiede wurde keine dosisabhängige TSP-1 Zugabe durchgeführt.



**Abb. 4.1.2.3: Gleichzeitige Gabe von TSP-1 und UF-Heparin zu  $Zn^{2+}$ -voraktivierten Plättchen löst eine vollständige Thrombozytenaggregation aus.** Aggregationskurven gefilterter Thrombozyten, die mit UF-Heparin ( $1\text{ U/ml}$ ) und TSP-1 ( $10\mu\text{g/ml}$ ) in Anwesenheit von  $0,2\text{ mM } Zn^{2+}$  versetzt wurden. Zur Kontrolle wurden die Reagenzien einzeln auf ihre aggregierenden Eigenschaften getestet,  $n=3$ . Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Bei gleichzeitiger Gabe von TSP-1 und Heparin (in den oben genutzten Konzentrationen) zu  $Zn^{2+}$ -voraktivierten Plättchen wurde eine vollständige Aggregation ausgelöst. Sowohl die Wirkung von UF-Heparin, als auch die von NM-Heparin wurde durch TSP-1 Zusatz deutlich verstärkt.

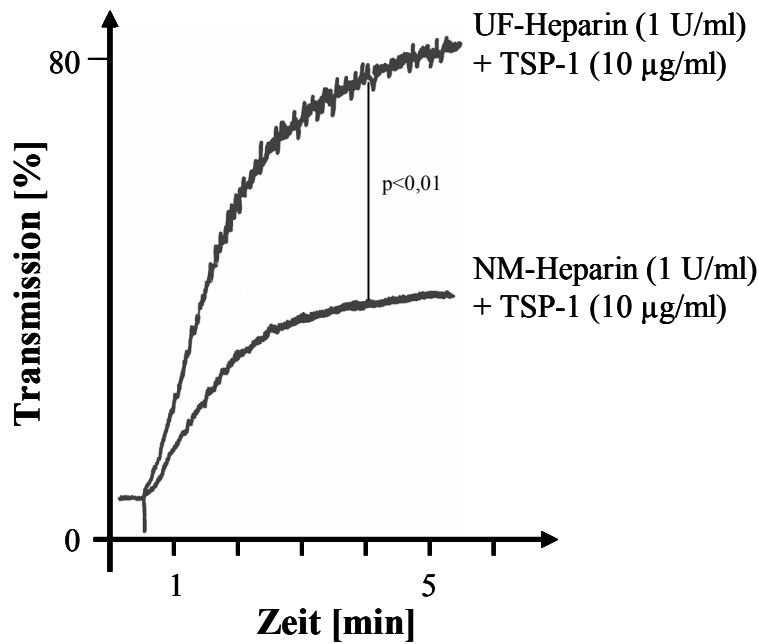


Abb. 4.1.2.4: Gleichzeitige Gabe von TSP-1 und UF-Heparin hat eine stärkere Thrombozyten-aggregierende Wirkung als die gleichzeitige Gabe von TSP-1 und NM-Heparin auf  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Thrombozyten. Aggregationskurven gefilterter Thrombozyten, die in Gegenwart von 0,2 mM  $Zn^{2+}$  und 10 µg/ml TSP-1 mit UF- oder NM-Heparin versetzt wurden, n=3.

Es wurde weiter untersucht, ob der Zusatz von TSP-1 zu voraktivierten Plättchen und gleichzeitiger Gabe von Heparin zu einer dosisabhängigen Aggregation führte.

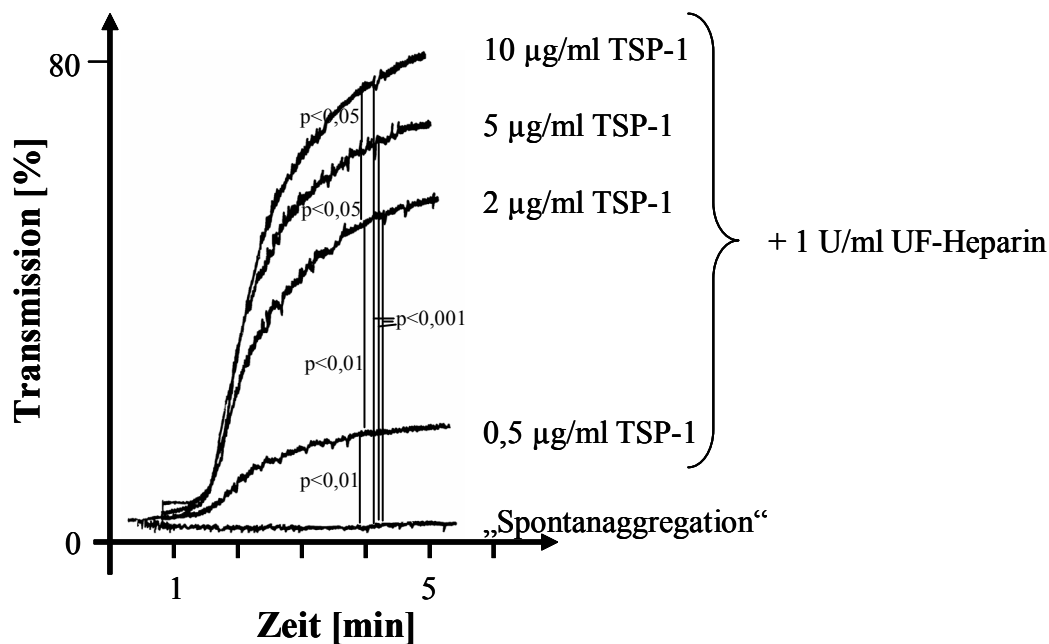


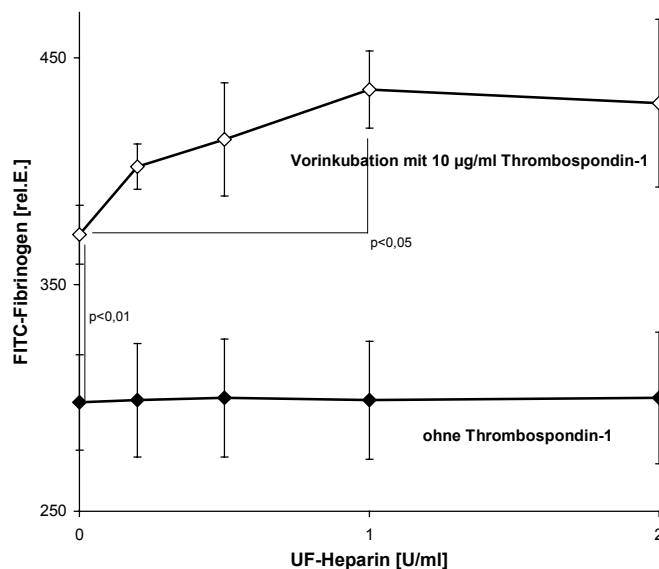
Abb. 4.1.2.5: Zusatz von TSP-1 zu  $Zn^{2+}$ -voraktivierten Plättchen bei gleichzeitiger Gabe von UF-Heparin führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Aggregation. Aggregationskurven von gefilterten Thrombozyten in Gegenwart von 0,2 mM  $Zn^{2+}$  und 1 U/ml UF-Heparin. Als Negativkontrolle wurde die Spontanaggregation der Thrombozyten getestet. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Die aggregationssteigernde Wirkung des TSP-1 ist abhängig von der Konzentration des zugesetzten Thrombospondins und erreicht bei 10 µg/ml seine maximale Wirkung.

#### 4.1.3 Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten

UF-Heparin allein konnte die Grundanbindung des Fibrinogens nicht steigern. In Voruntersuchungen mit Plättchen von Patienten, die keinen Fibrinogenrezeptor haben, wurde gezeigt, dass diese Grundanbindung der unspezifischen Anbindung entspricht.

Der Zusatz von TSP-1 (10 µg/ml) führte schon ohne Heparin zu einer initialen Fibrinogen Bindung, die dann durch Heparin dosisabhängig gesteigert werden konnte (Abb. 4.1.3.1)



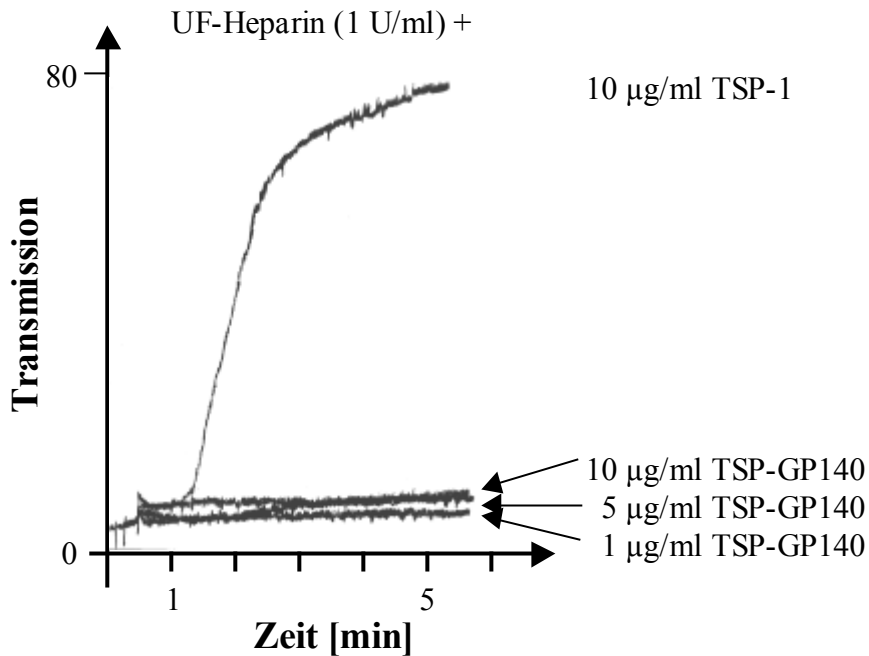
**Abb. 4.1.3.1: Vorinkubation mit TSP-1 führt zu einer gesteigerten Fibrinogen Bindung an gelfiltrierte,  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Plättchen. Durch Zusatz von Heparin wird diese Fibrinogen Bindung weiter gesteigert. Heparin-TSP-1**

induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen (25.000/µl). 150 µg/ml FITC-konjugiertes Fibrinogen, 0,2 mM  $Zn^{2+}$  und 10 µg/ml TSP-1 wurden mit den Thrombozyten für 2 min vorinkubiert und anschließend Heparin in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Aktivierungszeit 30 min. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

#### 4.1.4 Ist die Heparin-Bindungsdomäne des Thrombospondin-1 für die Wirkung von TSP-1 auf die Heparin induzierte Aggregation verantwortlich?

Um die Bedeutung der TSP-1-Heparin Domäne zu testen, wurde rekombinantes TSP-1 benutzt, welchem diese Domäne fehlte (rek. TSP-1 hergestellt in Insekten-Zellen, Protein Science, Meriden, USA, TSP-GP140).

Die oben beschriebenen Wirkungen des TSP-1 konnten durch dieses N-terminal verkürzte TSP-1 nicht mehr ausgelöst werden, wie Abb. 4.1.4.1 zeigt.



**Abb. 4.1.4.1: N-terminal verkürztes TSP-1 kann zusammen mit UF-Heparin gelfiltrierte, mit  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Plättchen nicht aggregieren.**

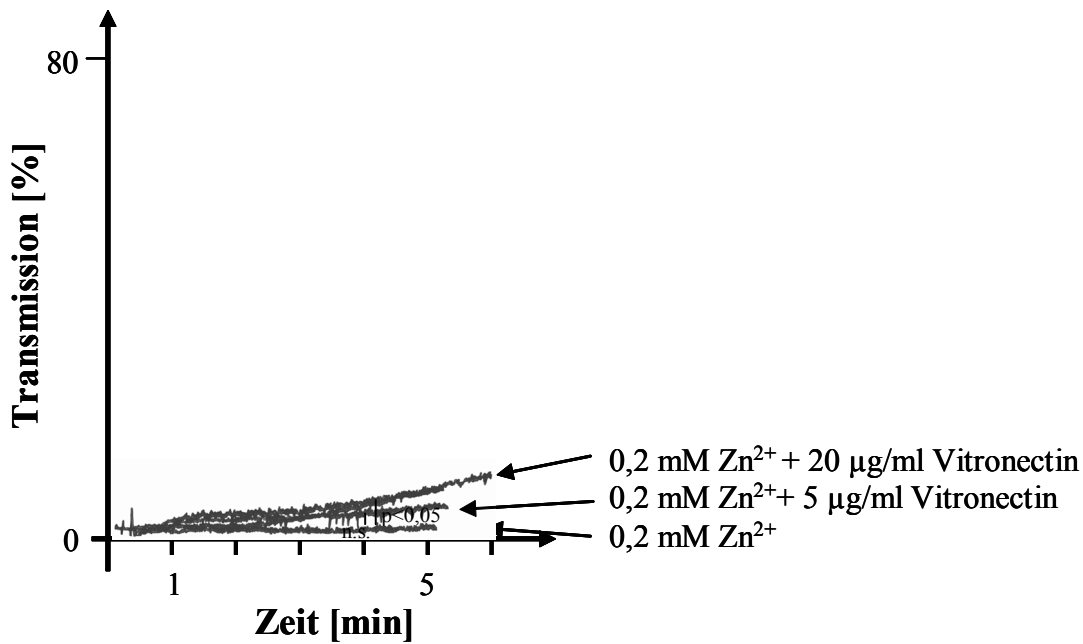
Aggregationskurven gelfiltrierter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM  $Zn^{2+}$  und 1 U/ml UF-Heparin. Als Positivkontrolle wurden 10 µg/ml TSP-1 zugesetzt, n=3.

TSP-GP140, rekombinantes TSP-1 ohne Heparin-Bindungsdomäne, konnte mit Heparin keine Plättchenaggregation  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen auslösen.

#### **4.1.5 Kann die durch Zugabe von Thrombospondin-1 plus Heparin induzierte Plättchenaggregation inhibiert werden?**

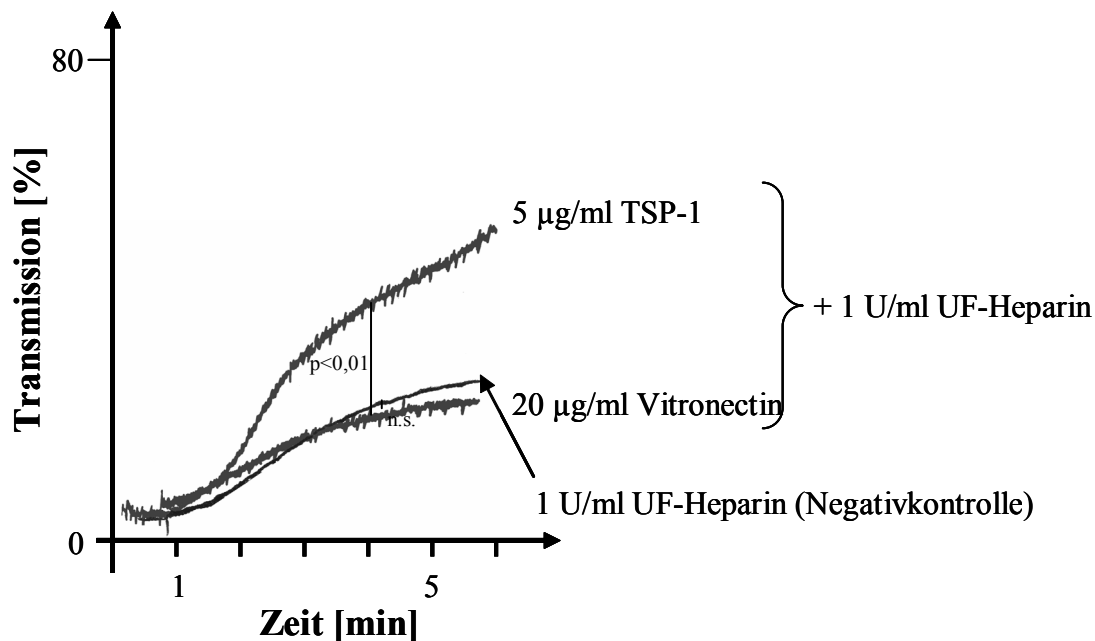
##### **4.1.5.1 Einfluss von Vitronectin**

Ein anderes extrazelluläres Matrixprotein mit ähnlichen Eigenschaften wie TSP-1 ist das Vitronectin. Es kommt im Plasma vor und bindet an Heparin mit hoher Affinität. Es wurde geprüft, ob Vitronectin, wie TSP-1, die Heparin induzierte Plättchenaggregation verstärkt.



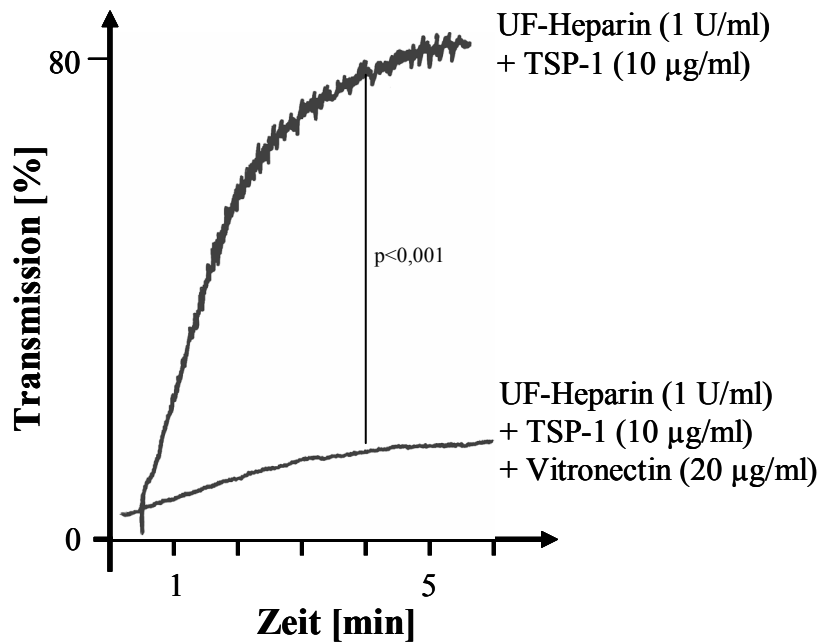
**Abb. 4.1.5.1: Vitronectin löst nur in höheren Konzentration eine geringfügige Aggregation Zn<sup>2+</sup>-voraktivierter Plättchen aus.** Aggregationskurven gefilterter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM Zn<sup>2+</sup>. In Konzentrationen von 5 und 20 µg/ml wurde rekombinantes Vitronectin zugegeben und auf aggregierende Eigenschaft untersucht, n=3. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Wie TSP-1 löste auch Vitronectin selbst bei Zugabe zu Zn<sup>2+</sup>-voraktivierten Plättchen nur eine ganz schwache Aggregation aus.



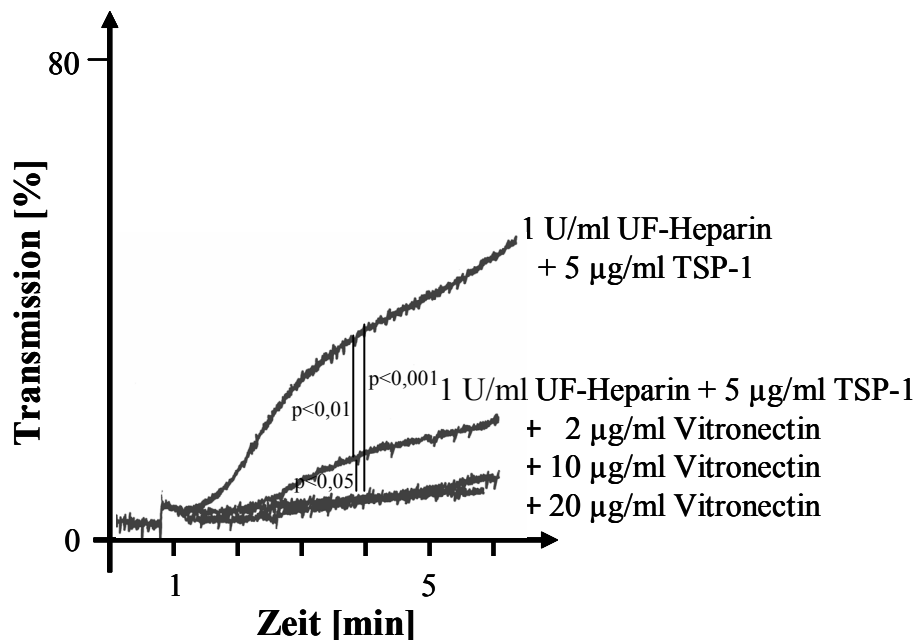
**Abb. 4.1.5.2: Vitronectin verstärkt nicht die Heparin induzierte Aggregation Zn<sup>2+</sup>-voraktivierter Plättchen.** Aggregationskurven gefilterter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM Zn<sup>2+</sup>. Zu 1 U/ml UF-Heparin wurden entweder 5 µg/ml TSP-1 oder 20 µg/ml rekombinantes Vitronectin gegeben, n=3. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Vitronectin Zusatz in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  verstärkt jedoch im Gegensatz zu TSP-1 die Heparin induzierte Aggregation  $\text{Zn}^{2+}$ -voraktivierter Plättchen nicht.



**Abb. 4.1.5.3: Vitronectin hemmt die Steigerung der Heparin induzierten Aggregation  $\text{Zn}^{2+}$ -voraktivierter Plättchen durch TSP-1.** Aggregationskurven gelfiltrierter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM  $\text{Zn}^{2+}$ . Zu 1 U/ml UF-Heparin und 10  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 wurden 20  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantes Vitronectin gegeben, n=3.

Dagegen hemmte Vitronectin in dieser Konzentration eingesetzt die durch 10  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 erzielte Steigerung der Heparin induzierten Plättchenaggregation vollständig.



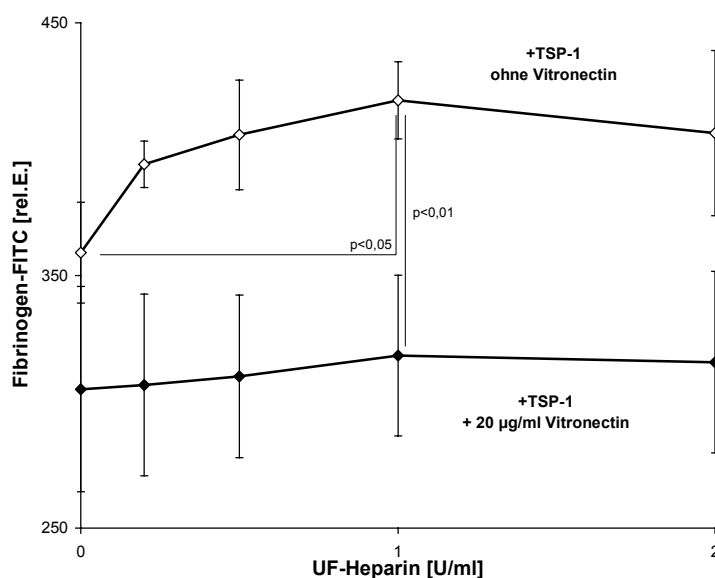
**Abb. 4.1.5.4: Vitronectin inhibiert dosisabhängig die durch Heparin und TSP-1 induzierte Aggregation  $\text{Zn}^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.** Aggregationskurven gelfiltrierter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM  $\text{Zn}^{2+}$ . Zu 1 U/ml UF-Heparin und 5  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 wurden 2, 10 oder 20  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantes Vitronectin gegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.



Die inhibierende Wirkung des Vitronectins ist dosisabhängig, wie Abb. 4.1.5.4 zeigt.

#### 4.1.6 Beeinflusst Vitronectin die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen?

Analog zu den Inhibitionsversuchen bei der Plättchenaggregation wurde der Einfluss von Vitronectin auf die TSP-1 vermittelte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten untersucht. Wie bei den Aggregationsversuchen wurde eine vollständig inhibierende Wirkung durch Vitronectin beobachtet.



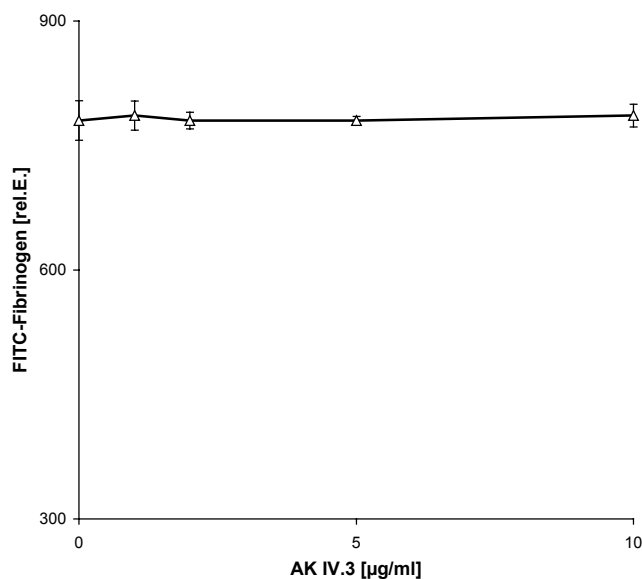
**Abb. 4.1.6.1: Vitronectin inhibiert die durch Zusatz von TSP-1 induzierte Steigerung der Fibrinogen Bindung an  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Plättchen, sowie die durch Heparin-Zusatz induzierte Steigerung der Fibrinogen Bindung.** Heparin und TSP-1 induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen ( $25.000/\mu\text{l}$ ).  $150 \mu\text{g/ml}$  FITC-konjugiertes Fibrinogen,  $0,2 \text{ mM } Zn^{2+}$  und  $10 \mu\text{g/ml}$  TSP-1 wurden mit den Thrombozyten für 2 min vorinkubiert. Einfluss von  $20 \mu\text{g/ml}$  Vitronectin, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane ( $n=3$ ).

Zusatz von  $20 \mu\text{g/ml}$  Vitronectin hob die Steigerung der Fibrinogen Bindung durch  $10 \mu\text{g/ml}$  TSP-1 vollständig auf (Abb. 4.1.6.1).

#### 4.1.7 Bedeutung des Fc-Rezeptors für die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Plättchenaktivierung

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es nach Heparin-Gabe durch Heparin Antikörperkomplexe vermittelt über den Fc-Rezeptor der Thrombozyten zu einer Plättchenaggregation kommen. Thrombozyten präsentieren einen Fc-Rezeptor auf der

Oberfläche, den FcRIIA. FcRIIA kann Plättchen auf zwei Arten aktivieren. Der erste Mechanismus läuft über die Bindung des Fc-Teils des Immunglobulins an den FcRIIA und des Fab-Teils an bestimmt definierte Antigene auf demselben oder einem weiteren Plättchen. Der zweite Mechanismus der Aktivierung involviert die Quervernetzung der FcRIIA-Rezeptoren auf ein und demselben Plättchen. Um die Bedeutung des Fc-Rezeptors bei der durch TSP-1 plus Heparin induzierten Plättchenaktivierung zu verstehen, wurde der Einfluss des Fc-Rezeptor blockierenden Antikörpers Klon IV.3 untersucht.



**Abb. 4.1.7.1: Fc-Rezeptor Blockade hatte keinen Einfluss auf die TSP-1-Heparin induzierte Fibrinogen Bindung  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.** Heparin und TSP-1 induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen (25.000/µl). Der Vorinkubation von 150 µg/ml FITC-Fibrinogen zu den Thrombozyten folgte die 30 min Aktivierung mit 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10 µg/ml TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin. Die Plättchen wurden mit dem anti Fc-Rezeptor Antikörper Klon IV.3 in einem Konzentrationsbereich von 0-10 µg/ml für 10 min vorinkubiert, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

Wie Abbildung 4.1.7.1 zeigt, hatte diese Blockade keinen Einfluss auf die TSP-1 plus Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten.

#### **4.1.8 Wird die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen durch den Heparin-bindenden Rezeptor GPIb vermittelt?**

Quervernetzen von Membranglykoproteinen ist oft Auslöser einer Plättchenaktivierung. Sowohl TSP-1 als auch Heparin können an das Glykoprotein Ib binden. Es sollte daher geprüft werden, ob die oben beschriebene durch TSP-1 plus Heparin induzierte Fibrinogen Bindung über ein Quervernetzen von GPIb Rezeptoren ausgelöst wird. Um die Frage zu beantworten, ob die TSP-1 plus Heparin induzierte Fibrinogen Bindung durch den

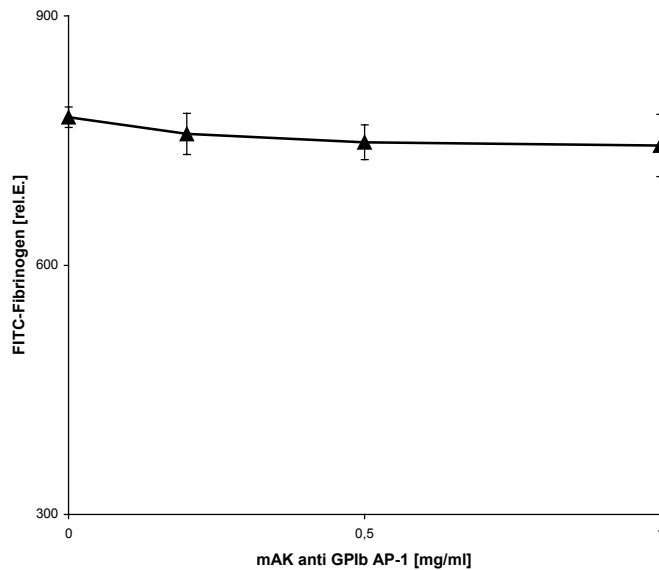
Heparin-bindenden Rezeptor GPIb vermittelt wird, wurde lösliches GPIb, Glykocalicin, in Konzentrationen bis 1  $\mu\text{M}$  den Versuchsansätzen zugesetzt.



**Abb. 4.1.8.1: Lösliches GPIb $\alpha$ , Glykocalicin, hatte keinen Einfluss auf die Heparin und TSP-1 induzierte Fibrinogen Bindung  $\text{Zn}^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.** Heparin-TSP-1 induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen (25.000/ $\mu\text{l}$ ). Der Gabe von 150  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen-FITC zu den Thrombozyten folgte die Aktivierung mit 0,2 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 und 1U/ml UF-Heparin. Vorinkubation der Plättchen mit Glykocalicin in einem Bereich von 0-1  $\mu\text{M}$ , die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

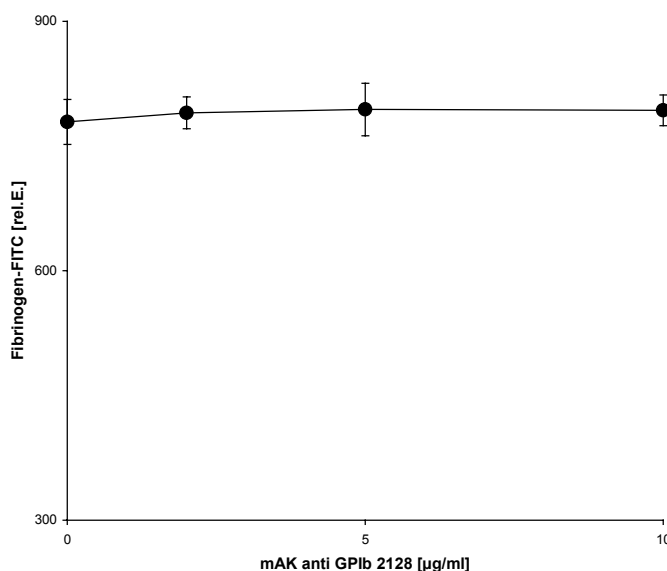
Es konnte kein Einfluss von Glykocalicin auf die TSP-1 plus Heparin vermittelte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten festgestellt werden (Abbildung 4.1.8.1).

Auch zwei monoklonale Antikörper gegen GPIb, welche die GPIb vermittelte Plättchenadhäsion an TSP-1 vollständig hemmen, hatten keinen Einfluss auf die TSP-1 plus Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen (Abbildungen 4.1.8.2 und 3). Bei Zugabe der monoklonalen Antikörper wurde der Fc-Rezeptor durch Inkubation mit dem Klon IV.3 blockiert, der selber keine Wirkung auf die Aktivierung hatte (s. Kap. 4.1.7).



**Abb. 4.1.8.2: Der monoklonale anti GPIb Antikörper (Klon AP-1), der die GPIb vermittelte Plättchenadhäsion an TSP-1 vollständig hemmt, hatte keinen Einfluss auf die TSP-1 und Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Plättchen.** TSP-1 und Heparin induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen (25.000/ $\mu$ l). Neben 150  $\mu$ g/ml FITC-Fibrinogen wurden die Thrombozyten mit 10  $\mu$ g/ml

Klon IV.3 für 10 min inkubiert. Die Plättchen wurden mit 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10  $\mu$ g/ml TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin aktiviert. Vorinkubation der Thrombozyten mit dem anti GPIb Antikörper Klon AP-1 in einem Konzentrationsbereich von 0-1 mg/ml, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

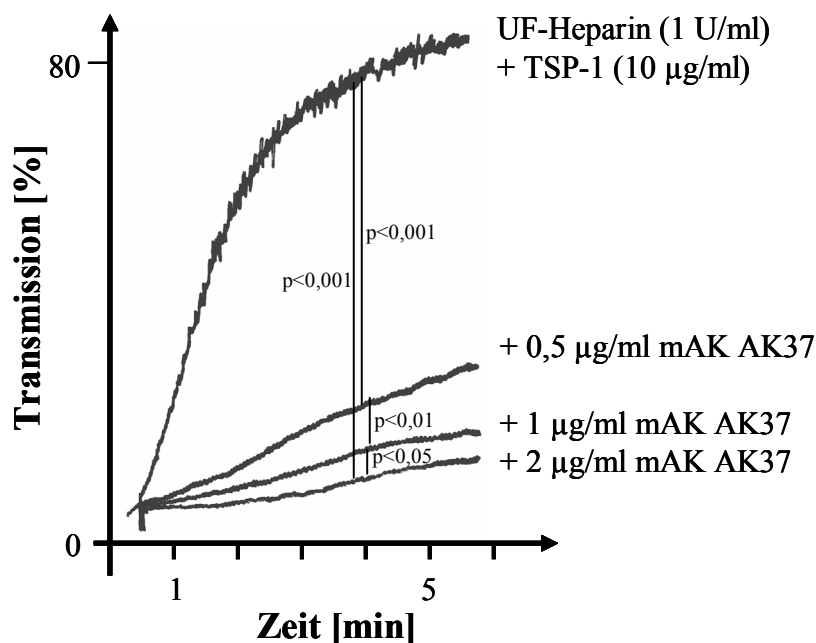


**Abb. 4.1.8.3: Der monoklonale anti GPIb Antikörper (Klon 2128), der die GPIb vermittelte Plättchenadhäsion an TSP-1 vollständig hemmt, hatte keinen Einfluss auf die TSP-1 und Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an  $Zn^{2+}$ -voraktivierte Plättchen.** Heparin-Thrombospondin induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen (25.000/ $\mu$ l). Neben 150  $\mu$ g/ml FITC-Fibrinogen wurden die Thrombozyten mit 10  $\mu$ g/ml Klon

IV.3 für 10 min inkubiert Die Plättchen wurden mit 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10  $\mu$ g/ml TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin aktiviert. Vorinkubation der Thrombozyten mit dem anti GPIb Antikörper Klon 2128 in einem Konzentrationsbereich von 0-10 mg/ml, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

#### 4.1.9 Wird die Plättchenaggregation, die durch Zugabe von Thrombospondin-1 plus Heparin ausgelöst wird, durch den TSP-1 Rezeptor CD36 vermittelt?

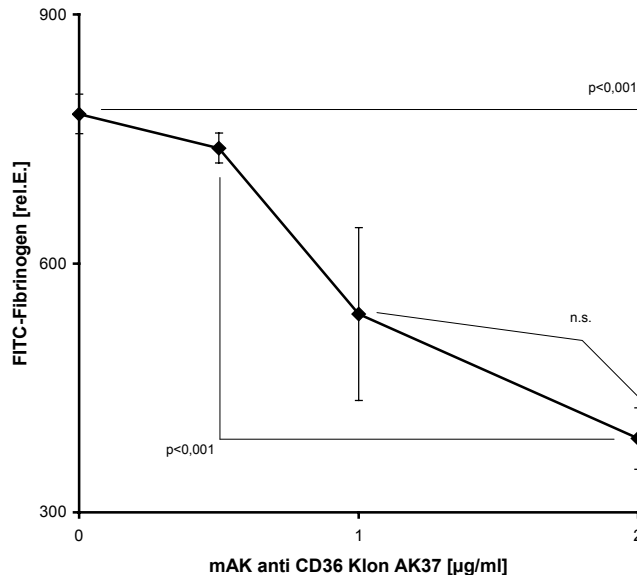
Zahlreiche TSP-1 mediierte Zellreaktionen werden über Quervernetzung von CD36 ausgelöst. Daher wurde geprüft, ob ein monoklonaler Antikörper gegen CD36 die TSP-1/Heparin induzierte Plättchenaggregation inhibieren konnte. Da anti CD36 IgG-Antikörper über eine Fc-vermittelte Reaktion Plättchen aktivieren können, wurde der Fc-Rezeptor für diese Versuchsreihen blockiert, der selber keinen Einfluss auf die Aktivierung hatte (s. Kap. 4.1.7).



**Abb. 4.1.9.1: Blockade der TSP-1 Bindungsstelle auf CD36 durch den monoklonalen anti CD36 Antikörper (Klon AK37) inhibierte die Heparin und TSP-1 induzierte Aggregation  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.** Aggregationskurven gefilterter Plättchen in Gegenwart von 0,2 mM  $Zn^{2+}$  und 10 µg/ml Klon IV.3. Zu 1 U/ml UF-Heparin und 10 µg/ml TSP-1 wurde der monoklonale Antikörper gegen CD36 (Klon AK37) in Konzentrationen von 0,5, 1 oder 2 µg/ml gegeben, n=3. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nach einer Aggregationszeit von 4 min berechnet.

Die Fc-Rezeptor Blockade hatte keinen Einfluss auf die TSP-1 plus Heparin induzierte Plättchenaggregation  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen, wie der Vergleich der Aggregationskurven mit UF-Heparin (1 U/ml) + TSP-1 (10 µg/ml) in den Abbildungen 4.1.2.3 und 4.1.9.1 zeigt. Blockade von CD36 durch den monoklonalen Antikörper Klon AK37 dagegen inhibierte die TSP-1 ausgelöste Steigerung der Heparin induzierten Plättchenaggregation dosisabhängig.

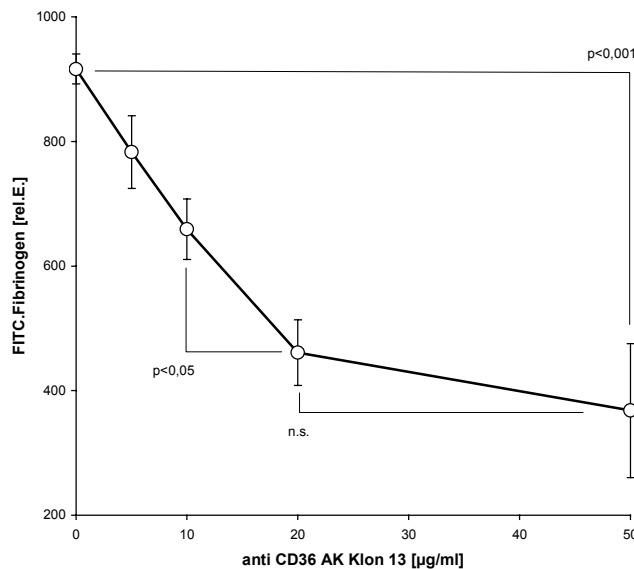
#### 4.1.10 Wird die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen durch CD36 vermittelt?



**Abb. 4.1.10.1: Blockade der TSP-1 Bindungsstelle auf CD36 durch den monoklonalen anti CD36 Antikörper (Klon AK37) inhibierte die Heparin und TSP-1 induzierte Fibrinogen Bindung  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.**

Heparin und TSP-1 induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen ( $25.000/\mu\text{l}$ ). Die Thrombozyten wurden für 10 min mit anti Fc-Rezeptor AK IV.3 vorinkubiert. 150  $\mu\text{g/ml}$  FITC-konjugiertes Fibrinogen, 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 und

1 U/ml UF-Heparin wurden mit den Thrombozyten für 1 min vorinkubiert. Einfluss des anti CD36 Antikörpers Klon AK37 in einem Konzentrationsbereich von 0-2  $\mu\text{g/ml}$ , die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).



**Abb. 4.1.10.2: Blockade der TSP-1 Bindungsstelle auf CD36 durch den monoklonalen anti CD36 Antikörper (Klon AK13) inhibierte die Heparin und TSP-1 induzierte Fibrinogen Bindung  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.**

Heparin-TSP-1 induzierte FITC-Fibrinogen Bindung an Plättchen ( $25.000/\mu\text{l}$ ). Die Thrombozyten wurden für 10 min mit anti Fc-Rezeptor AK IV.3 vorinkubiert. 150  $\mu\text{g/ml}$  FITC-konjugiertes Fibrinogen,

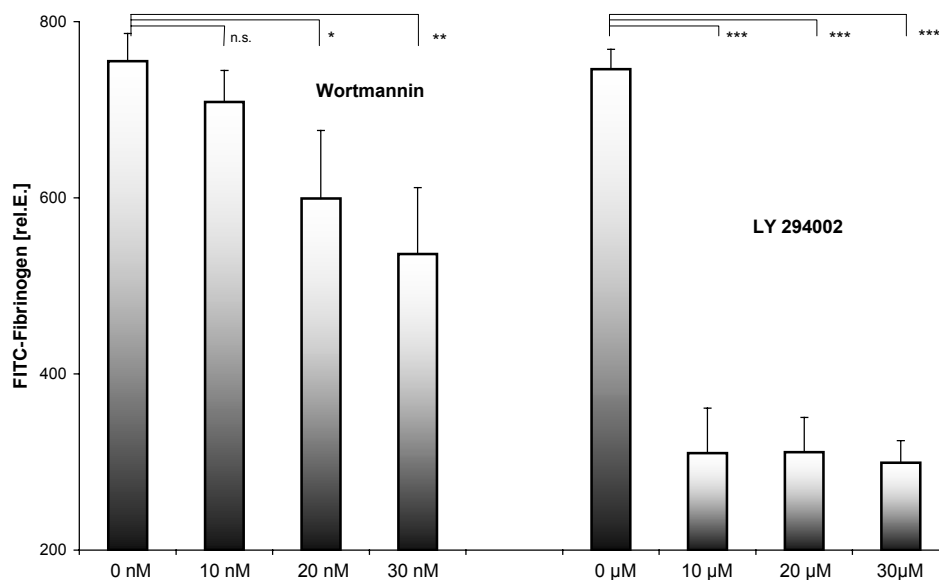
0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin wurden mit den Thrombozyten für 1 min vorinkubiert. Einfluss des anti CD36 Antikörpers Klon 13 in einem Bereich von 0-50  $\mu\text{g/ml}$ , die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

Blockade von CD36 durch die beiden monoklonalen anti CD36 Antikörper Klon 37 und Klon 13 führte, analog zu den Ergebnissen bei den Aggregationsversuchen, zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung (Abb. 4.1.10.1 und 2).

Die TSP-1 plus Heparin vermittelte Fibrinogen Bindung konnte durch CD36 Blockade bis auf das Niveau der unspezifischen Anbindung vollständig inhibiert werden.

#### 4.1.11 Kann die Thrombospondin-1/Heparin induzierte Fibrinogen Bindung durch Inhibierung von Signaltransduktionswegen gehemmt werden?

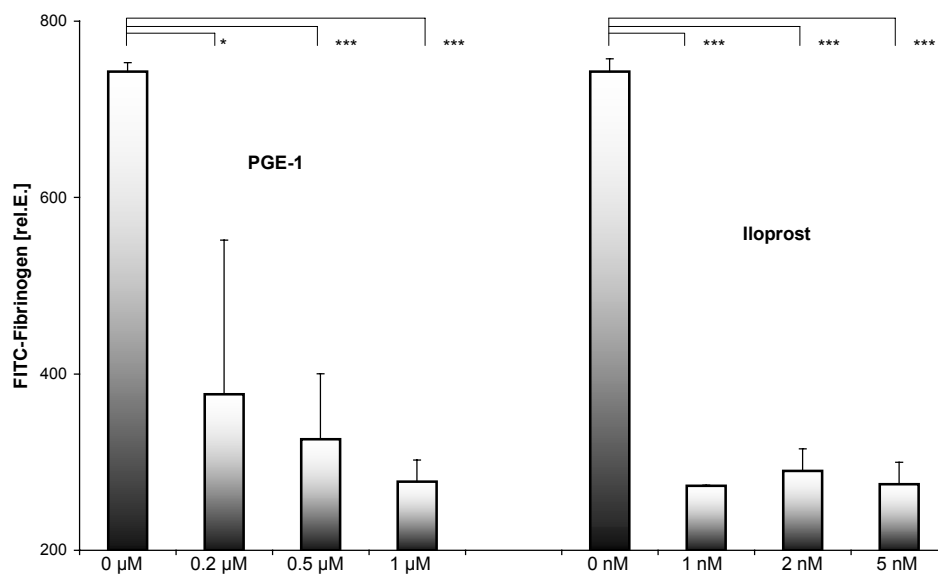
Um zu verstehen, ob die Aggregation der Thrombozyten durch TSP-1 und Heparin abhängig von Signaltransduktionswegen ist, wurden PI-3 Kinase Inhibitoren vor Aktivierung zugesetzt. Die PI-3 Kinase (Phosphoinositid-3 Kinase) spielt eine wichtige, aber noch nicht vollständig bekannte Rolle in der Plättchenaktivierung. Sie ist eine intrazelluläre Lipidkinase, die Phosphoinositide an einer Position des Inositolrings phosphoryliert. Inhibieren kann man die PI-3 Kinase durch Vorinkubation der Zellen mit Wortmannin oder LY 294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-1(4H)-benzopyran-4 Hydrochlorid). In Abb. 4.1.11.1 erkennt man, dass die Heparin plus TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung durch beide PI-3 Kinase Inhibitoren dosisabhängig gehemmt werden konnte.



**Abb. 4.1.11.1: Hemmung der PI-3 Kinase hemmt die Heparin und TSP-1 induzierten Aktivierung  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen.** Die Thrombozyten wurden mit 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10 μg/ml TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin aktiviert. Vorinkubation mit 0-20 nM Wortmannin oder 0-50 μM LY294002, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

n.s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ein Anstieg der cAMP oder cGMP in Plättchen führt physiologischer Weise zu einer Verminderung der Plättchenaktivierung. Substanzen wie Prostaglandin E1, oder das ebenfalls im experimentellen Ansatz benutzte, stabile Prostacyclin-Analogon Iloprost, fördern die Synthese von cAMP durch die Adenylat Cyclase, die ein Enzym der Plasmamembran ist und die Umwandlung von ATP in cAMP katalysiert. Dieses im Überschuss gebildete cAMP wirkt der Plättchenaktivierung entgegen. Durch Aktivierung dieses Inhibitionswegs mit PGE1, bzw. Iloprost, wurde geprüft, ob die Heparin und TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung über diesen Weg hemmbar ist.



**Abb. 4.1.11.2: Die Aktivierung durch Heparin+TSP-1  $Zn^{2+}$ -voraktivierter Plättchen konnte über den cAMP Inhibitionsweg inhibiert werden.** Die Thrombozyten wurden mit 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 10 µg/ml TSP-1 und 1 U/ml UF-Heparin aktiviert. Vorinkubation mit 0-1 nM Iloprost oder 0-5 µM PGE-1, die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane (n=3).

n.s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Auch Induktoren des cAMP Inhibitionswegs konnten die Heparin und TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung dosisabhängig hemmen (Abb. 4.1.11.2).



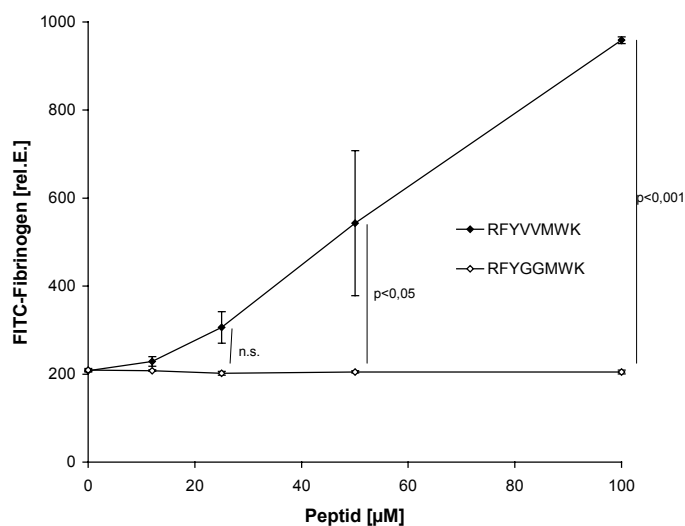
## 4.2 Wirkung des Thrombospondin-1 Peptids RFYVVMWK auf Zellen

Im carboxyterminalen Bereich von TSP-1 befindet sich die Aminosäuresequenz RFYVVMWK, die nach Literaturberichten mit dem Integrin-assoziierten Protein, CD47, interagieren soll. Durch diese Interaktion kommt es zur Bindung von TSP-1 an viele Zellen. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass dieses TSP-1 Peptid glatte Muskelzellen aktivieren kann. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass die Bindung einer Aminosäuresequenz, die diesem Bereich des TSP-1 entspricht, an Blutzellen, wie Thrombozyten und Monozyten, diese Zellen aktivieren könnte. Daher wurde die Sequenz RFYVVMWK, die im TSP-1 Mutterprotein zwischen den Aminosäuren 1034 und 1041 liegt, synthetisiert und auf Funktion bei Thrombozyten und Monozyten untersucht.

Als Kontrollpeptid wurde ein Peptid mit der Sequenz RFYGGMWK benutzt.

### 4.2.1 Einfluss von RFYVVMWK auf die Plättchenaktivierung

#### 4.2.1.1 Bindung des Fibrinogens



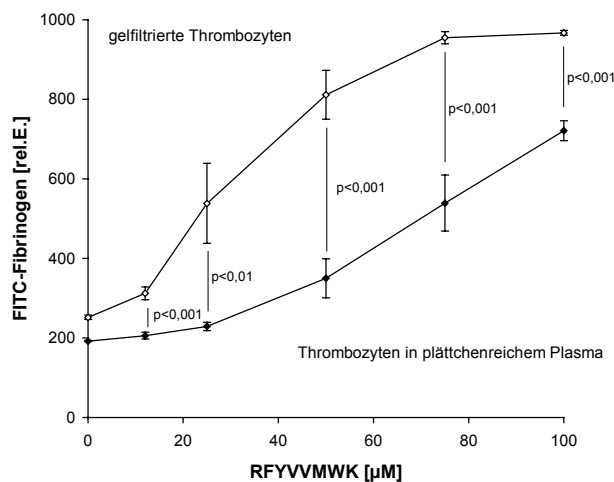
**Abb. 4.2.1.1.1: Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK induziert die Fibrinogen Bindung an Plättchen. Das Kontrollpeptid RFYGGMWK zeigte keine aktivierende Wirkung.** Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert und auf 25.000/µl eingestellt. FITC konjugiertes Fibrinogen wurde in einer Konzentration von 150 µg/ml zugegeben. Die Aktivierung mit den beiden Peptiden RFYVVMWK und

RFYGGMWK in den Konzentrationen von 0-100 µM wurde nach 3 min durch Fixation gestoppt, die Thrombozyten gewaschen und durchflusszytometrisch ausgewertet. Aufgetragen ist die Fluoreszenz gegen die zugegebenen Peptidmengen, n=3.

Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK hat bei den Thrombozyten, wie in Abb. 4.2.1.1.1 zu erkennen ist, zu einer starken Fibrinogen Bindung geführt. Das Kontrollpeptid hingegen, bei

dem die beiden benachbarten Aminosäuren Valin gegen Glycin ausgetauscht wurden, hatte keine plättchenaktivierende Wirkung.

Welchen Einfluss die Plasmaproteine bei der Thrombozytenaktivierung durch das TSP-1 Peptid hatten, wurde anschließend untersucht. Dazu wurden zum einen gefilterte Thrombozyten, die nicht in Plasma, sondern in Puffer suspendiert waren und somit nicht von Plasmaproteinen umgeben waren, und zum anderen Thrombozyten in Plasma mit dem Peptid aktiviert. Als Parameter wurde wiederum die Fibrinogen Bindung untersucht.



**Abb. 4.2.1.1.2: In Abwesenheit der Plasmaproteine kann die durch RFYVVMWK induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen schon mit geringeren Konzentrationen ausgelöst werden.** Thrombozyten aus Citratblut wurden entweder gefiltert oder in Plasma auf 25.000/µl eingestellt. FITC konjugiertes Fibrinogen wurde in

einer Konzentration von 150 µg/ml zugegeben. Die Aktivierung wurde für 3 min mit dem Peptid RFYVVMWK in den Konzentrationen von 0-100 µM durchgeführt und danach durch Fixation gestoppt. Die Thrombozyten wurden anschließend gewaschen und durchflusszytometrisch ausgewertet, n=3

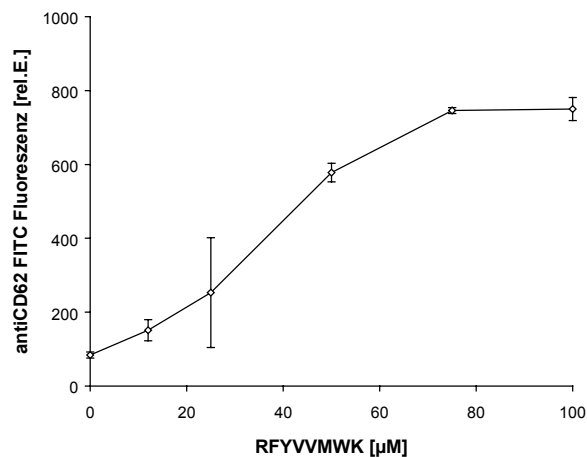
Sowohl die Thrombozyten in Puffer als auch Thrombozyten in Plasma, also in Gegenwart von Plasmaproteinen, konnten vollständig durch das TSP-1 Peptid aktiviert werden. Abb. 4.2.1.1.2 illustriert, dass es nach Inkubation mit dem TSP-1 Peptid zu einer dosisabhängigen Fibrinogen Bindung auf der Thrombozytenoberfläche kommt.

In Abwesenheit von Plasmaproteinen war die Aktivierung mit deutlich weniger Peptid möglich.

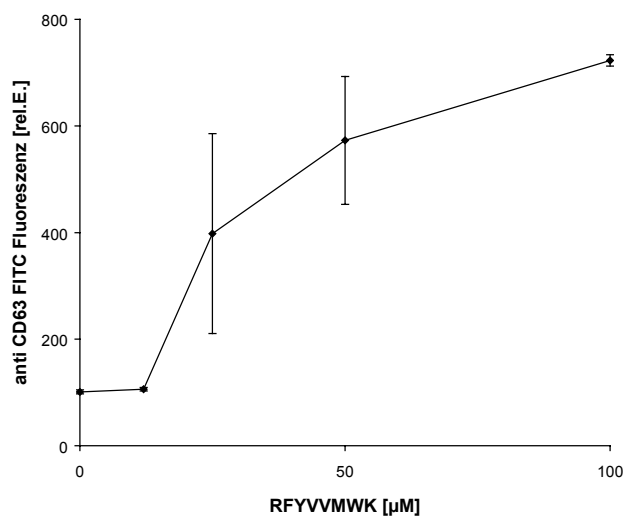
#### 4.2.1.2 Granula-Sekretion

Da die Plättchenaktivierung sehr ausgeprägt verlief, wurde überprüft, ob auch die Granula-Sekretion durch das TSP-1 Peptid ausgelöst werden konnte. Bei der Granula-Sekretion kommen Granulamembrane in Kontakt mit der Plasmamembran und die darin enthaltenen Proteine werden dann auf die Oberfläche der Thrombozyten präsentiert.

Gelfiltrierte Thrombozyten wurden erneut mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert und die Anbindung der Antikörper gegen P-Selektin (CD62) der  $\alpha$ -Granula-Membran und Granulophysin (CD63) der elektronendichten Granula-Membran untersucht.



**Abb. 4.2.1.2.1: RFYVVMWK induziert die P-Selektin-Expression.** Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert und auf 25.000/ $\mu$ l eingestellt. Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 3 min im Bereich von 0-100  $\mu$ M durchgeführt, danach durch Fixation gestoppt und nach Waschen mit anti CD62 FITC inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Fluoreszenz gemessen, n=3.

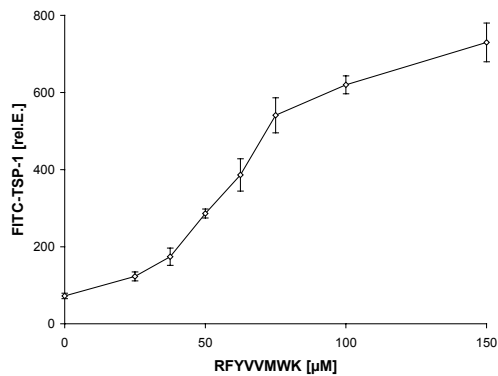


**Abb. 4.2.1.2.2: RFYVVMWK induziert die CD63-Expression.** Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert und auf 25.000/ $\mu$ l eingestellt. Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 3 min im Bereich von 0-100  $\mu$ M durchgeführt, danach durch Fixation gestoppt und nach Waschen mit anti CD63 FITC inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Fluoreszenz gemessen, n=3.

In Abb. 4.2.1.2.1 und 2 sind die Anbindungen der Antikörper gegen P-Selektin, bzw. Granulophysin auf der Plättchenoberfläche zu erkennen. Die Anbindung beider Antikörper und damit die Plättchensekretion, nahm dosisabhängig mit der Peptidgabe zu. Das Peptid aktivierte Thrombozyten so, dass es zu einer vollständigen Sekretion der  $\alpha$ -Granula- und der elektronendichten Granula kam.

#### 4.2.1.3 Bindung des TSP-1 an die Plättchenoberfläche

Es wurde weiter untersucht, ob das Adhäsionsprotein TSP-1 bei Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK an die Thrombozytenoberfläche bindet.

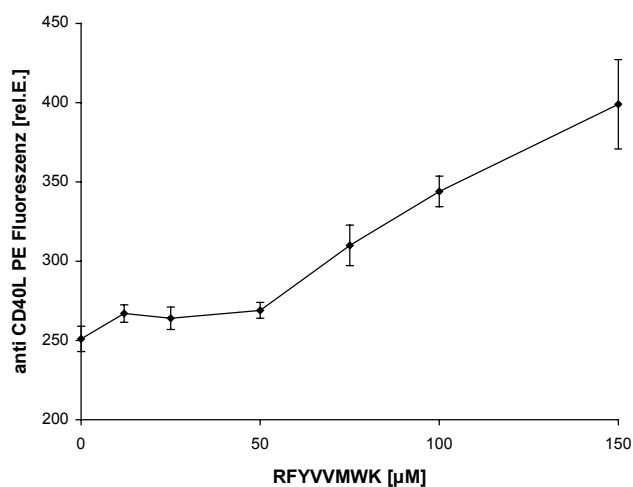


**Abb. 4.2.1.3.1: RFYVVMWK induziert TSP-1 Bindung an die Plättchenoberfläche.** Thrombozyten aus Citratblut wurden auf 25.000/µl eingestellt und FITC konjugiertes TSP-1 in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die Aktivierung wurde für 4 min mit dem Peptid RFYVVMWK in den Konzentrationen von 0-150 µM durchgeführt und danach durch Fixation gestoppt. Die Thrombozyten wurden anschließend gewaschen und durchflusszytometrisch ausgewertet, n=3.

Abb. 4.2.1.3.1 zeigt die Bindung von extern zugesetztem, direkt markiertem TSP-1. Das TSP-1 Peptid induzierte die Bindung des zugegebenen Thrombospondin-1 dosisabhängig.

#### 4.2.1.4 CD40 Ligand Expression der Thrombozyten

CD40 Ligand kann bei Aktivierung auf deren Oberfläche gelangen. Die Interaktion von CD40 und CD40 Ligand (CD40L) spielt unter anderem bei der Entzündung eine Rolle. Es wurde untersucht, ob das TSP-1 Peptid eine CD40 Ligand Expression auslösen konnte.



**Abb. 4.2.1.4.1: RFYVVMWK induziert die CD40L Expression aus Thrombozyten.**

Thrombozyten aus Citratblut wurden auf 25.000/µl eingestellt. Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 4 min im Bereich von 0-150 µM durchgeführt danach durch Fixation gestoppt und nach Waschen mit anti CD40L PE inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Fluoreszenz gemessen, n=3.

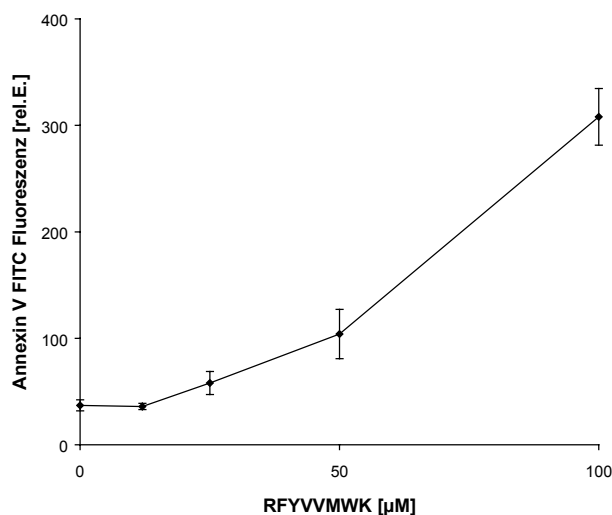
In der Abb. 4.2.1.4.1 ist die Anbindung des Antikörpers gegen CD40 Ligand auf der Plättchenoberfläche zu erkennen. Die Anbindung des Antikörpers nahm ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  TSP-1 Peptid dosisabhängig zu. Die Signalhöhe der CD40L Expression zeigt, dass dieses vollständig auf der Oberfläche der Plättchen präsentiert wurde.

#### 4.2.1.5 Ausbildung des prokoagulanten Zustands

Aktivierte Plättchen schaffen für die Bildung des Xa-se-Komplexes und des Prothrombinase-Komplexes eine prokoagulante Oberfläche. Die Bindung der Faktoren Xa und Va spiegelt die Ausprägung der prokoagulanten Oberfläche wider.

Wird die Thrombozytenoberfläche prokoagulant, nimmt der Anteil an negativ geladenen Phosphatidylserinen auf der äußeren Hülle der Plasmamembran zu. Die Bindung von Annexin V an das Phosphatidylserin ist ein Hinweis dafür, dass eine Zelloberfläche prokoagulant geworden ist.

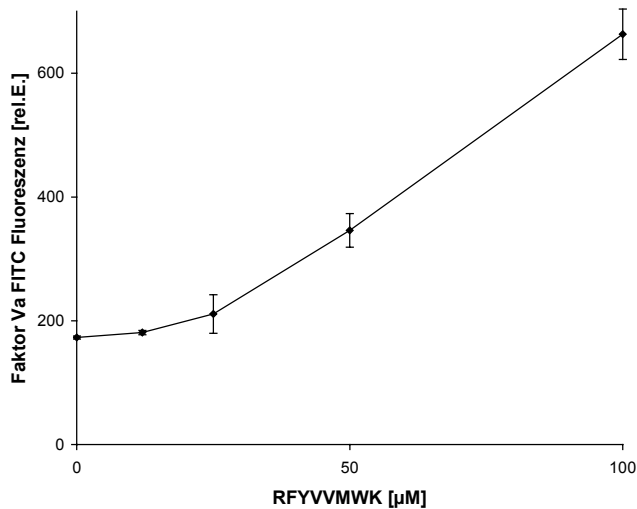
Es wurde untersucht, ob durch Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK die Thrombozytenoberfläche prokoagulant gemacht werden konnte.



**Abb. 4.2.1.5.1: RFYVVMWK induziert die Annexin V Anbindung an Thrombozyten.**

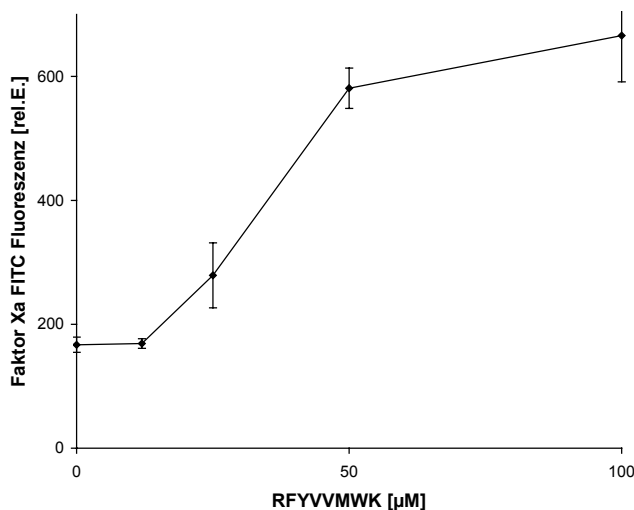
Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert und auf 100.000/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Der Puffer, in dem die Thrombozyten vorlagen, enthielt 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 5 min im Bereich von 0-100  $\mu\text{M}$  unter heftigem Schütteln durchgeführt, danach für 15 Minuten bei leichtem Schwenken Annexin V FITC zugegeben. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Puffer (+ 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) und 15 min Schwenken wurde die Bindung des Annexin V im Durchflusszytometer gemessen,  $n=3$ .

Das Ergebnis in Abb. 4.2.1.5.1 veranschaulicht, dass das TSP-1 Peptid dosisabhängig die Annexin V Bindung an Plättchen induzierte.



**Abb. 4.2.1.5.2: RFYVVMWK induziert die Faktor Va-Anbindung an Thrombozyten.**

Thrombozyten aus Citratblut wurden gefiltert und auf 100.000/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Der Puffer, in dem die Thrombozyten vorlagen, enthielt 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 1 U/ml Faktor Va-FITC. Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 5 min im Bereich von 0-100  $\mu\text{M}$  unter heftigem Schütteln durchgeführt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Puffer (+ 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) wurde nach 15 min leichter Rotation die Anbindung des Faktors im Durchflusszytometer gemessen, n=3.



**Abb. 4.2.1.5.3: RFYVVMWK induziert die Faktor Xa-Anbindung an Plättchen.**

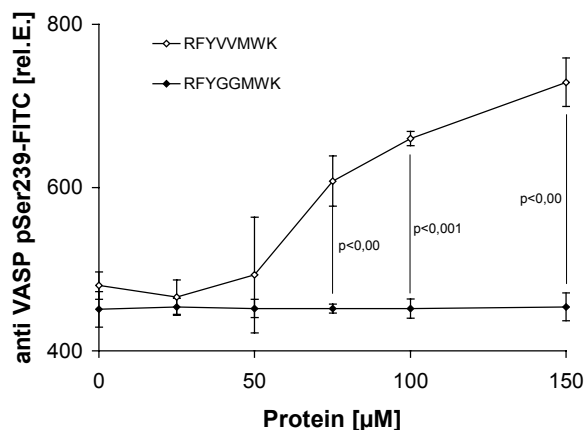
Thrombozyten aus Citratblut wurden gefiltert und auf 100.000/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Zusätzlich wurden sie mit 1 U/ml Faktor Va und 1 U/ml Faktor Xa-FITC vorinkubiert. Der Puffer, in dem die Thrombozyten vorlagen, enthielt 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Aktivierung mit RFYVVMWK wurde für 5 min im Bereich von 0-100  $\mu\text{M}$  unter heftigem Schütteln durchgeführt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Puffer (+ 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) wurde nach 15 min leichter Rotation die Anbindung des Faktors im Durchflusszytometer gemessen, n=3.

Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte auch die Bindung von Faktor Va und Faktor Xa in dosisabhängiger Weise. Die Aktivierung mit RFYVVMWK versetzte die Thrombozyten vollständig in den prokoagulanten Zustand.

#### 4.2.1.6 VASP Phosphorylierung

Die cAMP-PK und cGMP-PK phosphorylieren in Thrombozyten zahlreiche Substrate, darunter das Vasodilatator-stimulierte Protein (VASP). VASP findet man hauptsächlich in fokalen Kontakten, Stressfasern und Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Es interagiert mit zahlreichen Zytoskelettproteinen wie Profilin, Zyxin, Vinculin und Aktin und besitzt drei Phosphorylierungsstellen, Serin-157, Serin-239 und Threonin-278, die von der cAMP-PK und cGMP-PK phosphoryliert werden. VASP verstärkt die Aktinpolymerisation und die Bündelung der Aktinfilamente. Die Phosphorylierung des Ser-157 korreliert eng mit der Hemmung des Fibrinogenrezeptors. Kommt es bei Thrombozyten zu einer Aktivierung und verändert der Thrombozyt seine Form, kommt es zu einer Phosphorylierung des VASP.

Um den Mechanismus der Thrombozytenaktivierung durch das TSP-1 Peptid näher zu verstehen, wurde in dem folgenden Versuch untersucht, ob es bei einer Aktivierung von Thrombozyten zu einer Phosphorylierung des VASP kommt.



#### Abb. 4.2.1.6.1: RFYVVMWK induziert die VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten.

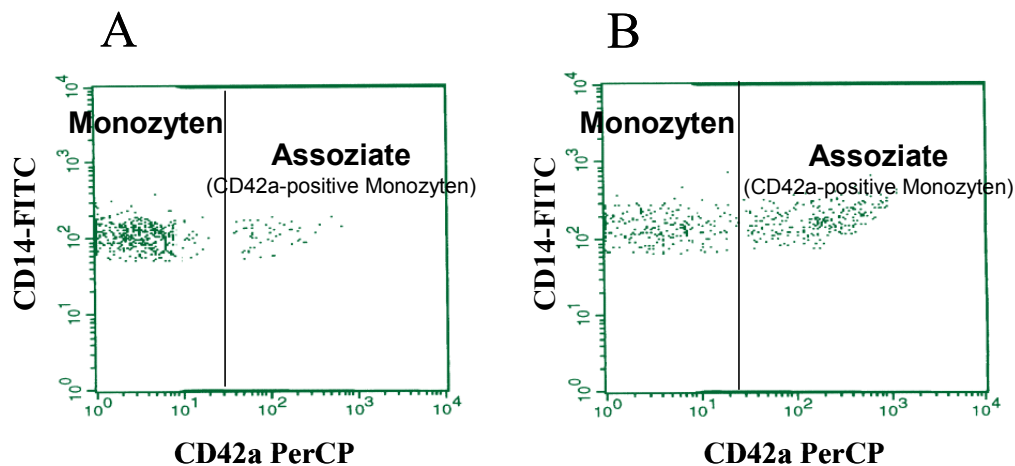
Plättchen aus Citratblut wurden auf 50.000/µl mit PBS-Puffer eingestellt und für 5 min mit 0, 25, 50, 75, 100 oder 150 µM TSP-1-Peptid RFYVVMWK, bzw. dem Kontrollpeptid RFYGGMWK, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gewaschen, permeabilisiert und mit dem FITC konjugierten anti VASP-P

Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem folgenden Waschschrift wurde die Fluoreszenz gemessen, n=4.

Durch die Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK kam es zu einer dosisabhängigen Anbindung des anti VASP-P Antikörper. Das Kontrollpeptid RFYGGMWK konnte diese Reaktion nicht auslösen (Abb. 4.2.1.6.1).

#### 4.2.2 Monozyten-Thrombozyten Assoziatbildung

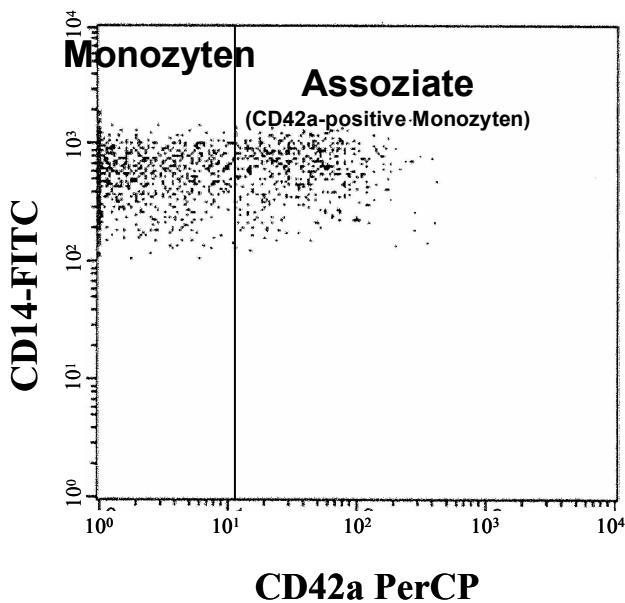
In der Literatur ist beschrieben (s. Diskussionsteil), dass Leukozyten mit Thrombozyten Assoziate bilden können. Die Assoziatbildung von Leukozyten mit Thrombin-aktivierten Thrombozyten wurde von mir wiederholt (Abb. 4.2.2.1).



**Abb. 4.2.2.1: Monozyten und Thrombin-aktivierte Thrombozyten bilden Assoziat.** A: ruhende Monozyten (mit anti CD14-FITC markiert) und ruhende Thrombozyten (mit anti CD42a PerCP markiert) bilden kaum Assoziat; B: ruhende Monozyten und Thrombin-aktivierte Thrombozyten bilden vermehrt Assoziat.

Thrombozyten wurden mit Thrombin aktiviert, fixiert, gewaschen, und zu frisch elutrierten Monozyten (fixiert und gewaschen) gegeben. Wie Abb. 4.2.2.1 zeigt, konnte man deutlich eine Assoziatbildung erkennen. Es wurde daraufhin untersucht, ob das TSP-1 Peptid RFYVVMWK in der Lage war, durch Aktivierung von Thrombozyten ebenfalls zu einer Thrombozyten-Monozyten-Assoziatbildung führt.





**Abb. 4.2.2.2: RFYVVMWK aktivierte Thrombozyten bilden mit ruhenden Monozyten Assoziat.** Thrombozyten aus Citratblut wurden mit Puffer auf 25.000/ $\mu$ l eingestellt, für 5 min mit 75  $\mu$ M RFYVVMWK aktiviert, für 30 min fixiert und gewaschen. Monozyten wurden frisch elutriert und ebenfalls für 30 min fixiert. Nach dem Waschen wurden Plättchen und Leukozyten im Verhältnis 100:3 für 20 min vereinigt und danach mit anti CD42a PerCP und anti CD14 FITC inkubiert. Zu sehen ist die Darstellung von Monozyten, die mit Thrombozyten assoziiert sind (rechtes Feld). Monozyten, an die keine Plättchen assoziiert sind (nicht CD42a-positiv), befinden sich im linken Feld.

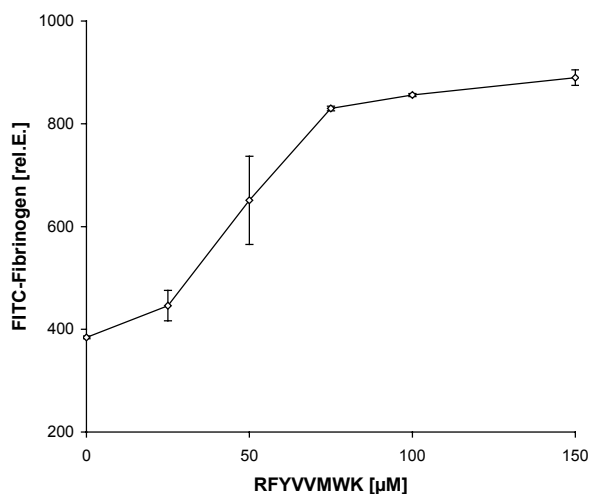
Thrombozyten (CD42-PerCP-positiv) sind sich nach Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK mit Monozyten (CD14-FITC-positiv) assoziiert.

#### 4.2.3 Einfluss von RFYVVMWK auf Monozyten

Da Thrombozyten mit Monozyten assoziieren und in ihrer räumlichen Nähe ihre Granula-Inhaltsstoffe, zu denen auch das TSP-1 gehört, sezernieren, wurde in den weiteren Versuchen der Einfluss des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Monozyten untersucht.

##### 4.2.3.1 Bindung des Fibrinogens an Monozyten

Werden Monozyten durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert, kommt es zu einer Expression von CD11b auf der Monozytenoberfläche (Dissertation Jurk, 1999). Dieses CD11b, auch Mac-1 Integrin genannt, muss, um Fibrinogen zu binden, erst aktiviert werden. Es wurde daher untersucht, ob bei der Aktivierung der Monozyten durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK die Fibrinogen Bindung erreicht werden konnte.



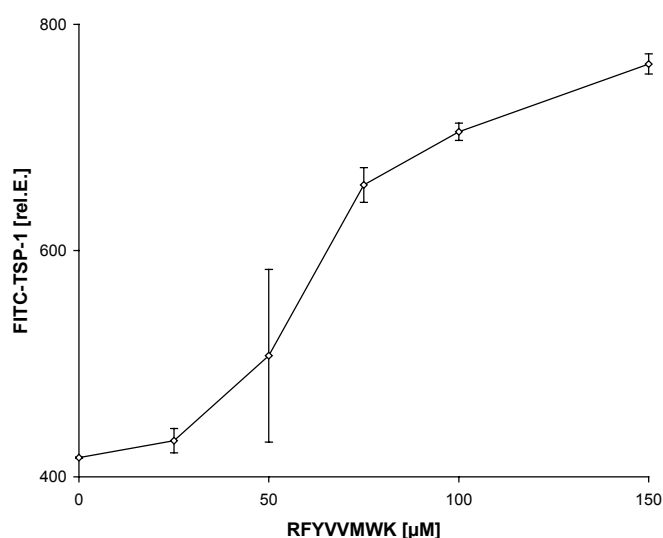
**Abb. 4.2.3.1.1: RFYVVMWK induzierte Fibrinogen Bindung an Monozyten.**

Monozyten (3000/µl) wurden mit 150 µg/ml FITC-Fibrinogen vorinkubiert und mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 3 min aktiviert, mit 0,5 % Endkonzentration Formaldehyd fixiert, gewaschen und die Zellen durchflusszytometrisch auf Anbindung des Adhäsionsproteins untersucht, n=3.

Das TSP-1 Peptid aktivierte dosisabhängig Monozyten und führte zuerst zu einer Präsentation von CD11b auf der Monozytenoberfläche (Jurk Dissertation, 1999). Durch die Aktivierung der Monozyten mit diesem Peptid wurde eine gesteigerte Fibrinogen Bindung induziert (Abb. 4.2.3.1.1).

#### 4.2.3.2 Bindung des Thrombospondin-1

Die Bindung von Thrombozyten-Adhäsionsproteinen wurde weiter beobachtet. Das quantitativ bedeutendste Protein, welches bei der Plättchenaktivierung in großen Mengen ausgeschüttet wird, ist Thrombospondin-1. Bekannt als Brückenprotein zwischen Monozyten und Thrombozyten wurde dessen Bindung auf der Monozytenoberfläche untersucht.



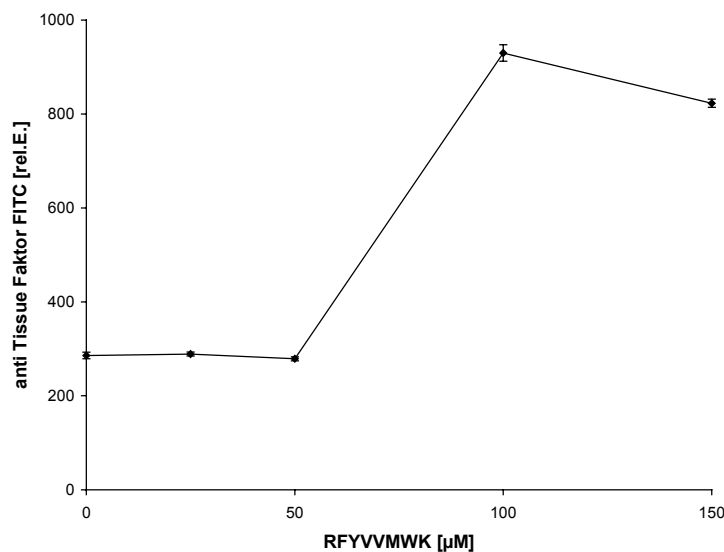
**Abb. 4.2.3.2.1: RFYVVMWK induzierte die TSP-1 Anbindung an Monozyten.** Monozyten (3000/µl) wurden mit 50 µg/ml FITC-TSP-1 vorinkubiert und mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 3 min aktiviert. Nach Fixation mit 0,5% Formaldehyd Endkonzentration wurden die Zellen gewaschen und durchflusszytometrisch auf Anbindung des Adhäsionsproteins untersucht, n=3.

In Abbildung 4.2.3.2.1 wurde die Bindung von TSP-1 illustriert, welches den Leukozyten extern zugegeben wurde. Das TSP-1 Peptid induzierte die Bindung des zugegebenen Thrombospondin-1 dosisabhängig.

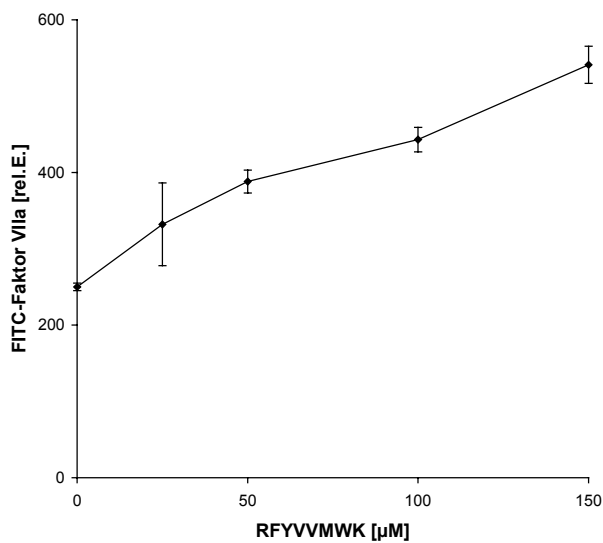
#### 4.2.3.3 Expression des Tissue Faktors (TF) und Bindung des Faktors VIIa

Werden Monozyten aktiviert, wird ca. 80% des in den Monozyten enthaltenen Gewebefaktors (Tissue Faktor, TF) auf der Zelloberfläche präsentiert, die Monozyten nehmen also das prokoagulante Stadium ein. Gebunden an Tissue Faktor wird im nächsten Schritt Faktor VII zu VIIa aktiviert. Diese Faktor VIIa-Bildung lässt danach am Ort der Reaktion erhöhte Mengen an Thrombin entstehen.

In den beiden folgenden Versuchen wurde untersucht, ob durch Zellaktivierung mit dem TSP-1 Peptid Tissue Faktor an die Zelloberfläche gelangt.



**Abb. 4.2.3.3.1: RFYVVMWK induziert die Tissue Faktor Präsentation auf der Monozytenoberfläche.** Monozyten ( $3000/\mu\text{l}$ ) wurden mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK in Konzentrationen von  $0-150 \mu\text{M}$  unter starkem Schütteln aktiviert. Nach der Aktivierung wurde unter Schütteln anti Tissue Faktor FITC Antikörper in einer sättigenden Konzentration für 15 min zugegeben und nach weiterer Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  Puffer die Zellen durchflusszytometrisch auf Antikörperanbindung untersucht,  $n=3$ .

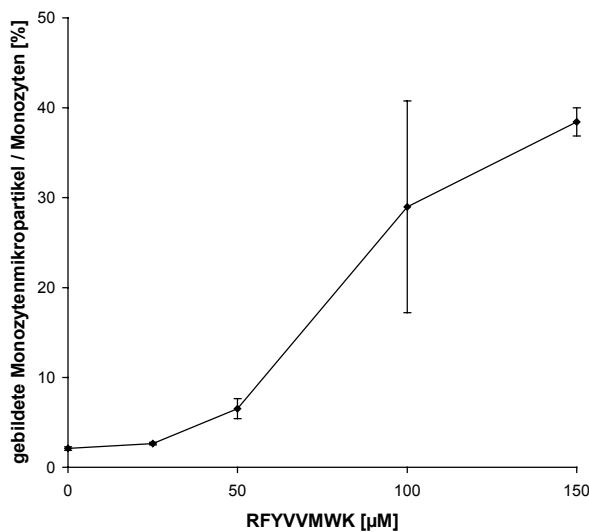


**Abb. 4.2.3.3.2: RFYVVMWK induzierte die Faktor VIIa Anbindung an die Monozytenoberfläche.** Monozyten (3000/ $\mu$ l) wurden mit 150  $\mu$ g/ml FITC-Faktor VIIa vorinkubiert und mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 15 min unter heftigem Schütteln aktiviert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Puffer wurde die Bindung des Koagulationsfaktors durchflusszytometrisch untersucht, n=3.

Die Abb. 4.2.3.3.1 und 2 zeigen, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK die Expression des Tissue Faktors auf die Monozytenoberfläche in Konzentration  $>50 \mu\text{M}$  dosisabhängig induzierte. Im Folgeschritt konnte der Koagulationsfaktor VIIa an den exprimierten Tissue Faktor anbinden. Auch diese Reaktion erfolgte nach Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid dosisabhängig.

#### 4.2.3.4 Mikropartikelformation

Werden Blutzellen voll durchaktiviert, kann es zur Bildung von Mikrovesikeln/ Mikropartikeln kommen. Aufgrund der starken Monozytenaktivierung durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK wurde daher untersucht, ob diese zu einer Bildung solcher Partikel führte.



**Abb. 4.2.3.4.1: RFYVVMWK induzierte die Monozyten-Mikropartikel Bildung.** Monozyten (3000/µl) wurden mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 15 min unter heftigem Schütteln aktiviert und einerseits die intakten Monozyten, andererseits die gebildeten Mikropartikel quantifiziert. Aufgetragen sind die gebildeten Mikropartikel in Prozent der eingesetzten intakten Monozyten gegen die Peptidmenge, n=3.

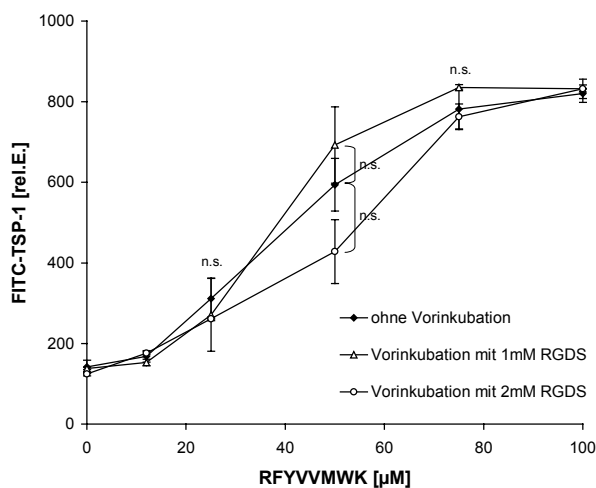
Die Ausbildung des prokoagulanten Zustands der Monozyten wurde durch das TSP-1 Peptid soweit hervorgerufen, dass das Peptid die Monozyten so durchaktivierte, dass Monozyten-Mikropartikel gebildet wurden.

#### 4.2.3.5 Untersuchung des Zellaktivierungs-Mechanismus

Während der Arbeit an dieser Dissertation wurde von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (siehe Diskussionsteil), dass Thrombozyten von Mäusen, denen der für RFYVVMWK postulierte Rezeptor CD47 fehlt, im Vergleich zu Wildtyp-Thrombozyten keine verminderte RFYVVMWK induzierte Aggregation zeigen. Dieses Ergebnis wurde in unserem Labor mit CD47 k.o. Mäusen, die von E. Brown zur Verfügung gestellt wurden, reproduziert. Es stellte sich daher die Frage, wie nun das TSP-1 Peptid RFYVVMWK Thrombozyten aktiviert.

##### 4.2.3.5.1 Einfluss von RGDS

GPIIb/IIIa ist eines der Bindungsproteine für TSP-1. Die Bindung wird über das RGD-Peptid vermittelt. Daher wurde der Einfluss dieses Peptids auf die TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte Thrombospondin-1 Bindung untersucht. Dazu wurde zuerst der GPIIb/IIIa-Antagonist RGDS mit den Plättchen inkubiert. Da diese Aminosäuresequenz die Fibrinogen Bindung an die Plättchen hemmt, konnte diese nicht als Parameter verwendet werden. Es wurde daher als Marker für die Aktivierung die Anbindung von FITC-konjugiertem TSP-1 untersucht.



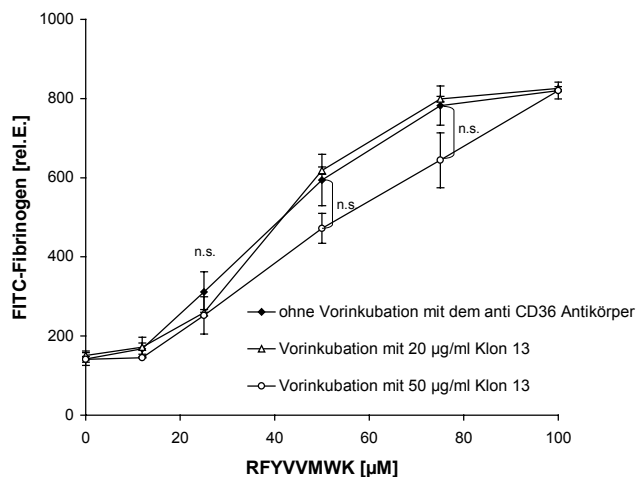
**Abb. 4.2.3.5.1.1: RGDS beeinflusst die RFYVVMWK induzierte TSP-1 Bindung an Plättchen nicht.**

Thrombozyten wurden mit 150 µg/ml FITC-TSP-1 vorinkubiert. Vor der Aktivierung mit dem Peptid wurden unterschiedliche Mengen an RGDS vorinkubiert. Danach wurde für 3 min mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert, mit Formaldehyd (0,5 % Endkonzentration) fixiert, gewaschen und die Zellen durchflusszytometrisch auf Bindung des TSP-1 untersucht, n=3.

In der Abb. 4.2.3.5.1.1 ist zu sehen, dass ein GPIIb/IIIa Antagonist nicht zur Inhibierung der RFYVVMWK induzierten Zellaktivierung ausreichte. Die Zugabe des 4 AS-langen Peptids hatte auf die Thrombozytenaktivierung durch RFYVVMWK keine Wirkung.

#### 4.2.3.5.2 Zellaktivierung durch RFYVVMWK über CD36?

Ein anderes Bindungsprotein für TSP-1 ist das CD36. Daher wurde untersucht, ob die Blockade der TSP-1 Bindungsstelle auf CD36 die TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte Zellaktivierung inhibiert. Zur Untersuchung wurde vor Plättchenaktivierung durch RFYVVMWK den Thrombozyten nach Fc-Rezeptor Blockade ein monoklonaler Antikörper gegen CD36 zugegeben.



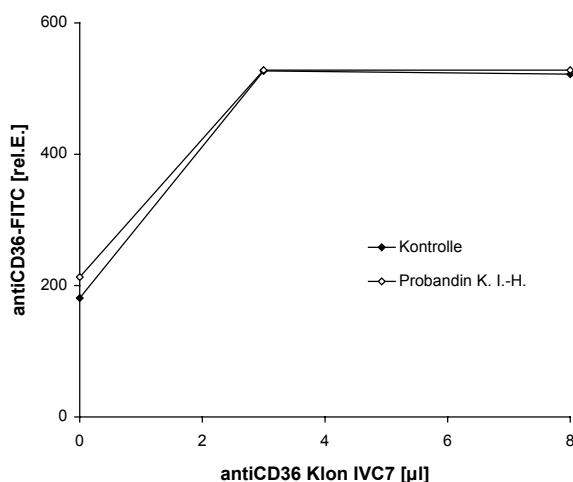
**Abb. 4.2.3.5.2.1: CD36 Blockade hatte keinen Einfluss auf die RFYVVMWK induzierte Fibrinogen Bindung an Plättchen.**

Der Fc-Rezeptor der Thrombozyten wurde zuerst mit 10 µg/ml anti Fc-Rezeptor Antikörper (Klon IV.3, 10 min) blockiert. Danach wurden die Thrombozyten mit unterschiedlichen Mengen anti CD36 Antikörper Klon 13 (5 min) und 150 µg/ml FITC-Fibrinogen vorinkubiert (5 min). Diese Thrombozyten wurden dann 3 min mit dem TSP-1

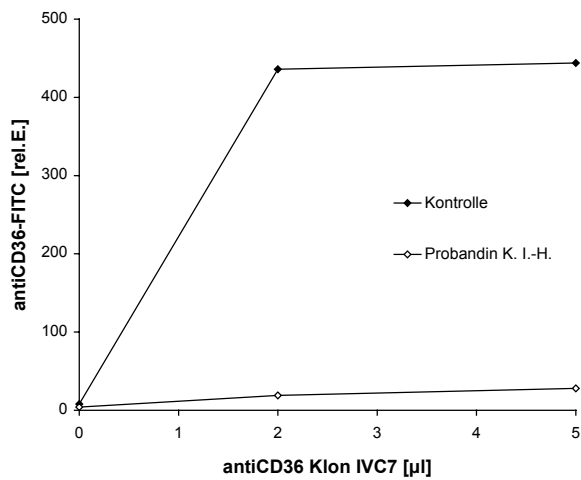
Peptid RFYVVMWK aktiviert. Die Zellen wurden mit 0,5 % Formaldehyd fixiert, gewaschen und durchflusszytometrisch auf Anbindung des Fibrinogens untersucht, n=3.

Blockade der TSP-1 Bindungsstelle auf CD36 durch den monoklonalen anti CD36 Antikörper Klon 13 konnte die TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte Plättchenaktivierung nicht hemmen.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden die Thrombozyten einer Patientin untersucht, der das Protein CD36 auf der Thrombozytenoberfläche fehlte. Die Defizienz dieses Proteins war aber nur auf den Thrombozyten vorhanden. Auf der Monozytenoberfläche konnte das Protein detektiert werden.



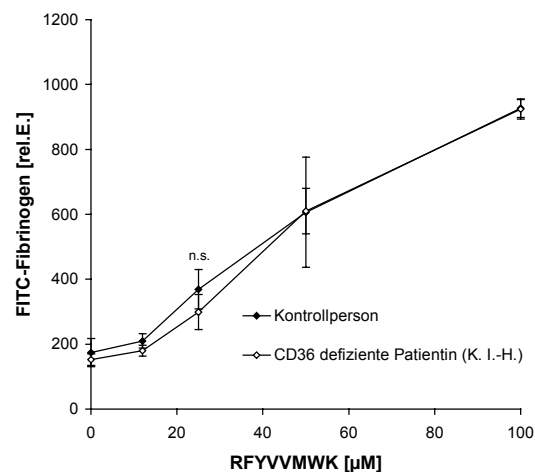
**Abb. 4.2.3.5.2.2: Anbindung des monoklonalen anti CD36 Antikörpers auf den Monozyten einer CD36 defizienten Patientin (Typ II).** Das Vollblut wurde fixiert, gewaschen, der Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, die Zellen erneut gewaschen, die Erythrozyten lysiert und die Monozyten auf Antikörperanbindung untersucht. Zur Kontrolle wurden die Zellen eines gesunden Probanden mituntersucht, n=3.



**Abb. 4.2.3.5.2.3: Anbindung des monoklonalen anti CD36 Antikörpers auf den Thrombozyten einer CD36 defizienten Patientin (Typ II).**

Die Thrombozyten wurden aus Citratblut isoliert, fixiert, gewaschen, der Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, die Zellen erneut gewaschen und die Anbindung im Durchflusszytometer untersucht. Zur Kontrolle wurden die Zellen eines gesunden Probanden mituntersucht, n=3.

Die Abbildungen 4.2.3.5.2.2 und 3 zeigen, dass CD36 auf den Monozyten der Patientin zwar vollständig vorhanden war, aber auf den Thrombozyten CD36 nicht zu detektieren war. Die CD36 defizienten Thrombozyten wurden anschließend mit RFYVVMWK aktiviert.



**Abb. 4.2.3.5.2.4: RFYVVMWK induziert auch auf CD36 defizienten Plättchen eine Fibrinogen Bindung.** Thrombozyten wurden mit 150 µg/ml FITC-Fibrinogen vorinkubiert und mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 3 min aktiviert. Nach der Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen gewaschen und durchflusszytometrisch die Bindung des Fibrinogens untersucht. Die Aktivierung wurde mit Plättchen einer CD36 defizienten Patientin und eines Kontrollprobanden durchgeführt, n=3.

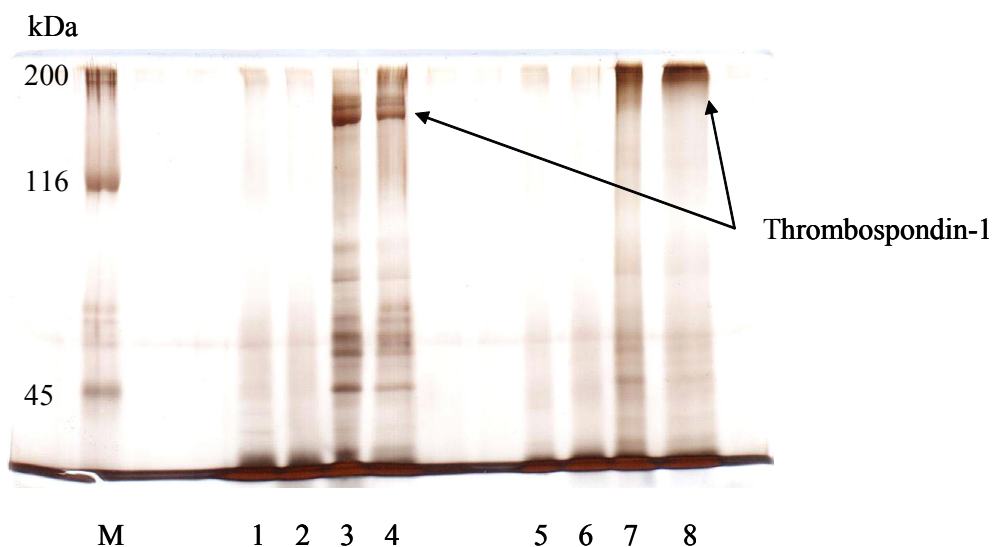


Die RFYVVMWK induzierte Plättchenaktivierung zeigte keine Unterschiede zwischen den Thrombozyten der CD36 defizienten Patienten und des Kontrollprobanden. Die Thrombozyten einer CD36 defizienten Typ II Patientin verhielten sich in Hinblick auf die Thrombozytenaktivierung mit dem TSP-1 Peptid genauso wie die Thrombozyten einer gesunden Kontrollperson.

#### 4.2.4 Welche Thrombozytenproteine binden an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK?

Da die bekannten TSP-1 Rezeptoren CD47, GPIIb/IIIa und CD36 somit als Vermittler der Aktivierung ausgeschlossen waren, wurde versucht herauszufinden, welche Thrombozytenproteine an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK binden. Dazu wurde das Peptid biotinyliert und an eine Avidin-Sepharose-Matrix gebunden. Über diese Matrix, die in eine Säule eingefüllt wurde, wurde ein Thrombozyten-Solubilisat gegeben und gewaschen. Die leicht angebondenen Proteine wurden mit 1 M NaCl-Lösung abgewaschen.

Es wurde ein SDS-PAGE angefertigt und geschaut, welche Proteine an das Peptid angebonden hatten.

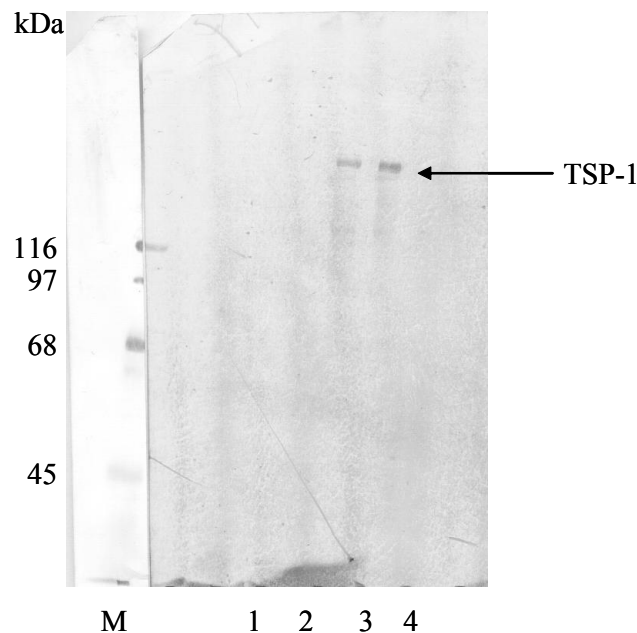


**Abb. 4.2.4.1: Thrombospondin-1 bindet an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK.** SDS-PAGE (7,5% Acrylamid) mit anschließender Silberfärbung. M: Marker mit hohem Molekulargewichtsbereich.

1: Eluat vor der Kopplung; 2: Eluat nach der Kopplung mit bio-RFYVVMWK;

3: eluierte Proteine nach Aufgabe solubilisierter Thrombozyten, 4: Proteine nach der Elution mit 1 M NaCl-Lösung. Proben 1-4 wurden auf reduzierendem Gel getrennt, Proben 5-8 auf nicht reduzierendem Gel getrennt.

Abb. 4.2.4.1 kann man entnehmen, dass als prominenteste Banden im reduzierenden Gel eine Bande bei 180 kDa und im nicht reduzierenden Gel eine wesentlich höher liegende Bande zu erkennen ist. Dies ist die typische Position für monomeres, bzw. polymeres TSP-1. Um dies zu verifizieren wurden die beschriebenen Eluate erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt, ein Western Blot durchgeführt und mit einem polyklonalen Antikörper gegen TSP-1 markiert.



**Abb. 4.2.4.2: Thrombospondin-1 bindet an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK.** Western Blot von TSP-1. Die Proteine wurden mit einem polyklonalen anti TSP-1 Antikörper markiert und durch Anfärbung mit alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht.

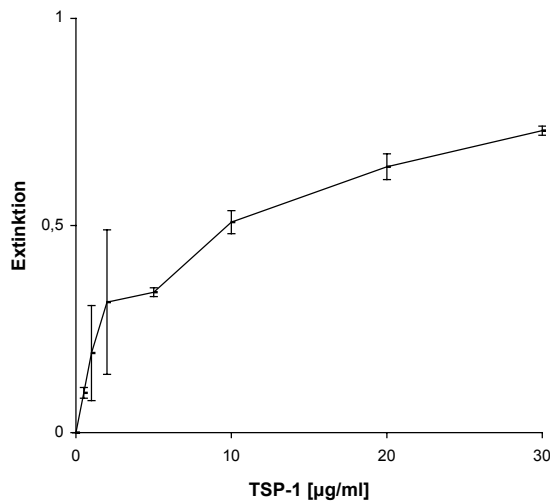
M: Marker mit hohem Molekulargewichtsbereich.

1: Eluat vor der Kopplung; 2: Eluat nach der Kopplung mit bio-RFYVVMWK;

3 und 4: eluierte Proteine nach der Aufgabe solubilisierter Thrombozyten, die Proben wurden auf reduzierendem Gel aufgetrennt.

Auf der Nitrocellulosemembran war eine TSP-1 Bande zuerkennen (Abb. 4.2.4.2). Das Gesamtmolekül TSP-1 hatte an das am Säulenmaterial gekoppelte TSP-1 Peptid RFYVVMWK angebunden.

Ob diese Bindung dosisabhängig erfolgt, wurde in einer ELISA-Untersuchung getestet. An eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte wurde das biotinylierte TSP-1-Peptid immobilisiert und TSP-1 in unterschiedlichen Konzentrationen aufgegeben



**Abb. 4.2.4.3: TSP-1 bindet dosisabhängig an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK.** Biotinyliertes TSP-1 Peptid wurde an eine Streptavidin-ELISA Platte gekoppelt und nach Absättigung der freien Bindungsstellen durch BSA mit dem gesamten TSP-1 Molekül in Kontakt gebracht. Angebundenen TSP-1 wurde mit dem polyklonalen anti TSP-1 Antikörper detektiert, n=3.

Die Abbildung 4.2.4.3 zeigt, dass Thrombospondin-1 dosisabhängig an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK angebunden hat. Der verwendete polyklonale Antikörper zeigte nur minimale Reaktion mit dem TSP-1 Peptid, wie Untersuchungen anderer Mitglieder unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben. Da die zur Anbindung an die Platte eingesetzte Konzentration an biotinyliertem TSP-1 Peptid RFYVVMWK im Versuch konstant war, zeigt die Zunahme der Antikörperbindung im ELISA die Zunahme der Bindung von TSP-1 selbst.

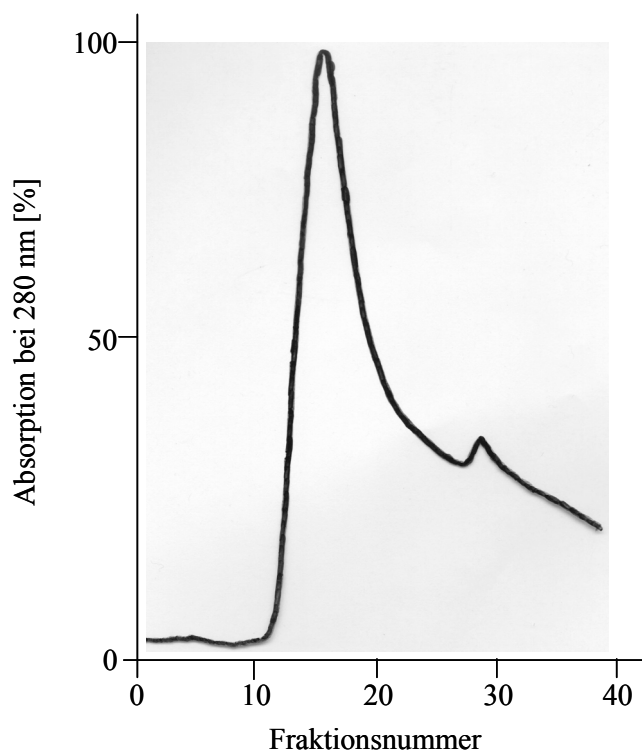
### 4.3 Untersuchungen zur Spaltung des Glykoprotein V

In der frühen Phase der Hämostase bindet der Thrombozyt über den Glykoproteinkomplex Ib/V/IX und den von Willebrand Faktor an die verletzte Gefäßwand. In der späten Phase der Plättchenaktivierung findet man im Plasma Fragmente dieses Glykoproteinkomplexes.

Eine dieser Untereinheiten des Komplexes, das Glykoprotein V, sollte untersucht werden. Dazu wurde das bei Plättchenaktivierung entstehende Fragment  $GPV_{fl}$  angereichert und aufgereinigt.

#### 4.3.1 Aufreinigung von humanem $GPV_{fl}$ und Glykocalicin

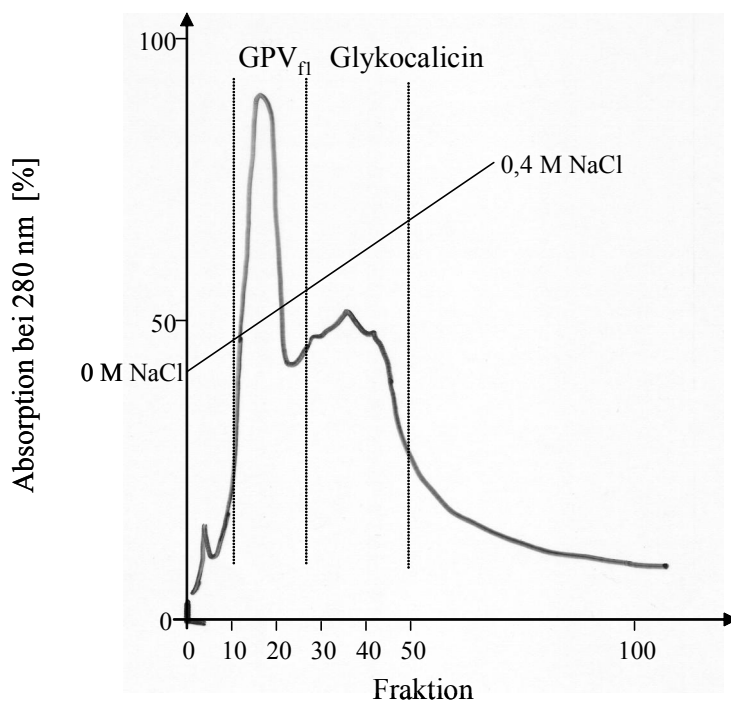
Aus Blutspenden wurden Thrombozyten isoliert und durch Ultraschall und  $Ca^{2+}$ -Zugabe aktiviert. Dieser Vorgang führt zur Abspaltung der Glykoproteinfragmente  $GPV_{fl}$  und Glykocalicin, einem Fragment von GPIb $\alpha$ . Nach Abstoppen der Aktivierung durch Zugabe von PMSF, N-Ethylmaleimid und EDTA und anschließender Abzentrifugation des Cytoskeletts, wurden die Proteine aus den Überständen säulenchromatographisch aufgetrennt. Dazu wurde der proteinreiche Überstand über Weizen-Keim-Agglutinin-Sepharose gegeben, an welches sowohl der extrazelluläre Teil des GPV als auch des GPIb über seine Zuckerreste an dieses Lektin bindet. Durch Elution mit N-Acetylglucosamin wurden diese beiden Proteine von denen des Überstands abgetrennt.



**Abb. 4.3.1.1:  $GPV_{fl}$  und Glykocalicin binden an das Lektin Weizen-Keim-Agglutinin und lassen sich mit N-Acetylglucosamin eluieren.** Elutionsdiagramm einer Isolierung von humanem  $GPV_{fl}$  und Glykocalicin aus 40 „buffy coats“ nach Anbindung an Weizen-Keim-Agglutinin. Eluiert wurde mit 2,5 % N-Acetylglucosamin. Die einzelnen Fraktionen hatten ein Volumen von 2 ml. Die Fraktionen 11-34 wurden vereinigt und weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

Danach wurden die beiden Proteine voneinander durch Ionenaustauschchromatographie getrennt. Dazu wurde eine DEAE-Sephacel-Matrix verwendet, an welche die Proteine unterschiedlich stark anbanden und somit durch unterschiedliche Salzkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten eluiert werden konnten.

Die GPV-Untereinheit konnte mit einer geringeren Salzkonzentration eluiert werden, als die GPIb-Untereinheit.



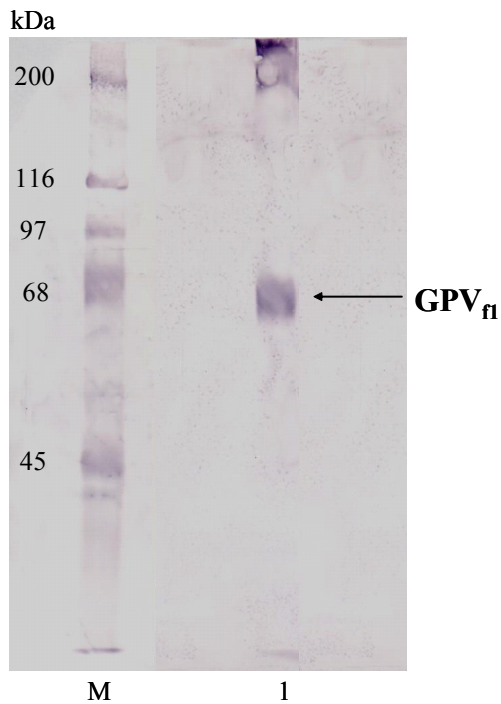
**Abb. 4.3.1.2: Auftrennung von GPV<sub>f1</sub> und Glykocalicin an DEAE-Sephacel.**

Elutionsdiagramm einer Isolierung der Proteine GPV<sub>f1</sub> und Glykocalicin aus 40 „buffy coats“ nach Ionenaustauschchromatographie. Von der DEAE-Sephacel-Säule wurde zuerst GPV<sub>f1</sub> und anschließend Glykocalicin abgetrennt. Die einzelnen Fraktionen hatten ein Volumen von 1 ml.

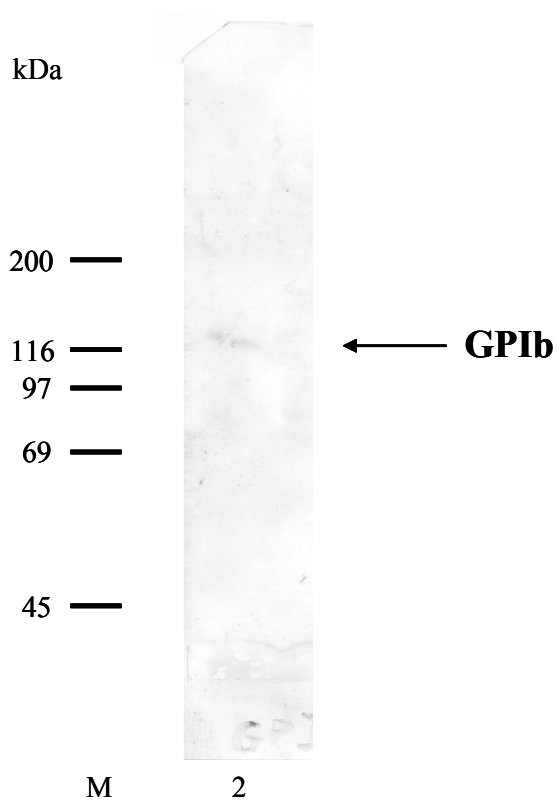
Die Fraktionen wurden jeweils vereinigt und die Proteine mit Western Blot identifiziert.

Dazu wurde ein Aliquot des entsprechenden Fraktionenpools nach reduzierender Behandlung auf ein Polyacrylamidgel (7,5%) aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. GPV<sub>f1</sub> wurde mit einem polyklonalen Antikörper (von Prof. Clemetson, Bern) und Glykocalicin mit dem monoklonalen anti GPIb Antikörper (Klon SZ2) detektiert. Nach anschließender Behandlung mit anti Kaninchen IgG, bzw. anti Maus IgG, Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase, und enzymatischer Umsetzung des Substrats wurden die Proteine angefärbt.

Aus 40 „buffy coats“ konnte ich 10 mg GPV<sub>f1</sub> und 1 mg Glykocalicin aufreinigen.



**Abb. 4.3.1.3: GPV<sub>fl</sub> wurde aus Überständen aktivierter Plättchen angereichert.** Western-Blot von GPV<sub>fl</sub> im reduzierten Zustand, isoliert aus humanen Thrombozyten. M: Markerproteine im hohen Molekulargewichtsbereich. 1: Elutions-Fractionen 10-22, vereinigt, 1mg/ml. GPV<sub>fl</sub> wurde mit einem polyklonalen Antikörper und anschließender Anfärbung über Sekundäntikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase, sichtbar gemacht.



**Abb. 4.3.1.4: Glykocalicin wurde aus Überständen aktivierter Plättchen angereichert.** Western-Blot von GPIb im reduzierten Zustand, isoliert aus humanen Thrombozyten. M: Markerproteine im hohen Molekulargewichtsbereich. 2: Elutions-Fractionen 30-40, vereinigt, 0,08 mg/ml. GPIb wurde mit einem polyklonalen Antikörper und anschließender Anfärbung über Sekundäntikörper, konjugiert an alkalische Phosphatase, sichtbar gemacht.

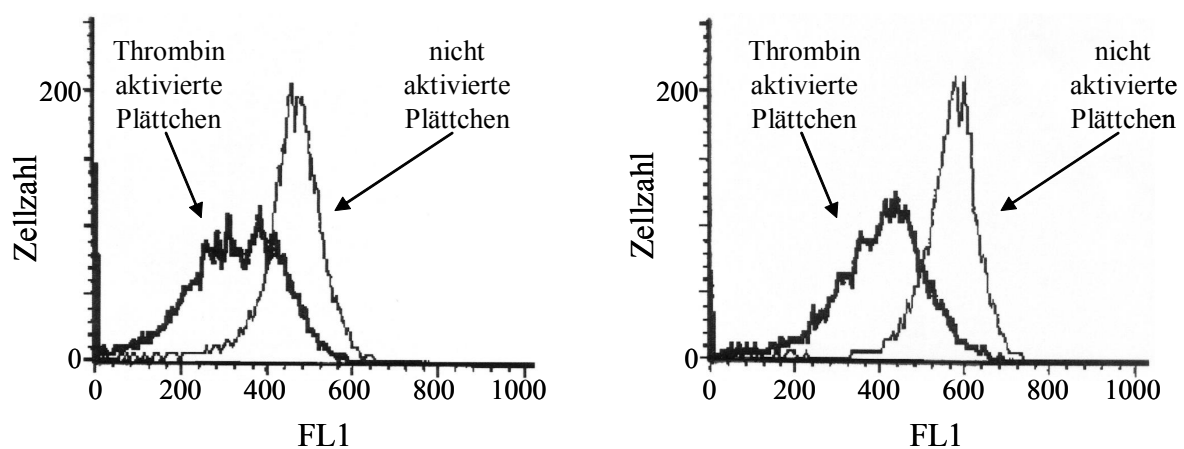
### 4.3.2 GPV-Spaltung: durchflusszytometrische Messung der Bindung GPV-spezifischer Antikörper

Aus der Literatur ist bekannt, dass Thrombin das Glykoprotein V spaltet. Auch die Thrombozytenaktivierung mit Kollagen induziert die Spaltung dieses Membranproteins. Die Spaltungen erfolgen an unterschiedlichen Stellen. Die Spaltstelle durch Thrombin ist genau lokalisiert, die Stelle, an welcher Kollagen indirekt die Spaltung hervorruft, ist noch nicht bekannt.

Abb. 4.3.2.1 zeigt zwei im Durchflusszytometer erstellte Histogramme. Gegen die Zellzahl wurden die Fluoreszenzintensitäten der GPV Antikörper Klone SW16 und GPV<sub>s-fl</sub> aufgetragen sekundärmarkiert mit einem anti Maus IgG FITC Antikörper. Aktiviert wurde mit Thrombin.

Nicht aktivierte Thrombozyten aus PRP banden mehr anti GPV Antikörper, als Thrombin-aktivierte Thrombozyten, Thrombin spaltete GPV auf der Plättchenoberfläche.

A: Bindung von anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>    B: Bindung von anti GPV Antikörper Klon SW16



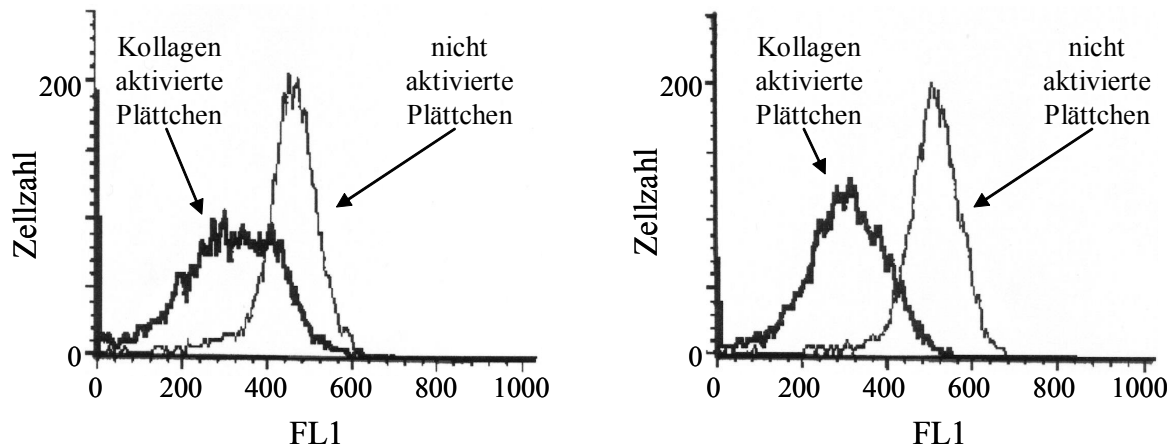
**Abb. 4.3.2.1: Thrombin-Aktivierung von Plättchen führt zu einer Verringerung der Bindungsstellen für die anti GPV Antikörper Klone GPV<sub>s-fl</sub> und SW16 auf Thrombozyten.** FACS-Histogramm-Darstellung von Thrombozyten aus PRP, Aktivierung mit 1 U/ml Thrombin, fixiert, gekoppelt mit 0,125 µl anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> (A), 0,5 µl anti GPV Antikörper Klon SW16 (B), Sekundärmarkierung mit 1 µl anti Maus IgG FITC. FL1 entspricht der relativen Fluoreszenzintensität in max. 1024 Messkanälen.

Das gleiche Ergebnis wurde bei der Thrombozytenaktivierung mit Kollagen erhalten, illustriert in den Histogrammen der Abb. 4.3.2.2.

Nicht aktivierte Thrombozyten aus PRP banden mehr anti GPV Antikörper, als Kollagen-aktivierte Thrombozyten. Die Anzahl der angebotenen GPV-Antikörper auf der Thrombozytenoberfläche verringerte sich nach der Aktivierung.

A: Bindung von anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>

B: Bindung von anti GPV Antikörper Klon SW16

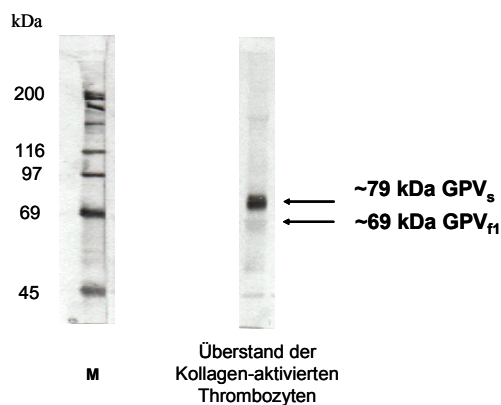


**Abb. 4.3.2.2: Kollagen-Aktivierung von Plättchen führt zu einer Verringerung der Bindungsstellen für die anti GPV Antikörper Klone GPV<sub>s-fl</sub> und SW16 auf Thrombozyten.** FACS-Histogramm-Darstellung von Thrombozyten aus PRP, Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen, fixiert, gekoppelt mit 0,125 µl anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> (A), 0,5 µl anti GPV Antikörper Klon SW16 (B), Sekundärmarkierung mit 1 µl anti Maus IgG FITC. FL1 entspricht der relativen Fluoreszenzintensität in max. 1024 Messkanälen.

#### 4.3.3 Untersuchung der entstehenden GPV-Fragmente

Um herauszufinden, welches GPV Fragment bei der Kollagen induzierten Spaltung entstand, wurde der Thrombozytenüberstand nach Kollagenaktivierung auf ein 7,5 % SDS-PAGE aufgetragen. Die dazu verwendeten Proben wurden reduzierend behandelt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem polyklonalen anti GPV Antikörper behandelt. Der Western Blot wurde mit anti Kaninchen IgG Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, inkubiert. Die auf diese Weise markierten Proteine wurden durch die alkalische Phosphatase-Reaktion mit Hilfe von NBT/BCIP sichtbar gemacht.





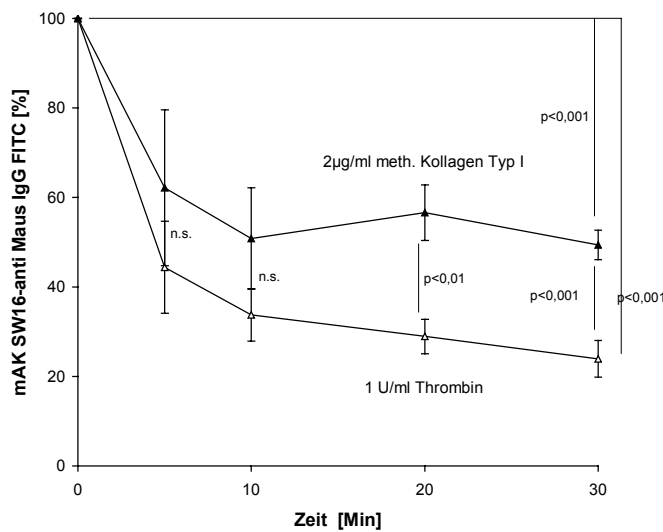
**Abb. 4.3.3.1: Aktivierung von Thrombozyten mit Kollagen führt zur Freisetzung von GPV<sub>s</sub> und kleinen Mengen GPV<sub>f1</sub> in den Thrombozytenüberstand.**

Western-Blot der Proteine aus dem Thrombozytenüberstand nach Kollagenaktivierung (2 µg/ml) für 10 min. Die Proben wurden reduziert auf ein 7,5 % SDS-PAGE aufgetragen und auf Nitrocellulose geblottet. M: Markerproteine mit hohem Molekulargewichtsbereich. Die entstehenden GPV Fragmente wurden mit dem polyklonalen Antikörper (Prof. Clemetson, Bern) und anschließender Phosphatase-Reaktion mit NBT/BCIP sichtbar gemacht.

Die Kollagen induzierte Plättchenaktivierung, die in Anwesenheit von Hirudin durchgeführt wurde, ergab überwiegend ein GPV Fragment von 79 kDa, GPV<sub>s</sub>.

**4.3.4 In welcher zeitlichen Reihenfolge erfolgt die Abspaltung der GPV-Fragmente, die durch Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin und/oder Kollagen induziert wird?**

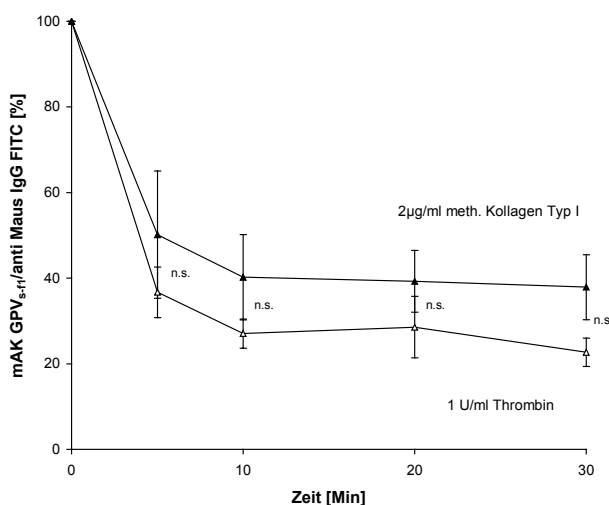
Thrombozyten aus Citratblut wurden mit für Thrombozytenaktivierung maximalen Konzentrationen an Thrombin oder Kollagen behandelt und die Aktivierung zeitabhängig verfolgt. Untersucht wurde die Abnahme der Bindungsstellen für den Antikörper anti GPV Klon SW16. Dabei wurde die maximale Anbindung des Antikörpers an nichtaktivierte Thrombozyten als „100% Anbindung“ festgesetzt.



**Abb. 4.3.4.1: Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombin oder Kollagen führt innerhalb einer Aktivierungszeit von 5 min zu einem deutlichen Abfall der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon SW16 . Nach ca. 10 min ist für beide Agonisten ein maximaler Effekt erreicht. Zeitabhängige Abnahme der Bindungsstellen des monoklonalen anti GPV Antikörpers Klon SW16 an Thrombozyten aus Citratblut nach Akti-**

vierung mit 2 µg/ml Kollagen, bzw. 1 U/ml Thrombin. Die anschließend fixierten, gewaschenen und mit Klon SW16 behandelten Thrombozyten wurden mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombin oder Kollagen führt innerhalb einer Aktivierungszeit von 5 min zu einem deutlichen Abfall der Bindungsstellen. Nach ca. 10 min ist für beide Agonisten ein maximale Effekt erreicht (Abb. 4.3.4.1). Thrombinaktivierung führt zu einer stärkeren Abnahme für die Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers SW16 als Kollagenaktivierung. Das Experiment wurde noch einmal wiederholt. Jedoch wurde jetzt der anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> zur Detektion von GPV eingesetzt. Die Thrombin und Kollagen induzierte Abnahme der Bindungsstellen für den Antikörper GPV<sub>s-fl</sub> zeigte ebenfalls die gleiche Zeitabhängigkeit (Abb. 4.3.4.2).



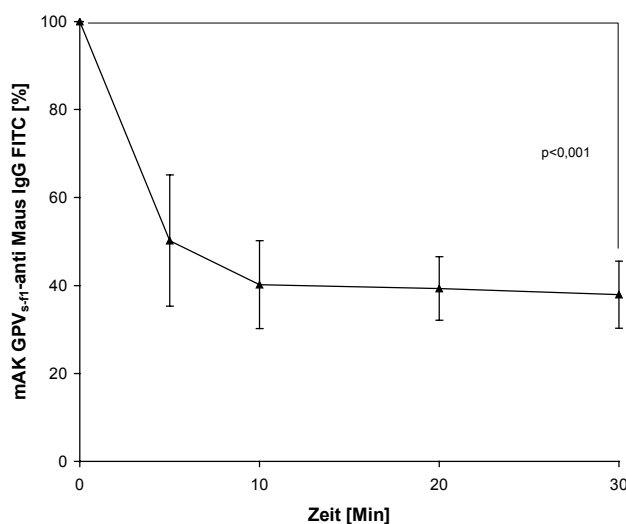
**Abb. 4.3.4.2: Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombin oder Kollagen führt innerhalb einer Aktivierungszeit von 5 min zu einem deutlichen Abfall der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Nach ca. 10 min ist für beide Agonisten ein maximale Effekt erreicht. Abnahme der Bindungsstellen des monoklonalen anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> an Thrombozyten aus Citratblut nach Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen, bzw. 1 U/ml Thrombin. Die anschließend fixierten, gewaschenen und mit**

Klon GPV<sub>s-fl</sub> gekoppelten Thrombozyten wurden mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Thrombinaktivierung führt zu einer tendenziell stärkeren Abnahme für die Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> als Kollagenaktivierung.

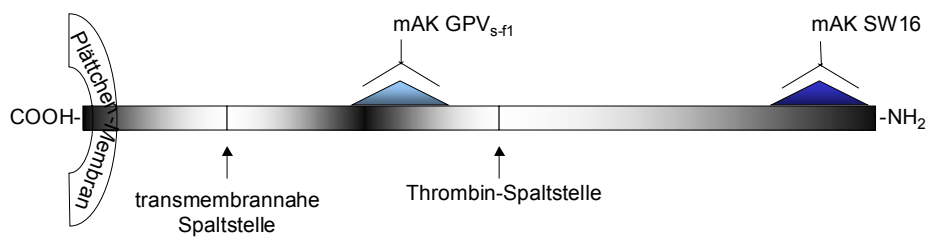
#### 4.3.5 Gibt es eine zeitliche Reihenfolge, in welcher die Fragmente gespalten werden?

Bei vielen Thrombozytenaktivierungen wird Thrombin freigesetzt. Um auszuschließen, dass die Kollagen induzierte GPV Spaltung indirekt durch eine Spaltung des Proteins durch Thrombin, welches auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung gebildet wird, erzielt wurde, wurde in den folgenden Untersuchung das abgenommene Blut nicht mit Citrat, sondern mit rekombinatem Hirudin, einem spezifischen Thrombin-Inhibitor, antikoaguliert. Dann wurden die Plättchen mit 2 µg/ml Kollagen für 5-30 min aktiviert und die anti GPV Antikörper Anbindung untersucht.



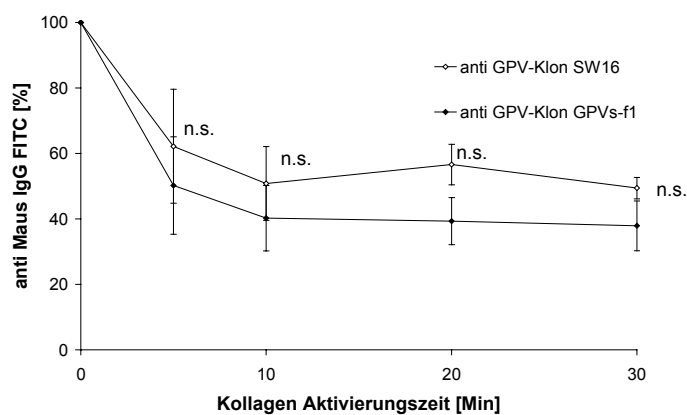
**Abb. 4.3.5.1: Aktivierung von Thrombozyten mit Kollagen führt zu einer Thrombin-unabhängigen Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV-Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach der Kollagen-Aktivierung fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Die verwendete Hirudin-Charge wurde routinemäßig parallel in unserem Labor auf Fähigkeit als Thrombin-Inhibitor zu wirken getestet. Obwohl der spezifische Thrombin-Inhibitor Hirudin zugegeben wurde, ist GPV bei der Aktivierung mit Kollagen gespalten worden. Dabei verlor der monoklonale GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> seine Bindungsstelle, dessen Epitop sich noch hinter der Thrombinspaltstelle befindet (Abb. 4.3.5.2).



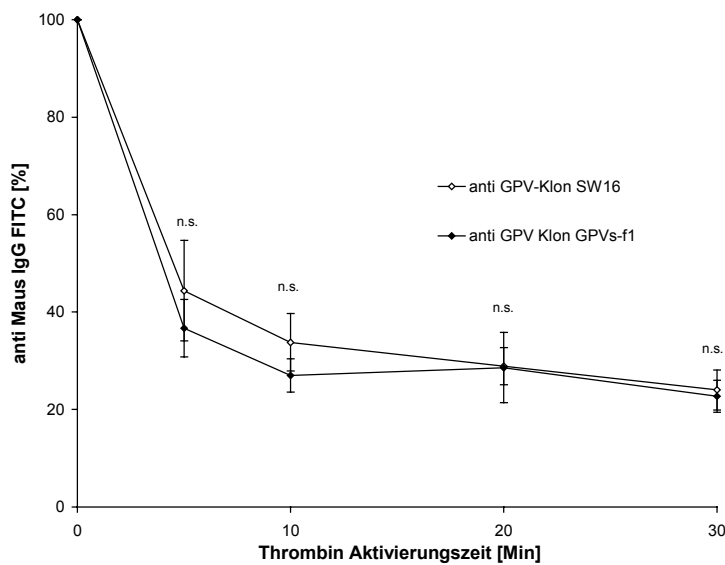
**Abb. 4.3.5.2: Struktur des GPV-Moleküls.** Hervorgehoben sind die Epitope, an denen die unterschiedlichen anti GPV-Antikörper anbinden.

Nach Erkenntnis derselben Zeitabhängigkeit wurde untersucht, ob die Abnahme der Bindungsstellen für beide Antikörper bei Thrombin- oder Kollagenaktivierung gleichzeitig oder zeitversetzt erfolgt. Dazu wurde zuerst die Thrombozytenaktivierung mit Kollagen für verschiedene Zeiten durchgeführt und die Bindungsstellenzahl für beide Antikörper untersucht.



**Abb. 4.3.5.3: Der Verlust der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper Klone SW16 und GPV<sub>s-f1</sub> verläuft nach Aktivierung der Plättchen mit Kollagen simultan.** Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper SW16 und GPV<sub>s-f1</sub> nach Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen für 5, 10, 20 oder 30 Minuten. Die Plättchen wurden anschließend fixiert, gewaschen und mit den Klonen GPV<sub>s-f1</sub>, bzw. SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Man erkennt, dass die Anzahl der Bindungsstellen für beide monoklonalen Antikörper, SW16 und GPV<sub>s-f1</sub>, auf der Plättchenoberfläche simultan während der Aktivierung mit Kollagen abnahm. Die gleiche Untersuchung wurde auch für die Aktivierung mit Thrombin durchgeführt.

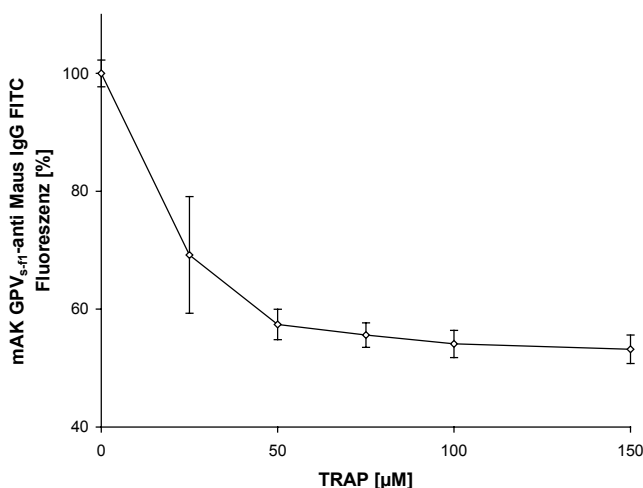


**Abb. 4.3.5.4: Der Verlust der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper Klone SW16 und GPV<sub>s-fl</sub> verläuft nach Aktivierung der Plättchen mit Thrombin simultan.** Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper SW16 und GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit 1 U/ml Thrombin für 5, 10, 20 oder 30 Minuten. Die Plättchen wurden anschließend fixiert, gewaschen und mit den Klonen GPV<sub>s-fl</sub>, bzw. SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

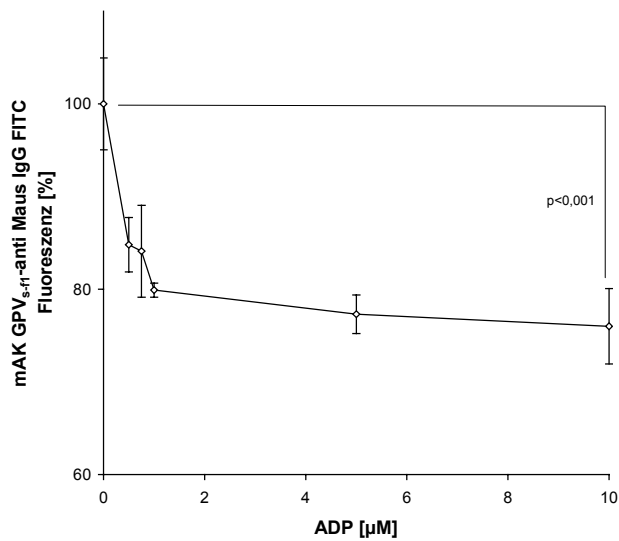
Erneut war bei der Thrombinaktivierung derselbe, simultane Bindungsstellenverlust für beide GPV Klone wie bei der Kollagenaktivierung zu sehen.

#### 4.3.6 Wird die Spaltung des GPV bei jeder Plättchenaktivierung beobachtet?

In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob die GPV-Spaltung ein generelles Phänomen der Plättchenaktivierung ist. Dazu wurden die Plättchen mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und untersucht, ob ähnliche Bindungsstellenverluste, wie bei Aktivierung mit Thrombin und Kollagen, zu erkennen waren.

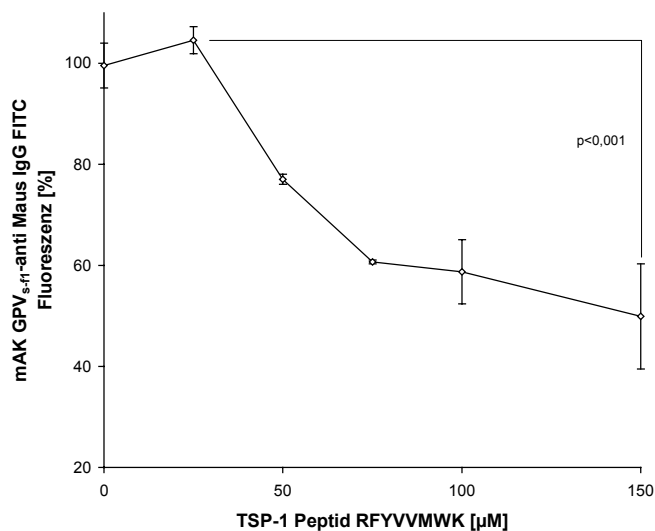


**Abb. 4.3.6.1: TRAP Aktivierung der Plättchen führt Thrombin-unabhängig zu einer Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit TRAP für 10 min. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach der Aktivierung fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Ak sekundärmarkiert, n=3.



**Abb. 4.3.6.2: ADP Aktivierung der Plättchen führt Thrombin-unabhängig zu einer Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>.**

Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit ADP für 10 min. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach der Aktivierung fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.



**Abb. 4.3.6.3: RFYVVMWK Aktivierung der Plättchen führt Thrombin-unabhängig zu einer Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>.**

Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK für 10 min. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach der Aktivierung fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Sowohl durch die Aktivierung mit dem „thrombin receptor activating protein“ (TRAP), als auch mit dem Plättchenagonisten ADP, als auch mit dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK wurde eine Spaltung des GPV Proteins detektiert, was den Abb. 4.3.6.1 bis 3 zu entnehmen war.

Die prozentuale GPV-Spaltung ist allerdings unterschiedlich, die durch ADP hervorgerufene GPV-Spaltung war signifikant geringer (Tab. 4.3.6.1).

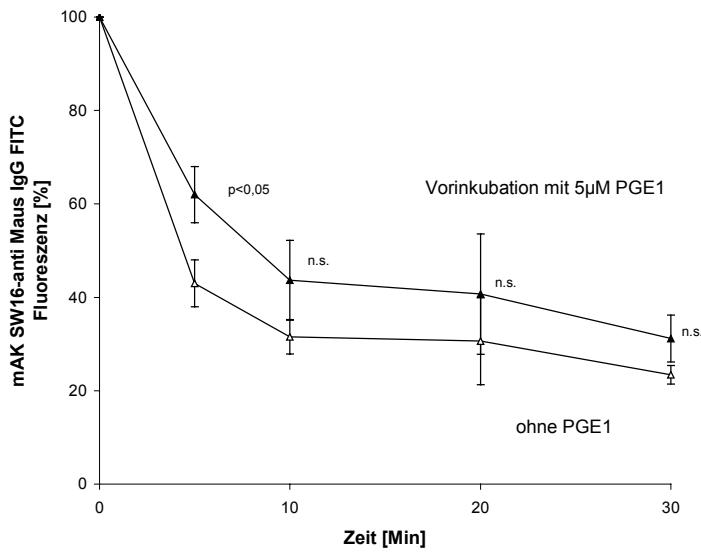
Agonist, der die GPV-Spaltung induziert	max. Verlust der anti GPV Antikörper Bindungsstellen [%]
Thrombin	77,4
Kollagen	62,1
TSP-1 Peptid RFYVVMWK	50,1
TRAP	46,8
ADP	24

**Tab. 4.3.6.1: ADP induziert im Vergleich zu Thrombin, Kollagen, TSP-1 Peptid RFYVVMWK und TRAP die GPV-Spaltung am geringsten.** Vergleich der prozentualen Bindungsstellenabnahme für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> induziert durch unterschiedliche Plättchenagonisten.

#### 4.3.7 Inhibierung der GPV-Spaltung durch unterschiedliche Aktivierungs-Antagonisten

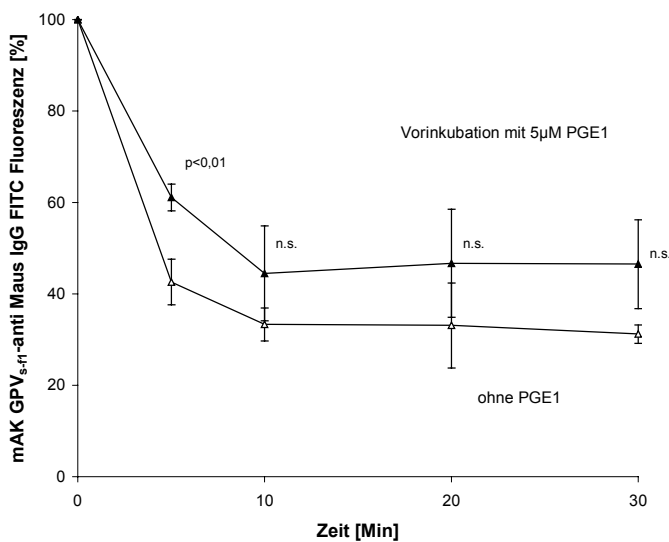
##### 4.3.7.1 Aktivierung der Adenylat Cyclase

Daraufhin wurde versucht, durch Zugabe unterschiedlicher Aktivierungs-Antagonisten die GPV Spaltung zu inhibieren. Es wurden zuerst Inhibitoren eingesetzt, die zum Verständnis des Signaltransduktionswegs dienen. Iloprost und PGE1 inhibieren die Plättchenaktivierung durch Aktivierung der Adenylat Cyclase. Es wurde mit Thrombin die GPV Spaltung durchgeführt und mit den beiden oben beschriebenen Antikörpern, die ihr Epitop entweder aminoterminal zur Thrombin-Spaltstelle, oder carboxyterminal zur Spaltstelle besitzen, untersucht, ob eine Inhibierung der GPV Spaltung erreicht werden konnte.



**Abb. 4.3.7.1.1: PGE1 hat in der Anfangsphase der Aktivierung der Thrombozyten eine inhibierende Wirkung auf die Aktivierungsabhängige Spaltung von GPV.**

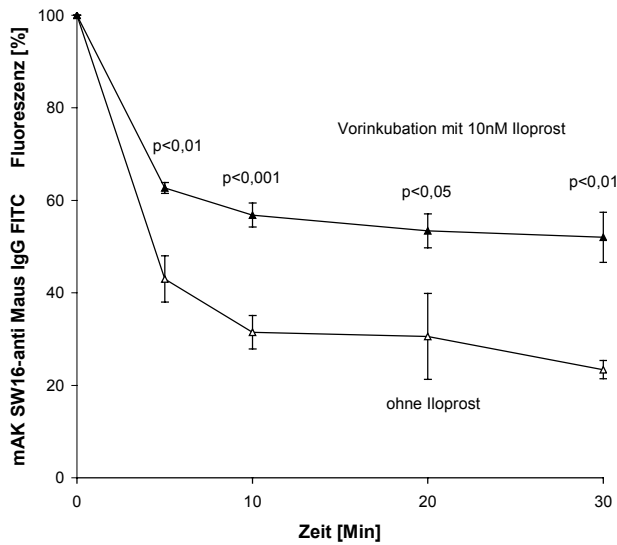
Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon SW16 nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5 µM des Inhibitors PGE1 für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem Klon SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.



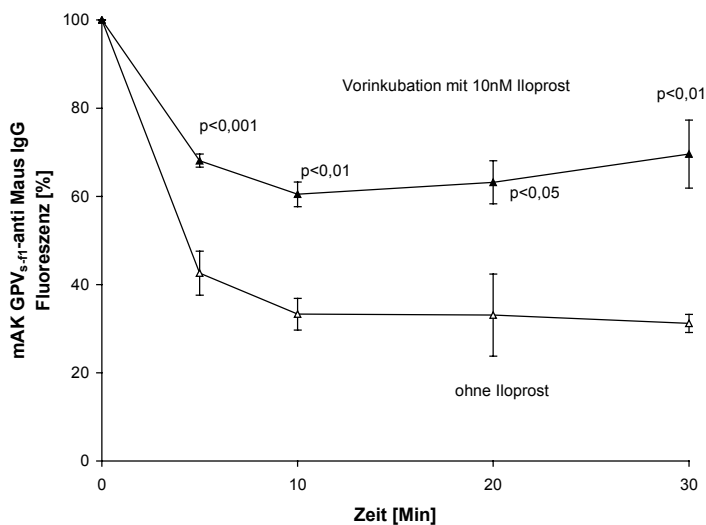
**Abb. 4.3.7.1.2: PGE1 inhibiert in der Anfangsphase der Aktivierung der Thrombozyten auch die Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers GPV<sub>s-f1</sub>,**

**dessen Epitop außerhalb des durch Thrombin abgespaltenen Bereichs liegt.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-f1</sub> nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5 µM des Inhibitors PGE1 für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-f1</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.





**Abb. 4.3.7.1.3: Iloprost hat eine inhibierende Wirkung auf die aktivierungsabhängige Spaltung von GPV.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon SW16 nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5  $\mu$ M des Inhibitors Iloprost für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem Klon SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

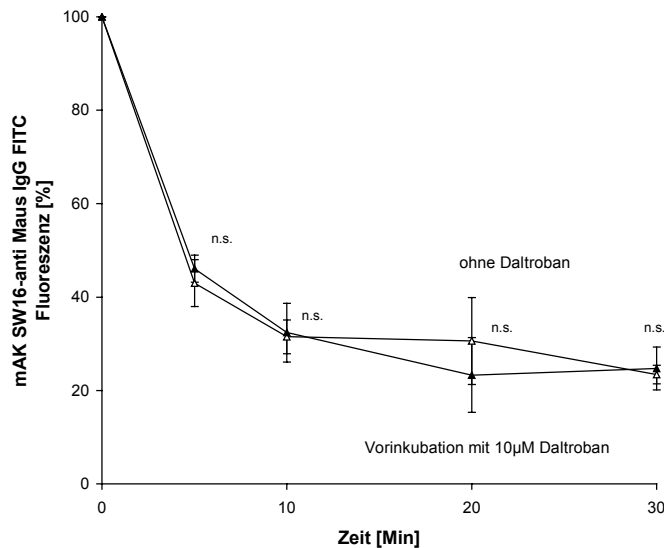


**Abb. 4.3.7.1.4: Iloprost inhibiert die Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers GPV<sub>s-fl</sub>, dessen Epitop außerhalb des durch Thrombin abgespaltenen Bereichs liegt.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5  $\mu$ M des Inhibitors Iloprost für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Den Abb. 4.3.7.1.1 bis 4 ist zu entnehmen, dass die Aktivierung der Adenylat Cyclase durch Prostaglandin E1 und Iloprost in den eingesetzten Konzentrationen eine inhibierende Wirkung auf die Thrombin induzierte GPV Spaltung hatte. Dabei war die Spaltung des GPV an beiden Spaltstellen zu erkennen, die Bindungsstellen beider monoklonaler Antikörper nahmen ab.

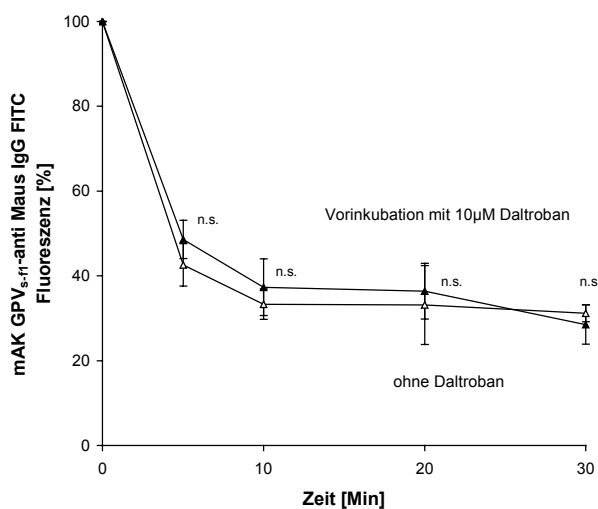
### 4.3.7.2 Inhibierung des Thromboxanwegs

Ein weiterer Weg, Thrombozyten zu aktivieren, verläuft über Thromboxan. Daltroban, ein Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist, wurde vor Aktivierung zugegeben und die Thrombin induzierte GPV Spaltung zu hemmen versucht.



**Abb. 4.3.7.2.1: Der Thromboxan-A<sub>2</sub> Rezeptor-Antagonist Daltroban inhibiert nicht die Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon SW16 nach Aktivierung der Thrombozyten.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon SW16 nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5 µM des Inhibitors Daltroban für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert,

gewaschen und mit dem Klon SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.



**Abb. 4.3.7.2.2: Der Thromboxan-A<sub>2</sub> Rezeptor-Antagonist Daltroban inhibiert nicht die Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung der Thrombozyten.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Vor Aktivierung der Plättchen wurden diese mit 5 µM des Inhibitors Daltroban für 5 min vorinkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert,

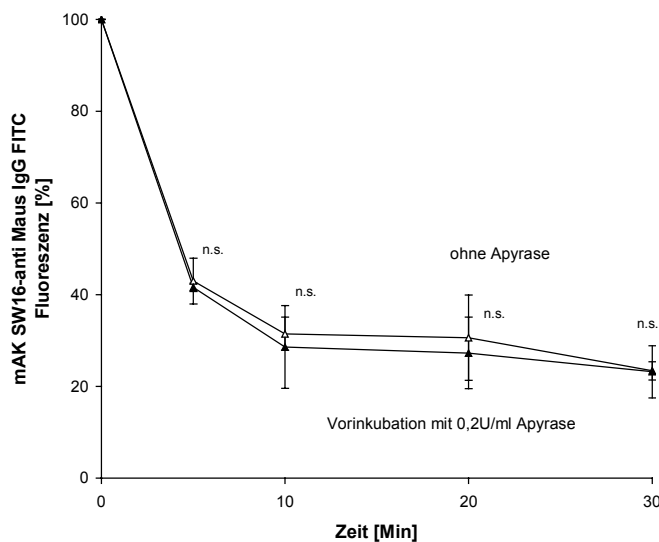
gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

Die Zugabe des Thromboxan-A<sub>2</sub> Rezeptor-Antagonisten Daltroban konnte die Thrombin induzierte GPV Spaltung nicht hemmen. In den Abbildungen 4.3.7.2.1 und 2 konnte kein Unterschied durch Zugabe des Antagonisten erkannt werden.

#### 4.3.7.3 Inhibierung des ADP-Wegs

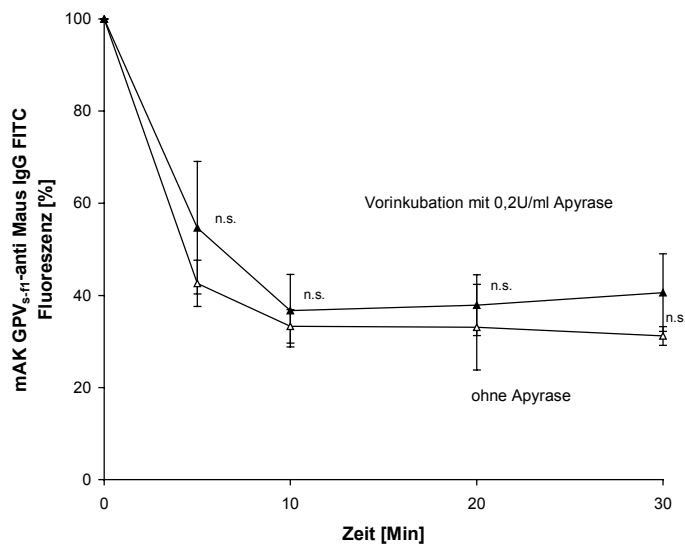
Ein anderer Weg der Thrombozytenaktivierung verläuft über Adenosindiphosphat (ADP), das ein direkter Plättchenagonist ist und Plättchen über mindestens zwei Rezeptoren aktiviert. Ein bekannter Inhibitor für ADP ist Apyrase. In Gegenwart von Apyrase kann ADP die Thrombozyten nicht aktivieren.

Es wurde untersucht, ob Apyrase der Spaltung von GPV durch Thrombin entgegenwirkte.



**Abb. 4.3.7.3.1: Inhibierung der Plättchenaktivierung mit ADP durch das Enzym Apyrase hat keinen Einfluss auf die aktivierungsbedingte Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon SW16.**

Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon SW16 nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Die Aktivierung wurde durch 5 min Vorinkubation mit 0,2 U/ml Apyrase zu inhibieren versucht. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem Klon SW16 inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

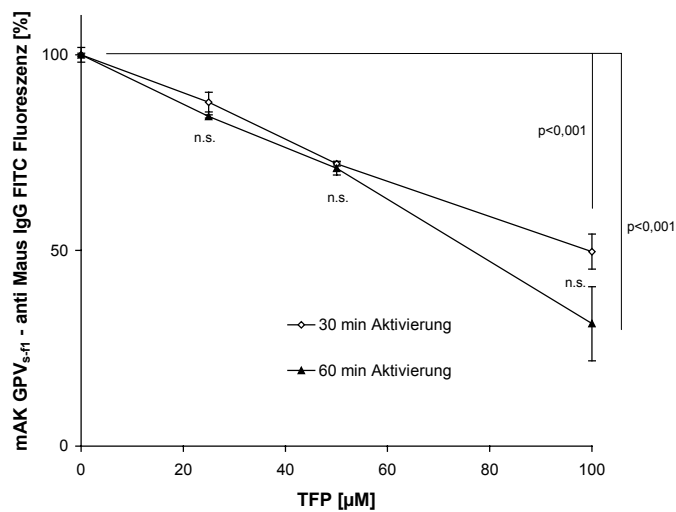


**Abb. 4.3.7.3.2: Inhibierung der Plättchenaktivierung mit ADP durch das Enzym Apyrase hat keinen Einfluss auf die aktivierungsbedingte Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Aktivierung mit 2 U/ml Thrombin. Die Aktivierung wurde durch 5 min Vorinkubation mit 0,2 U/ml Apyrase zu inhibieren versucht. Nach der Aktivierung wurde fixiert, die Plättchen gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

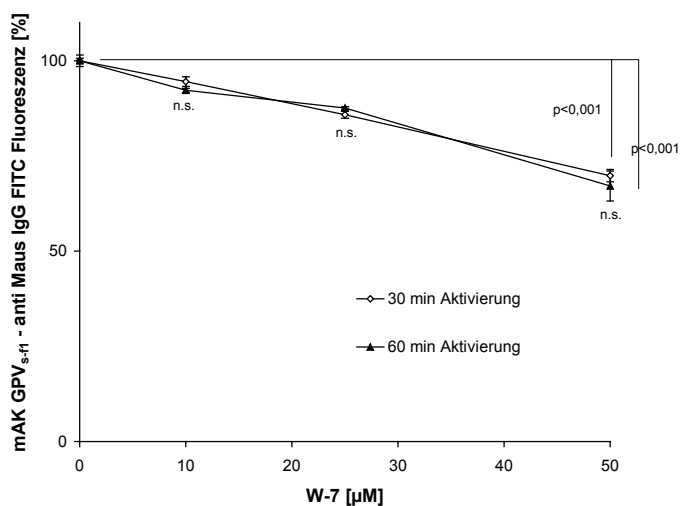
Die Blockierung des ADP-Aktivierungswegs durch Vorinkubation der Plättchen mit Apyrase hatte keinen Einfluss auf die Thrombin induzierte Spaltung des Glykoprotein V, die Kurvenverläufe in den Abb. 4.3.7.3.1 und 2 sind nahezu identisch.

#### 4.3.8 Zusammenhang zwischen dem Glykoproteinkomplex Ib/V/IX und zytosolischem Calmodulin?

Ähnlich wie beim Leukozytenadhäsionsrezeptor L-Selektin bindet Calmodulin an den zytoplasmatischen Teil von GPV. Da die Assoziation von Calmodulin zum zytoplasmatischen Teil des Membranproteins die proteolytische Spaltung des L-Selektin von der Oberfläche reguliert, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die Assoziation des Calmodulin mit GPV die gleiche Funktion haben könnte. Es wurde untersucht, ob die Zugabe der Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin (TFP) und N-(6-Aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalen Sulfonamid HCl (W-7) die Spaltung von GPV bewirkt.



**Abb. 4.3.8.1: Inhibition von Calmodulin durch den Inhibitor TFP führt zu der Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper GPV<sub>s-fl</sub>.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentration an Trifluoperazin, TFP, für 30, bzw. 60 min. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach Reaktion fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.



**Abb. 4.3.8.2: Inhibition von Calmodulin durch den Inhibitor W-7 führt zu der Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper GPV<sub>s-fl</sub>.** Abnahme der Bindungsstellen des anti GPV Antikörpers Klon GPV<sub>s-fl</sub> nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentration an W-7 für 30, bzw. 60 min. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert und die Plättchen nach Reaktion fixiert, gewaschen und mit dem Klon GPV<sub>s-fl</sub> inkubiert. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert, n=3.

In Anwesenheit von Calmodulin-Antagonisten wurde bei ruhenden Plättchen eine zeitabhängige GPV Spaltung induziert. Die Abb. 4.3.8.1 und 2 zeigen eine signifikante Abnahme der GPV-Antikörper-Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Die Reaktion war nach 30 min abgeschlossen, wie der Vergleich der Aktivierung bei

30 und 60 min zeigt. Dabei wirkt der Antagonist TFP stärker als der Antagonist W-7 (Tab. 4.3.8.1).

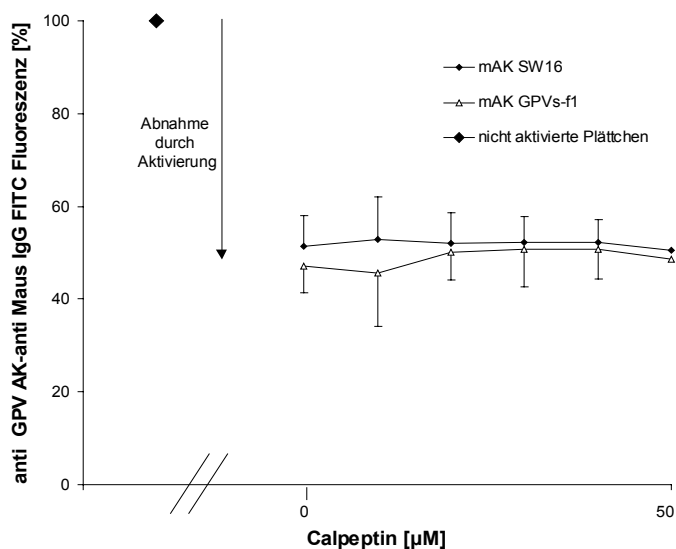
Calmodulin Antagonist	Abnahme der GPV Bindungsstellen [%]
TFP [100 $\mu\text{M}$ ]	50,3
W-7 [50 $\mu\text{M}$ ]	30,2

**Tab. 4.3.8.1:** Der Calmodulin Antagonisten TFP induziert die Abnahme der Bindungsstellen für den anti GPV Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub> stärker als der Antagonist W-7.

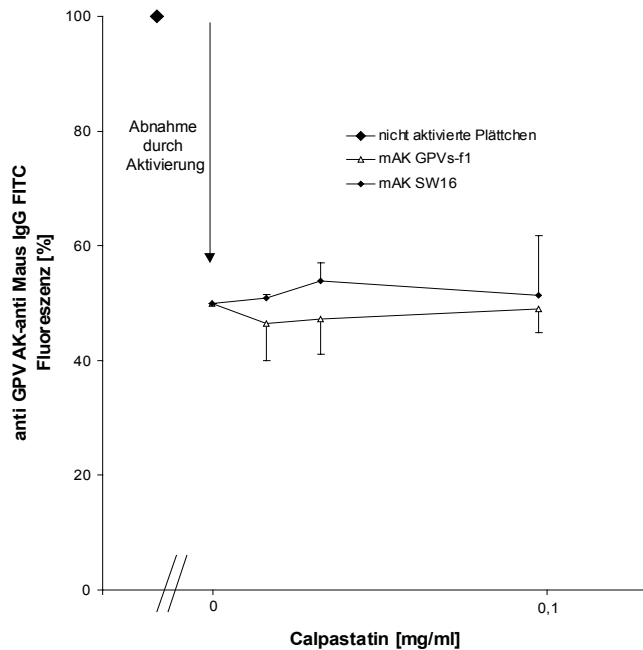
### 4.3.9 Welche Protease spaltet das Glykoprotein V transmembrannah?

#### 4.3.9.1 Calpain?

In der Literatur ist zu finden, dass Calpain vermutlich die Protease ist, die an der membrannahen Spaltstelle GPV zu dem GPV<sub>s</sub> Fragment spaltet. Zur Verifizierung dieser These wurden Hirudin-antikoagulierte Thrombozyten mit Kollagen aktiviert. Die Kollagen induzierte Plättchenaktivierung wurde in Gegenwart unterschiedlicher Calpain-Inhibitoren durchgeführt. Nach Inhibierung des Calpain und des Thrombin dürfte, falls diese These richtig ist, keine GPV Spaltung nach Thrombozytenaktivierung mehr erfolgen.



**Abb. 4.3.9.1.1:** Der Calpaininhibitor Calpeptin inhibiert nicht die Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper nach Plättchenaktivierung. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Vorinkubation mit Calpeptin in einem Bereich von 0-50  $\mu\text{M}$  folgte 30 min Aktivierung mit 2  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit Klon SW16, bzw. Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Positivkontrolle dient die Anbindung der Klone an nicht-aktivierte Plättchen, n=3.



#### Abb. 4.3.9.1.2: Der Calpaininhibitor Calpastatin inhibiert die Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV

#### Antikörper nach Plättchenaktivierung

nicht. Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Vorinkubation mit Calpastatin in einem Bereich von 0-0,1 mg/ml folgte 30 min Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit Klon SW16, bzw. Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Positivkontrolle dient die Anbindung der Klone an nichtaktivierte Plättchen, n=3.

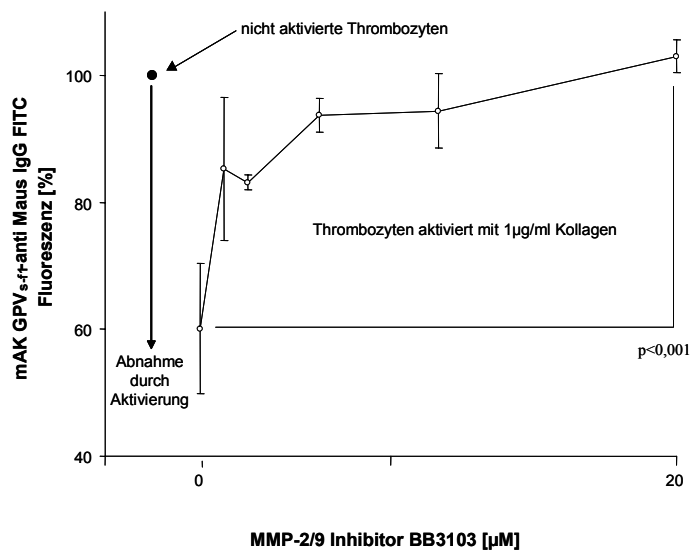
Durch Vorinkubation mit unterschiedlichen Calpain-Inhibitoren konnte aber die Kollagen induzierte GPV Spaltung nicht unterdrückt werden (Abb. 4.3.9.1.1 und 2). Calpain scheint nicht die Protease zu sein, die GPV transmembrannah spaltet.

#### 4.3.9.2 Matrixmetalloproteinasen?

Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind Matrixmetalloproteinasen, die von Thrombozyten freigesetzt werden. Matrixmetalloproteinasen sind dafür bekannt, Zellen zu aktivieren und Proteine zu spalten.

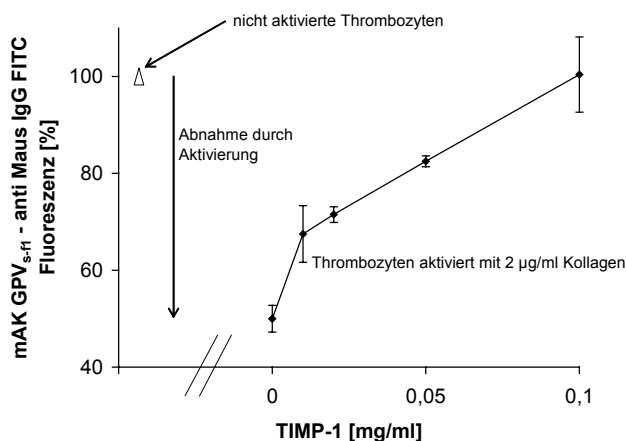
Deshalb wurde untersucht, ob Kollagen bei der Aktivierung von Thrombozyten mit Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 kooperiert, um die GPV Spaltung zu induzieren.

Dazu wurden zu Hirudin-antikoagulierten Thrombozyten unterschiedliche MMP-Inhibitoren vor Kollagenaktivierung gegeben, um eine Spaltung möglicherweise zu hemmen.



**Abb. 4.3.9.2.1: Der MMP Inhibitor BB3103 inhibiert dosisabhängig die Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper nach Plättchenaktivierung.** Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Vorinkubation mit dem MMP-Inhibitor BB3103 der Firma British Biotech im Bereich von 0-20 μM (5 min) folgte 30 min Aktivierung mit 1 μg/ml Kollagen. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit dem anti GPV AK Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Positivkontrolle ist die Anbindung des anti GPV-Klons an nichtaktivierte Plättchen gezeigt, n=3.

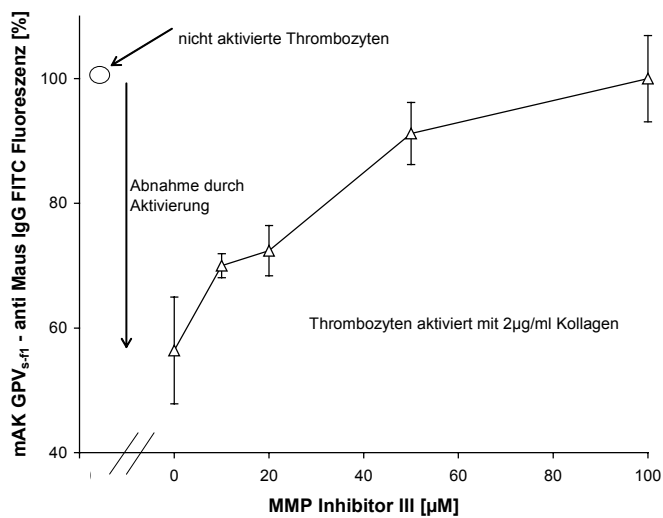
Der MMP-Inhibitor BB3103 der Firma British Biotech, der mit beiden Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 in Wechselwirkung tritt, inhibierte die Kollagen-induzierten GPV-Spaltung dosisabhängig, wie in der Abb. 4.3.9.2.1 veranschaulicht wird.



**Abb. 4.3.9.2.2: Der MMP Inhibitor TIMP-1 inhibiert dosisabhängig die Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper nach Plättchenaktivierung.** Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Vorinkubation mit dem MMP-Inhibitor TIMP-1 im Bereich 0-0,1 mg/ml folgte 30 min Aktivierung mit 2 μg/ml Kollagen. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit dem anti GPV AK Klon GPV<sub>s-fl</sub>.

Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Positivkontrolle ist die Anbindung des anti GPV-Klons an nichtaktivierte Plättchen gezeigt, n=3.



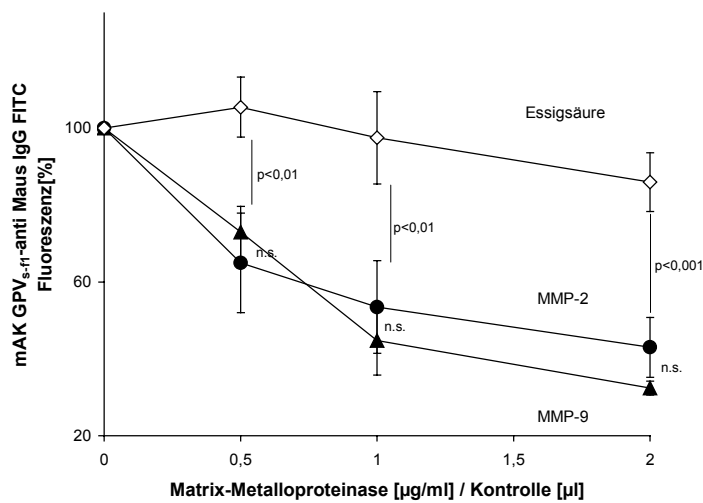


**Abb. 4.3.9.2.3: Der MMP Inhibitor III inhibiert dosisabhängig die Abnahme der Bindungsstellen der anti GPV Antikörper nach Plättchen-aktivierung.** Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Vorinkubation mit dem MMP-Inhibitor III im Bereich von 0-100 µM folgte 30 min Aktivierung mit 2 µg/ml Kollagen. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit dem anti GPV AK Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Danach wurde mit anti Maus IgG

FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Positivkontrolle ist die Anbindung des anti GPV-Klons an nichtaktivierte Plättchen gezeigt, n=3.

Daraufhin wurden die Thrombozyten auf GPV-Spaltung nach Vorinkubation mit spezifischen MMP-Inhibitoren untersucht. Sowohl bei der Vorinkubation mit dem MMP-9-Inhibitor (Abb. 4.3.9.2.2), als auch bei der Untersuchung mit dem MMP-2 Inhibitor (Abbildung 4.3.9.2.3) war eine dosisabhängige Inhibierung der GPV Spaltung nach Kollagenaktivierung zu erkennen. Sowohl die Blockade der MMP-2, als auch die Blockade der MMP-9, verhinderte die Kollagen-induzierten GPV Spaltung.

Nach den Ergebnissen, die durch die Inhibierung der Gelatinasen erhalten wurden, war zu klären, ob die aktivierten Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 (Gelatinasen A und B) GPV auf der Thrombozytenoberfläche selbst spalten.



**Abb. 4.3.9.2.4: Aktivierte MMP 2 und MMP 9 spalten dosisabhängig GPV.** Das Blut wurde mit 10 U/ml Hirudin antikoaguliert. Die Aktivierung der Thrombozyten wurde für 30 min mit den aktivierten Metalloproteinasen (in Essigsäure) durchgeführt. Nach Fixierung und Waschen der Plättchen folgte die Inkubation mit dem anti GPV AK Klon GPV<sub>s-fl</sub>. Danach wurde mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Als Negativkontrolle wurde die Aktivierung mit gleichen Mengen an Essigsäure durchgeführt, in denen die MMPs gelöst waren, n=3.

Es war zu erkennen, dass beide aktivierten Gelatinasen auf Hirudin-antikoagulierten Thrombozyten das Glykoprotein V dosisabhängig spalteten.

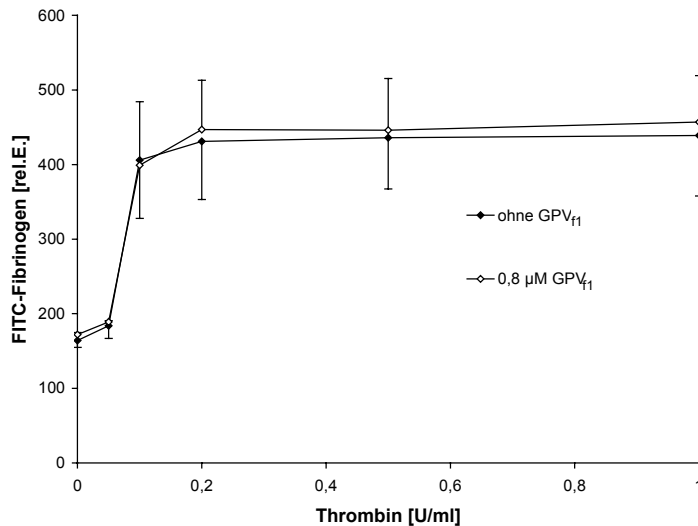
Das Medium (Essigsäure-haltig), in dem die Metalloproteinasen aktiviert wurden und danach vorlagen, hatte keinen bedeutenden Einfluss auf die Spaltung.

#### 4.3.10 Biologische Rolle des Glykoprotein V und seiner Fragmente

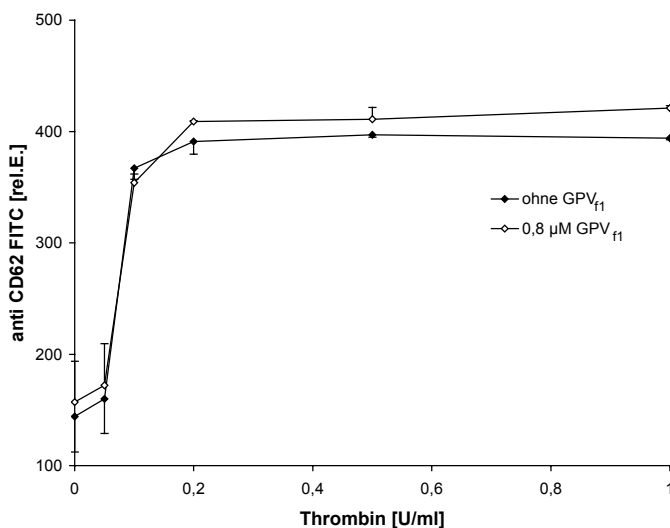
Die Spaltung des Glykoprotein V in der späten Phase der Hämostase lässt vermuten, dass die Spaltprodukte eine biologische Funktion bei der Hämostase haben. Daher wurden die biologischen Funktionen der GPV-Fragmente im Folgenden getestet. Da Thrombin in mehrere positive und negative Rückkopplungseffekte eingebunden ist, war es von besonderem Interesse zu klären, ob das kleinere GPV-Spaltstück, GPV<sub>fl</sub>, das nach Thrombin-Spaltung des GPV<sub>s</sub>-Fragments entsteht, die klassischen Funktionen der Plättchen beeinflusst. GPV<sub>fl</sub> wurde dazu wie beschrieben (s. Kap. 4.3.1) gereinigt und eingesetzt. Es wurde eine Konzentration verwendet, die in dem Bereich liegt, der in vivo in der Nähe eines Thrombusgeschehens erwartet werden kann.

### 4.3.10.1 Einfluss auf die Plättchenaktivierung

Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich auf mögliche biologische Funktionen des Fragments  $GPV_{f1}$ .  $GPV_{f1}$  wurde (wie beschrieben) gereinigt und eingesetzt.

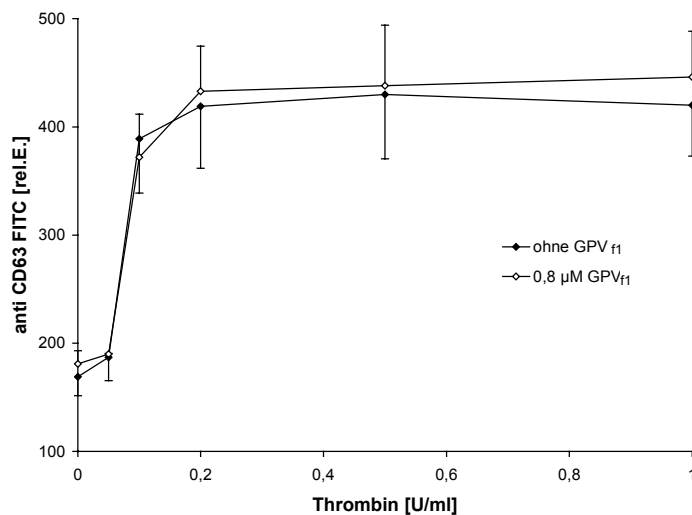


**Abb. 4.3.10.1.1:  $GPV_{f1}$  in einer Konzentration von 0,8  $\mu M$  inhibiert nicht die Thrombin-induzierte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten.** Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit FITC-Fibrinogen (150  $\mu g/ml$ ) inkubiert. Die Aktivierungszeit des Thrombin (+ 1,25 mM GPRP) betrug 3 min. Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und danach die Fibrinogen Anbindung gemessen. Das  $GPV_{f1}$  Fragment  $GPV_{f1}$  wurde in einer Konzentration von 0,8  $\mu M$  10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.



**Abb. 4.3.10.1.2:  $GPV_{f1}$  in einer Konzentration von 0,8  $\mu M$  inhibiert nicht die Thrombin-induzierte Sekretion der  $\alpha$ -Granula und dadurch die Präsentation von P-Selektin auf der Plättchenoberfläche.** Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit Thrombin für 3 min aktiviert (+1,25 mM GPRP). Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem anti CD62-

FITC Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Antikörperanbindung gemessen. Das  $GPV_{f1}$  Fragment  $GPV_{f1}$  wurde in einer Konzentration von 0,8  $\mu M$  10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.



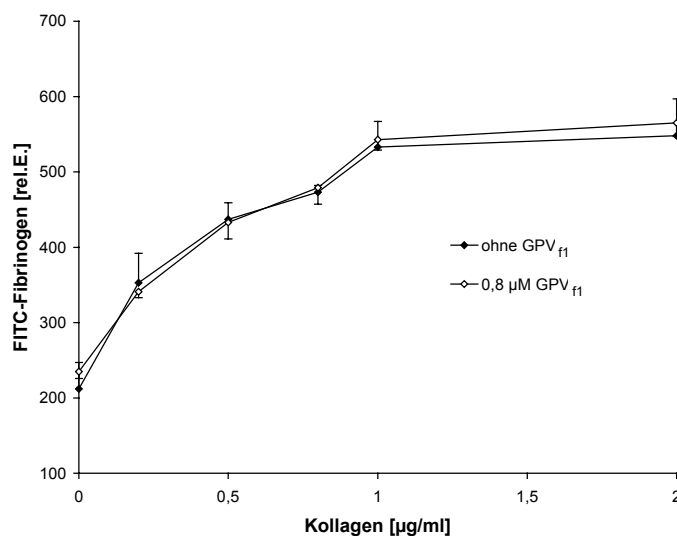
**Abb. 4.3.10.1.3: GPV<sub>f1</sub> in einer Konzentration von 0,8 µM inhibiert nicht die Thrombin-induzierte Sekretion der elektronendichten Granula und dadurch die Präsentation von Granulophysin auf der Plättchenoberfläche.**

Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit Thrombin für 3 min aktiviert (+ 1,25 mM GPRP).

Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit

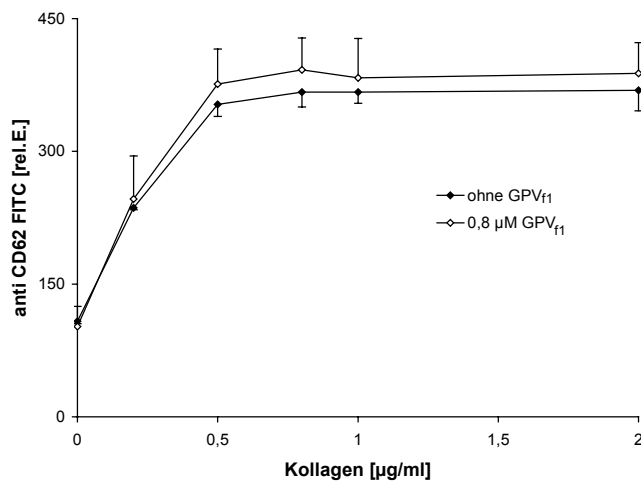
dem anti CD63-FITC Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Antikörperanbindung gemessen. Das GPV Fragment GPV<sub>f1</sub> wurde in einer Konzentration von 0,8 µM 10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.

Es wurde deutlich, dass die Zugabe des GPV-Fragments GPV<sub>f1</sub> vor der Plättchenaktivierung weder Einfluss auf die Fibrinogen Bindung, noch auf die Expression des P-Selektin, bzw. des Granulophysins, hatte. Dieses GPV-Fragment spielt somit für die Plättchenaktivierung mit Thrombin in der eingesetzten Konzentration keine signifikante Rolle. Da die eingesetzte Konzentration im oberen Bereich dessen liegt, was in vivo erwartet werden kann, wurden keine weiteren Versuche mit GPV<sub>f1</sub> in geringeren Konzentrationen durchgeführt.



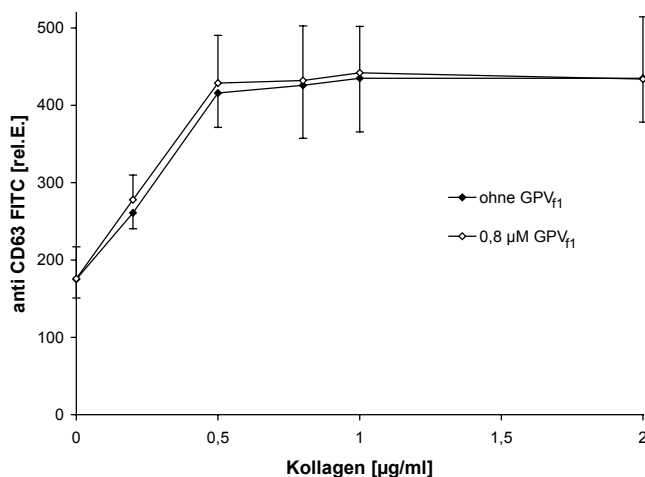
**Abb. 4.3.10.1.4: GPV<sub>f1</sub> in einer Konzentration von 0,8 µM inhibiert nicht die Kollagen-induzierte Fibrinogen Bindung an Thrombozyten.**

Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit FITC-Fibrinogen (150 µg/ml) inkubiert. Die Aktivierungszeit des Kollagens betrug 3 min. Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und danach die Fibrinogen Bindung gemessen. Das GPV Fragment GPV<sub>f1</sub> wurde in einer Konzentration von 0,8 µM 10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.



**Abb. 4.3.10.1.5: GPV<sub>f1</sub> in einer Konzentration von 0,8 µM inhibiert nicht die Kollagen-induzierte Sekretion der α-Granula und dadurch die Präsentation von P-Selektin auf der Plättchenoberfläche.** Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit Kollagen für 3 min aktiviert. Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem anti CD62-FITC Antikörper für 1 h bei

RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Antikörperanbindung gemessen. Das GPV Fragment GPV<sub>f1</sub> wurde in einer Konzentration von 0,8 µM 10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.



**Abb. 4.3.10.1.6: GPV<sub>f1</sub> in einer Konzentration von 0,8 µM inhibiert nicht die Kollagen-induzierte Sekretion der elektronendichten Granula und dadurch die Präsentation von Granulophysin auf der Plättchenoberfläche.**

Plättchen wurden aus Citrat-Blut gewonnen und mit Kollagen für 3 min aktiviert. Nach Aktivierung wurden die Plättchen fixiert, gewaschen und mit dem anti CD63-FITC Antikörper für 1 h bei RT

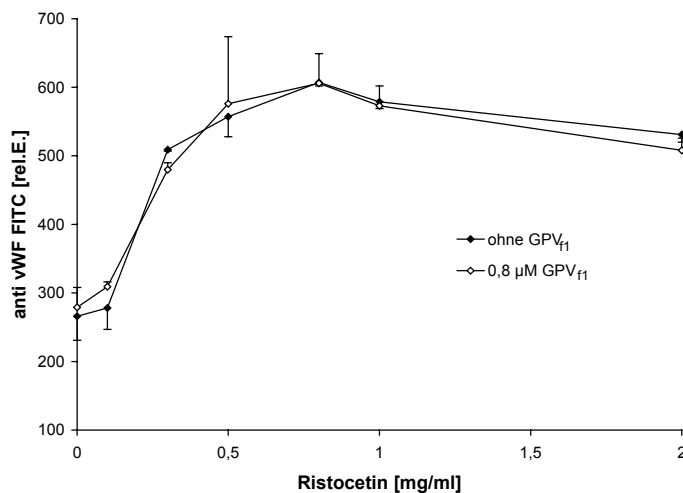
inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Antikörperanbindung gemessen. Das GPV Fragment GPV<sub>f1</sub> wurde in einer Konzentration von 0,8 µM 10 min vor Aktivierung zugesetzt, n=3.

Bei der Thrombozytenaktivierung mit Kollagen hatte das GPV Fragment GPV<sub>f1</sub> keinen Einfluss auf die Fibrinogen Bindung, die P-Selektin-Expression und die Granulophysin-Expression. Die Plättchenaktivierung durch Kollagen war in der eingesetzten Konzentration GPV<sub>f1</sub>-Fragment unabhängig. Da die eingesetzte Konzentration im oberen Bereich dessen liegt, was in vivo erwartet werden kann, wurden keine weiteren Versuche mit GPV<sub>f1</sub> in geringeren Konzentrationen durchgeführt.

#### 4.3.10.2 Einfluss auf die von Willebrand Faktor Bindung

Werden Thrombozyten mit Ristocetin aktiviert, kann der von Willebrand Faktor an der Plättchenoberfläche anbinden.

Daher wurde untersucht, wie sich die Präsenz des GPV-Fragments  $GPV_{f1}$  auf die Bindung des von Willebrand Faktors auswirkte.



**Abb. 4.3.10.2.1:  $GPV_{f1}$  in einer Konzentration von  $0,8 \mu\text{M}$  inhibiert nicht die Ristocetin-induzierte vWF Bindung auf der Plättchenoberfläche.** Plättchen aus Citratblut wurden für 5 min mit Ristocetin aktiviert. Nach Fixierung und Waschen wurden die Plättchen mit anti von Willebrand Faktor Antikörper inkubiert (1h RT) und nach einem Waschschrift mit anti Maus IgG FITC Antikörper sekundärmarkiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Plättchen im Durchflusszytometer gemessen. 10 min vor der Aktivierung wurden die Thrombozyten mit  $0,8 \mu\text{M } GPV_{f1}$  vorinkubiert, n=3.

Wie in Abb. 4.3.10.2.1 zu erkennen war, induzierte Ristocetin dosisabhängig eine vWF Bindung, die sich durch erhöhte Bindung des anti vWF-Antikörpers ausdrückte.

Das Glykoprotein V-Fragment  $GPV_{f1}$  hatte keinen Einfluss auf die Ristocetin-induzierte von Willebrand Faktor Bindung an die Thrombozytenoberfläche. In der eingesetzten hohen Konzentration hatte  $GPV_{f1}$  keinen Einfluss auf klassische Thrombozyten-Funktionen, wie Bindung von Fibrinogen und vWF und Sekretion der  $\alpha$ -Granula und elektronendichten Granula, nach Aktivierung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Aktivierung von Blutplättchen durch Heparin

Heparin ist heutzutage das Mittel der Wahl, um postoperative, thrombotische Komplikationen zu vermeiden.

Manipulationen an der Gefäßwand, wie sie bei PTCA („Percutane Transluminale Coronar Angioplastie“), Stent, Gefäßprothese bei PAVK (peripherer arterieller Verschlusskrankheit) etc. vorgenommen werden, bedingen iatrogene Gewebsverletzungen, die zur Adhäsion von Blutplättchen führen. Die Inhibierung der Plättchenfunktion ist begleitend notwendig, um Gefäße langfristig offen zu halten. Dies geschieht in der Regel durch die Gabe von Aspirin und Heparin.

Heparin kann als negative Nebenwirkung jedoch direkt Thrombozyten aktivieren. Diese „Nebenwirkung“ ist klinisch relevant.

Primäre Plättchenaktivierung durch Heparin trägt zur Entstehung der HIT Typ II bei (s. Kap. 2.11). Weiter nehmen Knight et al (1998) an, dass die direkte Aktivierung der Plättchen durch Heparin ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Thrombosen ist, welche die Koronar-Stents wieder verschließen, und Arnljots et al (1997) glauben, dass die Plättchenaktivierung die Wirkung des Heparin bei arteriellen Thrombosen limitiert. Wir stellten nun die Arbeitshypothese auf, dass die direkte plättchenaktivierende Wirkung des Heparin die Hemmung des starken Plättchenagonisten Thrombin teilweise im Nettoeffekt wieder aufhebt oder überkompensiert und dass Heparin klinisch wirkungsvoller sein könnte, wenn man die direkte plättchenaktivierende Wirkung verstehen und inhibieren könnte.

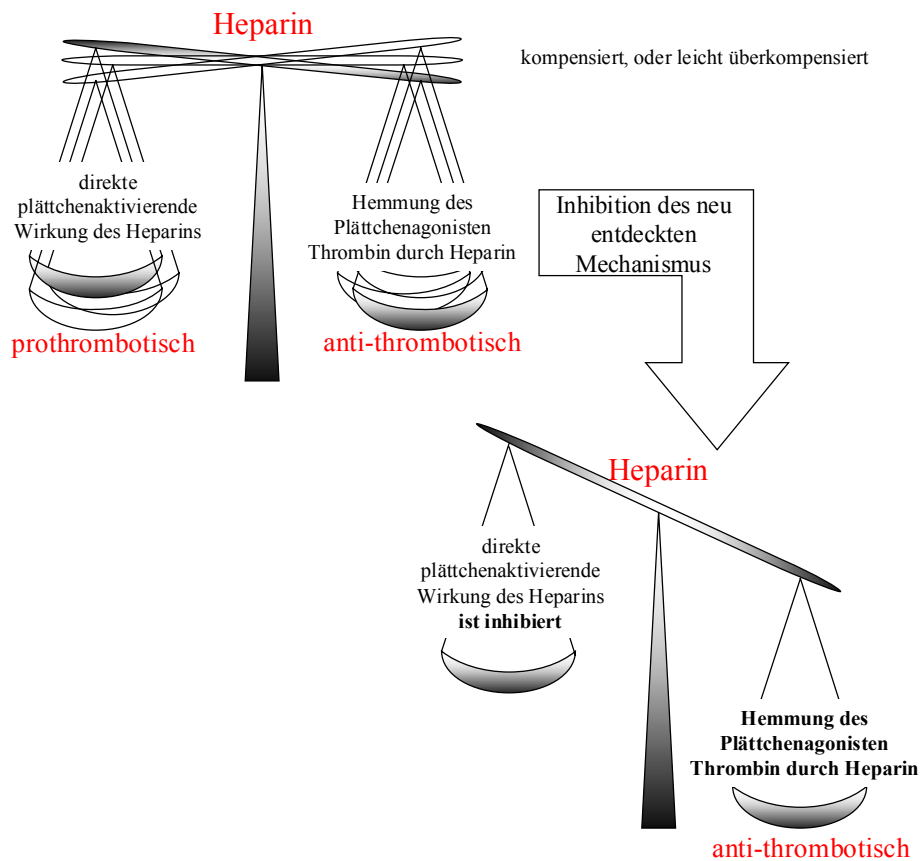


Abbildung 5.1.1: Schutz vor arteriellen Thrombosen durch Heparin

Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen von Arnljots et al 1997.

Heparin, welches nur eine geringe Affinität zu Antithrombin III (ATIII) hat, kommt in dem heterogenen Gemisch von unfraktioniertem Heparin (UF-Heparin) zu einem großen Anteil vor (bis zu 70%). Das Heparin mit geringerer Affinität zu ATIII hemmt Thrombin nur sehr geringfügig, hat aber sonst alle Eigenschaften des „thrombin-inhibierenden“ Heparin.

In Tierversuchen konnten Arnljots et al zeigen, dass dieses Heparin eine manifeste Aktivierung der Thrombozyten hervorruft. Schomig et al (1996) zeigten, dass der Hauptbestandteil (71%) der kardiologischen Ereignisse (Stent-Verschluss, Myokardinfarkt, etc.) bei Patienten mit koronar-arteriellen Stents innerhalb eines Zeitraums von 10 Tagen beobachtet wurden, also in der Patienten-Gruppe, die mit Heparin antikoaguliert wurde. Es ist wahrscheinlich, dass diese Ereignisse zumindest teilweise eine Konsequenz der direkten plättchenaktivierenden Wirkung des Heparin sind.

Daher sollte versucht werden, den für die Plättchenaktivierung durch Heparin zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären.



Dass Heparin Plättchen aktivieren kann, wurde schon von Eika 1972 publiziert. Ed Salzman und seine Mitarbeiter untersuchten dieses Phänomen im Detail (Salzman et al 1980).

Voraktivierte Plättchen reagieren auf Heparin empfindlicher als ruhende Plättchen. So ist diese Heparinwirkung bei Patienten auf Intensivstationen (Polytrauma, Sepsis) (Burgess und Chong 1997) oder bei Patienten mit peripheren arteriellen Gefäßverschlüssen (Reininger et al 1995) oder bei Patienten mit akutem Herzinfarkt (Noris et al 1993) deutlich ausgeprägter. Thrombozyten speichern Zink und setzen es bei der Aktivierung frei (Aktulga und Ulutin 1974). Wir beobachteten, dass Zink eine leicht aktivierende Wirkung auf Blutplättchen hat. Daher wurde den Versuchen zum Aktivierungsmechanismus mit Heparin Zink in Konzentrationen zugesetzt, wie es in der Umgebung von frisch aktivierten Plättchen vorkommt.

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein  $\alpha$ -Granula Protein, welches bei der Aktivierung freigesetzt wird und an die Plättchenoberfläche zurückbindet (Kehrel et al 1996). Etwa 25% allen Proteins, welches in den  $\alpha$ -Granula gespeichert wird, ist TSP-1. Es hat zwei Bindungsstellen für Heparin, wobei die N-terminale 25 kDa-Domäne Heparin mit hoher Affinität bindet (Dardik und Lahav 1987 und 1999). Es wurde daher untersucht, ob TSP-1 die Heparin induzierte Plättchenaggregation beeinflusst.

Über Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose konnte TSP-1 aus dem Überstand von aktivierten Thrombozyten isoliert werden. Die Silberfärbung und der Western-Blot nach SDS-PAGE zeigten zwei typische TSP-1 Proteinbanden, die charakteristisch sind für intaktes TSP-1 und TSP-1, welches am N-Terminus gespalten worden ist. Die Spaltung muss nach Ablösen von der Heparinsäule entstanden sein, da der gespaltene N-Terminus die Heparin-Bindungsstelle enthält. In nachfolgenden Versuchen konnte das Entstehen dieser Bande durch Zusatz des Thrombininhibitors Hirudin zum Elutionspuffer verhindert werden. Dies spricht für die Abspaltung des N-Terminus von TSP-1 durch überschüssiges Thrombin, welches den Plättchen zugesetzt worden und damit noch im Plättchenaktivierungsüberstand vorhanden war.

Heparin konnte ruhende Plättchen aus frisch abgenommenem Blut von gesunden, jungen Blutspendern nicht aggregieren. Wurden  $200 \mu\text{M Zn}^{2+}$  zugesetzt (das entspricht der von aktivierten Plättchen freigesetzten Konzentration), bildeten sich kleine Aggregate. Solche Mikroaggregate werden auch ex vivo bei Patienten unter Heparin-Therapie gefunden, die sich einer Haemofiltration unterziehen müssen (Leithner et al 1980). In Übereinstimmung mit der Literatur hatte unfraktioniertes (langkettiges) Heparin dabei eine größere

plättchenaggregierende Wirkung als gespaltenes, niedermolekulares Heparin (Klein et al 2002, Schneider et al 1997, Aster 1995). In Gegenwart von 200  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  löste TSP-1 ebenfalls eine ganz geringfügige Plättchenaggregation aus. Die Plättchenaggregation wird unter den gewählten Versuchsbedingungen (Aggregometer nach Born) durch eine Fibrinogenbrücke zwischen GPIIb/IIIa Molekülen auf verschiedenen Plättchen ausgelöst (B. Coller 1997).

Um dieses Aggregat zu verfestigen bedarf es der Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen (Kinlough-Rathbone et al 1983). Dem  $\alpha$ -Granula Protein Thrombospondin-1 wird eine festigende Wirkung zugesprochen, der Wirkmechanismus ist aber noch unbekannt (Legend et al 1992, Leung und Nachmann 1982).

Eine zusätzliche Querverbrückung, Verankerung durch die Bindung von TSP-1 an Fibrinogen, wurde postuliert (McGregor et al 1989). Die beobachtete geringfügige Plättchenaggregation durch die Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  und TSP-1 könnte über eine Quervernetzung durch TSP-1 von Plättchen erklärt werden, die, bedingt durch die leichte Voraktivierung mit  $\text{Zn}^{2+}$ , Fibrinogen auf ihrer Oberfläche tragen.

Überraschenderweise löste der Zusatz von Heparin und TSP-1 in Gegenwart von  $\text{Zn}^{2+}$  eine rasche, vollständige Plättchenaggregation aus. Der beobachtete Effekt war bedeutend stärker, als bei einem additiven Effekt zu erwarten gewesen wäre. Auch hier hatte unfraktioniertes, langkettiges Heparin eine deutlich stärkere Wirkung als niedermolekulares Heparin (NM-Heparin).

Die aggregationssteigernde Wirkung des TSP-1 war abhängig von der Konzentration des eingesetzten TSP-1 und erreichte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ihr Maximum. Dies ist eine TSP-1 Konzentration, wie sie auch in der Umgebung von frisch sezernierenden Plättchen vorkommt (Kehrel et al 1996). Dabei können an UF-Heparin mehr TSP-1 Moleküle binden als an NM-Heparin.

Ob die Bindung von Heparin an TSP-1 bei der beobachteten, starken Aggregationswirkung eine Rolle spielt, wurde untersucht, indem rekombinantes TSP-1 eingesetzt wurde, dem die Heparin-Bindungsdomäne (HBD) fehlte (TSP-GP140). Dieses TSP-1 ohne N-terminale Heparin-Bindungsdomäne zeigte in Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  keinerlei aggregationsauslösende oder aggregationsverstärkende Effekte.

Dies spricht dafür, dass Heparin direkt mit dem TSP-1 zusammen die Aggregation auslöst. Dardik und Lahav (1999) beobachteten, dass durch Bindung von Heparin an TSP-1 dieses in eine Konformation versetzt wird, die das TSP-1 wahrnimmt, wenn es  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden hat.

Verschiedene Funktionen des TSP-1 werden über Konformationsänderungen reguliert. So sind die Eigenschaften des TSP-1 zelluläre Adhäsionen zu vermitteln, verschiedene Proteasen zu inhibieren und über das Sequenzmotiv RGD an Integrine binden zu können, von der jeweiligen Konformation des Proteins reguliert, die wiederum über die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und über SH-Brückenbildung reguliert sind (Lawler und Hynes 1986, Misenheimer und Mosher 1995, Speziale und Detwiler 1990, Sun et al 1992).

Die Bindung von Heparin an TSP-1 könnte damit das TSP-1 in eine Konformation gebracht haben, die es zu einem Plättchenagonisten macht.

Unfraktioniertes Heparin kann dabei TSP-1 besser vernetzen als niedermolekulares Heparin. Ähnlich wie hochmolekulare Multimere des vWF direkt die Plättchen über Quervernetzung der Rezeptoren aktivieren können (Arya et al 2003), so könnte an Heparin gebundenes TSP-1 eine Konformation annehmen, in der es mehrere Rezeptoren binden und quervernetzen kann, wie CD36, CD47 und das GPIIb/IIIa. In Übereinstimmung mit den Aggregationsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Heparin plus TSP-1 bei voraktivierten Plättchen eine Fibrinogenanbindung auslöste.

Vitronectin ist, ähnlich wie TSP-1, ein Adhäsionsprotein, das an Heparin bindet (Schvartz et al 1999, Preissner und Seiffert 1998). Es hat eine höhere Affinität zum Heparin als TSP-1 (Underwood et al 2002, Edens et al 2001, Francois et al 1999).

Vitronectin löst ähnlich wie TSP-1 bei leichter Voraktivierung der Plättchen durch  $\text{Zn}^{2+}$  eine minimale Plättchenaggregation aus. Vitronectin bindet an aktivierte Plättchen über den Vitronectinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Im Gegensatz zum TSP-1 wurde aber durch Vitronectin die UF-Heparin induzierte Aggregation nicht verstärkt. Daher wurde getestet, ob Vitronectin die Heparin plus TSP-1 vermittelte Aggregation inhibieren konnte.

Durch 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Vitronectin konnte die Verstärkung der UF-Heparin induzierten Plättchenaggregation durch 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TSP-1 vollständig aufgehoben werden. Da Vitronectin eine Heparin-Bindungsdomäne aufweist, die mit sehr hoher Affinität an Heparin bindet, könnte Vitronectin die Bindung zwischen der N-terminalen TSP-1 Domäne und dem Heparin kompetitiv inhibiert haben.

Untersuchungen zu diesem Mechanismus werden im Anschluss an diese Doktorarbeit durchgeführt. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Aggregationsexperimente konnte durch Vitronectin auch die Heparin plus TSP-1 induzierte Fibrinogenbindung an die Plättchen inhibiert werden.

Im Plasma gesunder Probanden ist ohne Vorliegen einer Wunde bei ruhenden Thrombozyten 10.000 mal mehr Vitronectin ( $\sim 300 \mu\text{g/ml}$ ) (Colan et al 1988) vorhanden als TSP-1 ( $33 \pm 19 \text{ ng/ml}$ ) (Kehrel et al 1996). Das Verhältnis kehrt sich um, wenn eine Thrombozytenaktivierung vorliegt. Dann sind im Bereich der aktivierten Thrombozyten lokal 1000-3000 fach höhere TSP-1 Konzentrationen (bis zu  $800 \mu\text{g/ml}$ ) anzutreffen (Daws et al 1983). So können Plättchen über Kontakt von TSP-1 zu Glykosaminoglykanen nur dann aktiviert werden, wenn durch Aktivierung anderer Plättchen viel TSP-1 zur Verfügung steht, oder wenn Monozyten oder/und Endothel durch inflammatorische Prozesse so stark aktiviert worden sind, dass diese TSP-1 sezernieren und lokal mehr TSP-1 vorhanden ist als Vitronectin.

Es stellte sich die Frage, über welchen Rezeptor Heparin plus TSP-1 die Plättchen aktivieren. TSP-1 bindet auf aktivierten Thrombozyten, bedingt durch seine große Zahl unterschiedlicher Domänen, mehrere Rezeptoren.

So wurde GPIb als Rezeptor für die TSP-1 Bindung bei hohen Scherkraftbedingungen beschrieben (Jurk et al 2003).

Asch et al beschrieben(1993), dass TSP-1 an phosphoryliertes CD36 auf der Thrombozytenoberfläche bindet. Über Bindung und Signaltransduktion durch CD36 übt TSP-1 zahlreiche Funktionen aus (Adams 2001). So wird z.B. die anti-angiogenetische Eigenschaft des TSP-1 über CD36 vermittelt (Jiminez et al 2000).

Die TSP-1 vermittelte Stimulation der T-Cell Proliferation wird über die Rezeptoren CD47 und CD36 weitergeleitet (Vallejo et al 2000), während für die Inhibierung der T-Cell Aktivität durch intaktes TSP-1 eine Bindung an CD47 und an Heparansulfat Proteoglykan erforderlich ist (Li et al 2001). Durch Konformationsänderung unter Beteiligung der Protein Disulfid Isomerase (PDI) wird die RGD-Sequenz im TSP-1 freigelegt und dieses kann dann an das  $\alpha_2\beta_3$ -Integrin (GPIIb/IIIa) binden (Hotchkiss et al 1998). Es wurde daher untersucht, ob durch Inhibition der Bindung von TSP-1 an seine Rezeptoren GPIb und CD36 eine Inhibition der Plättchenaktivierung durch Heparin plus TSP-1 erreicht werden konnte. Antikörper, die GPIb oder CD36 mit dem FcRIIa-Rezeptor verbrücken, lösen eine Plättchenaktivierung aus (Cauwenberghs et al 2001, Tomiyama et al 1992).

Daher wurde der FcRIIa durch Fab-Fragmente des Antikörpers IV.3 blockiert, wie unter Jurk et al 2003 beschrieben. Die Fc-Rezeptor-Blockade hatte, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Heparin plus TSP-1 vermittelte Plättchenaktivierung, wie am Beispiel der Fibrinogenbindung deutlich gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zur Heparin induzierten Thrombozytenaktivierung, die zur HIT II (s. Kap. 2.11) führt, spielt der Fc-Rezeptor bei der direkten Aktivierung der Plättchen durch Heparin plus TSP-1 keine Rolle.

Glykocalicin, der lösliche Teil des GPIb, welcher nach Thrombozytenaktivierung in der Spätphase abgespalten wird, hatte, obwohl es die Bindung von TSP an GPIb bei hohen Scherkräften hemmt, für die Heparin plus TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung keinen Einfluss. Diese Reaktion wird damit wahrscheinlich nicht über GPIb vermittelt. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch den Einsatz von zwei Antikörpern, welche die TSP-1 Bindung an GPIb hemmen (Jurk et al 2003). Im Gegensatz zu GPIb scheint CD36 wichtig für die Heparin plus TSP-1 vermittelte Plättchenaktivierung zu sein. Zwei in unserem Labor hergestellte, monoklonale Antikörper gegen CD36, Klon 37 und Klon 13, inhibierten dosisabhängig die Heparin plus TSP-1 vermittelte Plättchenaktivierung.

Dies spricht eindeutig dafür, dass die Heparin plus TSP-1 vermittelte Plättchenaktivierung vom TSP-1 Rezeptor CD36 ausgelöst wird und dass das TSP-1 der Partner im Heparin plus TSP-1-Verbund ist, welcher für die starke Aggregation verantwortlich ist.

CD36 Aktivierung führt zu einer Aktivierung der PI-3-Kinase im Endothel (Febbraio et al 2001) und in Herzmuskelzellen (Luiken et al 2002).

Daher wurde untersucht, ob Inhibitoren der PI-3 Kinase die Heparin plus TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung hemmen können. Zwei Substanzen wurden eingesetzt, Wortmannin und LY294002. Beide PI-3 Kinase Inhibitoren hemmten dosisabhängig die Heparin plus TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung. Die Plättchenaktivierung über Heparin plus TSP-1 ist daher vermutlich PI-3 Kinase vermittelt.

Die Konformationsänderung im GPIIb/IIIa-Komplex, welche für die Fibrinogenanbindung notwendig ist, wird durch cAMP inhibiert.

Es wurde daher getestet, ob Aktivatoren der Adenylat Cyclase die Heparin plus TSP-1 induzierte Plättchenaktivierung hemmen. Hierfür wurden zwei Substanzen aus der Gruppe der Prostaglandinderivate eingesetzt, das reversibel wirkende PGE1 (Prostaglandin E1) und das stabile, irreversibel wirkende Prostacyclinanalogon Iloprost. Beide Substanzen hemmten dosisabhängig die Heparin plus TSP-1 induzierte Fibrinogenanbindung an die Plättchen. Aus unseren Ergebnissen lässt sich für die Aktivierung der Plättchen durch Heparin ein neues Model für die zugrunde liegenden Mechanismen postulieren:

- 1.) Thrombozyten werden durch verschiedene Ursachen leicht voraktiviert (Grund für die Heparin-Gabe ist die Hemmung der Gerinnung bei Patienten mit Erkrankungen, die zu einer Aktivierung führen).
- 2.) Dies bewirkt, dass der TSP-1 Rezeptor CD36 aktiviert wird und damit in die Lage versetzt wird, TSP-1 zu binden (Asch et al 1993).
- 3.) TSP-1 wird aus aktivierten Thrombozyten, aber auch von Endothelzellen und Monozyten freigesetzt.
- 4.) Die langen Ketten des unfraktionierten Heparin und die kürzeren Ketten des niedermolekularen Heparin binden TSP-1 über seine hoch affine Heparin-Bindungsdomäne am N-Terminus. Es bildet sich ein Netz aus Heparin und TSP-1. So präsentiert das langkettige Heparin den Plättchen repetitive Bindungsstellen für den TSP-1 Rezeptor CD36 (Abb. 5.1.2).

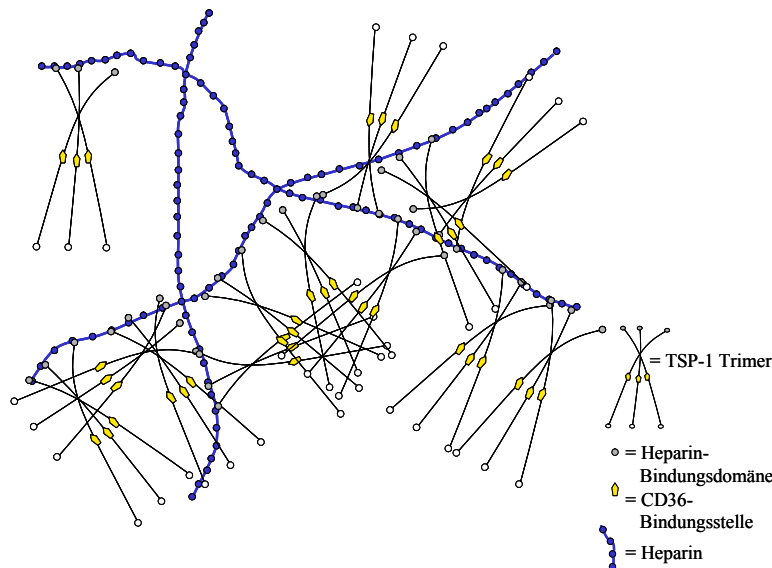


Abb. 5.1.2: TSP-1 bindet an Heparin und bildet somit ein Netz. Die Bindungsstellen für CD36 werden den Thrombozyten in großer Anzahl präsentiert.

- 5.) CD36 wird auf diese Weise quervernetzt. Quervernetzung von CD36 führt zu einem aktivierenden Signal in die Plättchen (Abb. 5.1.3 und 5.1.4) (Clemetson et al 1995).

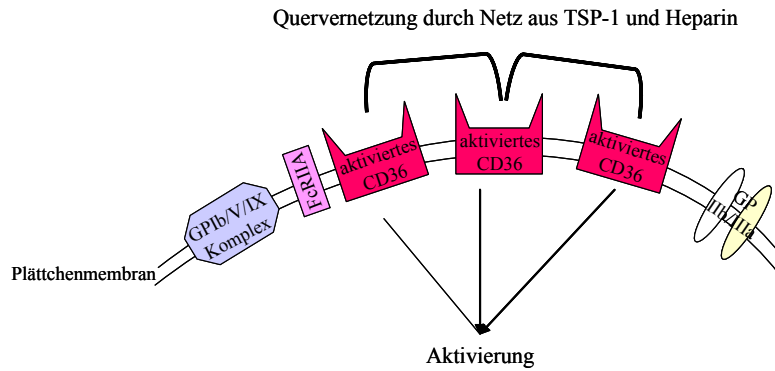


Abb. 5.1.3: Hypothetisches Modell der Aktivierung von Blutplättchen durch Heparin über TSP-1, CD36 wird quervernetzt, das zu einem aktivierenden Signal führt.

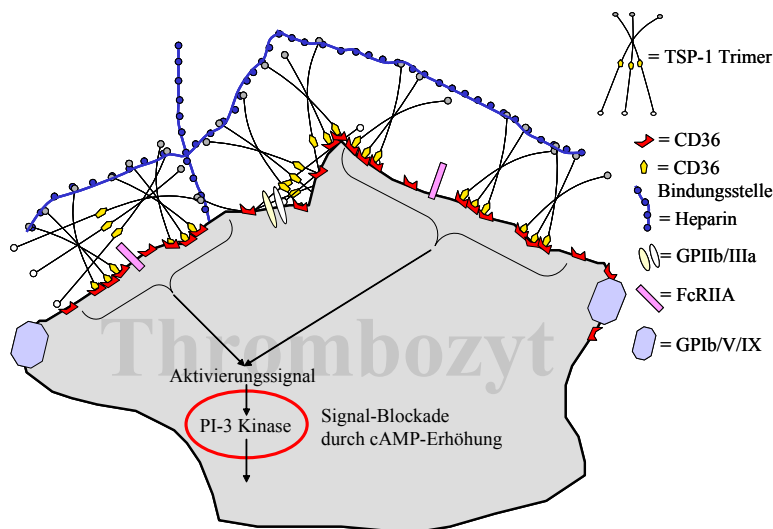


Abb. 5.1.4 Heparin plus TSP-1 quervernetzen CD36. Die resultierende Aktivierung, die durch cAMP Erhöhung blockiert werden kann, ist GPIb und GPIIb/IIIa unabhängig und verläuft nicht über eine Fc-Rezeptor vermittelte Reaktion.

- 6.) Die direkte Aktivierung der Plättchen verläuft im Gegensatz zur Aktivierung durch Heparin bei der HIT II nicht über eine Fc-Rezeptor vermittelte Reaktion. Auch die TSP-1 Rezeptoren GPIb und GPIIb/IIIa sind nicht beteiligt.
- 7.) Vitronectin inhibiert die Heparin plus TSP-1 vermittelte Plättchenaktivierung (Abb. 5.1.5).

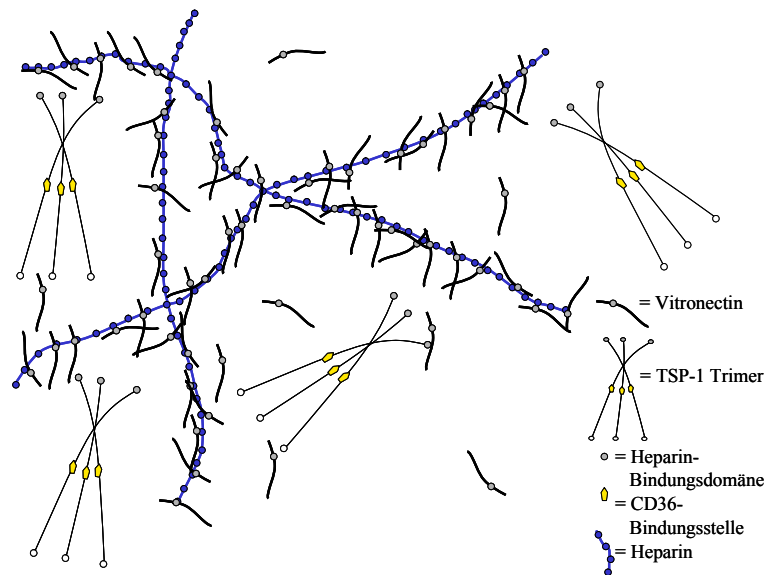


Abb. 5.1.5: Vitronectin bindet an Heparin und blockiert somit die Anbindung von TSP-1 an Heparin. Die Präsentation der CD36 Bindungsstellen ist dadurch inhibiert.

Die Aktivierung der Plättchen durch TSP-1 ist möglicherweise ein wichtiger Mechanismus der dazu beiträgt, zu klären, warum Entzündungsprozesse Thrombosen induzieren können. Der plättchenaktivierende Mechanismus könnte auch dazu beigetragen haben, dass bei der klinischen Phase III Studie, in der Antithrombin III auf seine Wirksamkeit gegen Sepsis getestet wurde (Kybersept-Studie, Warren et al 2001), die Gruppe von Patienten, die zusätzlich Heparin erhalten haben, eine signifikant geringere Überlebenschancen hatten. Diese schwerkranken Patienten haben alle voraktivierte Thrombozyten und sowohl Endothel als auch Leukozyten sind massiv aktiviert, so dass die TSP-1 Konzentration im Blut sehr hoch ist (Gawaz et al 1997).

Dass eine aktivierte Hämostase bei Sepsis ein wichtiger ätiologischer Faktor für das Entstehen von Multiorganversagen und damit auch verantwortlich für die hohe Mortalität ist, ist seit langem bekannt (Vincent et al 2003). Daher greifen fast alle Medikamente, die heute zur Therapie der Sepsis eingesetzt werden (Antithrombin III, aktiviertes Protein C), bei der Hämostase an und versuchen, diese herunterzuregulieren (Esmon et al 2002).

Heparin gehört heute zur Standardtherapie bei kardiologischen Patienten und Patienten mit Haemofiltration. Es ist denkbar, dass durch Hemmung des hier beschriebenen, neuen



Mechanismus eine viel größere Wirksamkeit des Heparin im Kampf gegen Thrombosen, Embolien, Schlaganfall und Herzinfarkt erreicht werden könnte.

## **5.2 Wirkung des Thrombospondin-1 Peptids RFYVVMWK auf Zellen**

### **5.2.1 Einfluss des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Thrombozyten**

Der Carboxyterminus von TSP-1 hat eine Bindungsstelle für viele normale und transformierte Zellen (Frazier et al 1991, Kosfeld et al 1992). Ein Peptid im Carboxyterminus ist in allen Spezies und allen Isoformen von TSP konserviert worden (Kosfeld et al 1993). Dieses Peptid hat die Sequenz (R)FYVVMWK. Durch Affinitätskopplung wurde das Integrin assoziierte Protein (IAP, auch CD47 genannt) als Rezeptor für dieses Peptid identifiziert (Gao et al 1994). CD47 exprimierende Zellen breiten sich schneller auf Vitronectin aus, wenn CD47 über das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert wird (Frazier et al 1999). Aktivierung von CD47 über das TSP-1 Peptid inhibiert die Cytokin-Synthese bei Makrophagen und Dendritischen Zellen (Armant et al 1999, Avice et al 2000). Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK vermittelt die Plättchenaggregation. Während Brown et al (2001) und Dorahy et al (1997) annahmen, dass dies über CD47 Quervernetzung geschieht, zeigten Experimente der Arbeitsgruppe um Steve Watson, dass diese Reaktion in gleicher Weise auch auf Plättchen von CD47 knock out Mäusen ausgelöst werden kann (2001). Eigene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit CD47 knock out Mäusen bestätigen, dass für die Aktivierung der Thrombozyten durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK CD47 nicht erforderlich ist. Für die Thrombozytenaktivierung ist die gamma-Kette des Fc-Rezeptors notwendig (Tulasne et al 2001). Eine Erklärung, wie das TSP-1 Peptid RFYVVMWK die Thrombozyten aktiviert, konnte durch die Arbeitsgruppe von Watson jedoch nicht gegeben werden. Daher wurde in dieser Arbeit zuerst detailliert untersucht, welche Schritte der Plättchenaktivierung durch das TSP-1 Peptid ausgelöst werden können.

Experimente zu dieser Arbeit bestätigen, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK als starker Plättchenagonist wirkt. Dies spiegelt sich darin wieder, dass es die Fibrinogenanbindung auslöst.

Die Reaktion ist im PRP deutlich schwächer, als bei gelfiltrierte Plättchen. Dies deutet daraufhin, dass die Reaktion durch eine Substanz, die im Plasma vorhanden ist, inhibiert wird. Andere Wissenschaftler, welche die Aggregation der Plättchen durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK untersucht haben, haben dies ausschließlich mit gewaschenen oder

gelfiltrierten Plättchen getan (Tulasne et al 2001, Dorahy et al 1997). Eine Wirkung des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Plättchen in Gegenwart von Plasmaproteinen wurde bisher nicht gezeigt. Es lässt sich nur spekulieren, dass auch die anderen Autoren Versuche in Gegenwart von Plasmaproteinen durchgeführt haben, aber wegen der deutlich schwächeren Wirkung des TSP-1 Peptids in der Präsentation auf gewaschene oder gelfiltrierte Plättchen ausgewichen sind.

TSP-1 aus Thrombozyten wurde schon früher mit einer Verstärkungsreaktion der Aggregation in Zusammenhang gebracht. So bindet oberflächlich gebundenes TSP-1 Fibrinogen und Fibrin auf der Plättchenoberfläche und kann gleichzeitig direkte TSP-1 Rezeptoren wie CD36 und  $\alpha_V\beta_3$ -Integrin binden (Leung et al 1982). Leung et al spekulierten daher, dass TSP-1 durch eine zusätzliche Querbrücke die Plättchenaggregation verstärkt.

Monoklonale Antikörper wurden beschrieben, welche die Plättchenaggregation hemmen (Leung et al 1984, Dixit et al 1985, Gartner et al 1984). Diese sind aber gegen die Heparin-Bindungsdomäne oder die CD36 Bindungsstelle gerichtet (Gartner et al 1984, Tuszynski et al 1992).

Weder die Heparin-Bindungsstelle, noch die CD36 bindende Domäne lösen eine Aktivierung von Plättchen aus. Ein Peptid aus der Heparin-Bindungsstelle inhibiert jedoch das Ausmaß der Aggregation. Dies spricht dafür, dass im Mechanismus der induzierten Plättchenaktivierung durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK sowohl N-, als auch C-terminale Peptide gleichermaßen gebraucht werden. Der TSP-1 Peptid induzierten Plättchenaggregation liegt eine Aktivierung zugrunde (Dorahy et al 1997). So induziert es die Phosphorylierung von Pleckstrin (Dorahy) und aktiviert die Phospholipase  $C\gamma_2$  (Tulasne et al 2001).

Ob das TSP-1 Peptid RFYVVMW die  $\alpha$ -Granula Sekretion auslöst und in welchem Maß, wurde noch nicht untersucht.

Wie diese Arbeit zeigt, kann auch die Granula-Sekretion durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK ausgelöst werden. Als Marker für die  $\alpha$ -Granula Sekretion wurde die Expression von P-Selektin (CD62) untersucht. P-Selektin ist ein Protein der  $\alpha$ -Granulamembran und kommt beim Sekretionsvorgang auf die Plasmaaußenmembran der Plättchen, da diese mit der Granulamembran verschmilzt. Dabei ist die agonistische Wirkung hinsichtlich der Sekretion der  $\alpha$ -Granula und der elektronendichten Granula in etwa mit der Aktivierung durch den bisher stärksten bekannten Agonisten, das Thrombin, vergleichbar. Die Reaktion von dem TSP-1 Peptid RFYVVMWK auf die Plättchen/Granulasekretion ist deutlich stärker als die Reaktion, die durch den Agonisten ADP ausgelöst werden kann.

Bei der thrombozytenaktivierenden Wirkung handelt es sich um eine spezifische Reaktion, denn ein Kontrollpeptid, bei dem ladungsneutral Valin gegen Glycin ausgetauscht wurde, zeigte keine plättchenaktivierenden Eigenschaften.

P-Selektin ist ein Brückenprotein zwischen aktivierten Plättchen und Monozyten und aktivierten Plättchen und Endothelzellen (Frenette et al 2000) oder neutrophilen Granulozyten.

So ist es folgerichtig, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK, wie in Kap. 4.2.2 gezeigt, die Assoziation von aktivierten Plättchen an Monozyten zu induzieren vermag. Wie dort gezeigt hat es dabei eine ähnlich starke Wirkung wie Thrombin.

Durch die Assoziation von Plättchen an Monozyten, Neutrophile, Endothelzellen, werden diese aktiviert (Furie et al 1995). Der neu entstandene Zellverband vermag Reaktionen auszulösen, die jede einzelne Zelle nicht vermag. Die Entstehung von solchen Zellassoziaten ist z.B. für Thrombose bei Myeloproliferativen Erkrankungen (Jensen et al 2001), Fortschreiten der Sepsis (Heffner et al 1997) oder Reperfusionsschäden bei Myokardinfarkt und Schlaganfall (Hayward et al 1999) von Bedeutung. Damit beeinflusst das TSP-1 Peptid RFYVVMWK diese pathologischen Prozesse. Verhinderung der Thrombozytenaktivierung durch das TSP-1 Peptid könnte daher ein interessanter Mechanismus zur Bekämpfung oben erwähnter Erkrankungen sein.

Das Mutterprotein TSP-1 selbst wird durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten freigesetzt und bindet an die aktivierten Thrombozyten zurück, wie Abb. 4.2.1.3.1 zeigt. Damit können diese Zellen TSP-1 vermittelte Reaktionen ausführen und auch bei hohen Scherkräften haften (Jurk et al 2003). Das TSP-1 kann dabei an den von Willebrand Faktor oder an Kollagen andocken.

TSP-1 vermittelt könnten auch Tumorzellen sich an der Gefäßwand festsetzen und die hämatogene Metastasierung einleiten (de Fraipont et al 2001).

Neben P-Selektin kommt bei der TSP-1 Peptid RFYVVMWK vermittelten Plättchenaktivierung auch CD40 Ligand an die Plättchenoberfläche, wie in Abb. 4.2.1.4.1 zeigt.

CD40L (CD154) ist ein Glykoprotein der Tumor Necrosis Faktor Familie. CD40L-CD40 Wechselwirkungen spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen (Freedman et al 2003).

Die Quervernetzung von CD40 durch seinen Liganden trägt zur Pathogenese der Arteriosklerose, der Thrombose und zu entzündlichen Prozessen bei (Henn 1998, Mach 1998). Auf Endothelzellen oder Monozyten bewirkt die Kopplung an CD40 z.B. die Synthese

von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Tissue Faktor und löst die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen aus. Nach Plättchenaktivierung, wie z.B. hier durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK gezeigt, wird CD40L von der Plättchenoberfläche abgespalten. Etwa 95 % des zirkulierenden löslichen CD40L stammt von aktivierten Plättchen (Andre et al 2002).

Die hier gezeigte Reaktion des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf die Thrombozyten könnte daher sowohl Einfluss auf die Hämostase und damit auch auf die Entstehung thromboembolischer Ereignisse, als auch auf Gefäßwandschädigung und entzündliche Prozesse haben.

Viele Plättchenagonisten vermögen die Anbindung von Fibrinogen zu induzieren und können die Granula-Sekretion hervorrufen, aber nur starke Agonisten, wie Thrombin oder Kollagen, können Thrombozyten prokoagulant machen. Um alle Plättchen stark genug zu aktivieren bedarf es einer Aktivierung durch Kollagen plus Thrombin (Dale et al 2002).

Überraschenderweise ist nun das TSP-1 Peptid RFYVVMWK, wie hier gezeigt, schon allein eingesetzt ein ausreichend starker Agonist, der die Plättchen so verändert, dass ein „Flip-Flop“ der Phospholipide in der Thrombozytenmembran stattfindet und die Gerinnungsfaktoren des Xa-se- und Prothrombinasekomplexes anbinden können. Die Abb. 4.2.1.5.1 - 3 zeigen, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK die Membran so verändern kann, dass Annexin V über  $Ca^{2+}$  an negativ geladene Phospholipide anbindet. Dies ist eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Anbindung von Gerinnungsfaktoren (Monroe et al 2002). Auch die Zellrezeptoren für die Gerinnungsfaktoren werden durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert, so dass, wie in Abb. 4.2.1.5.2 und 3 gezeigt, die Faktoren Va und Xa binden können. TSP-1 könnte daher über seine Sequenz RFYVVMWK eine außerordentlich wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen haben.

Da Thrombozyten so außergewöhnlich stark durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert wurden, wurde geprüft, ob auch die Schlüsselzelle von Entzündungsreaktionen, der Monozyt, durch RFYVVMWK aktiviert werden konnte.

### **5.2.2 Einfluss des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf Monozyten**

Ein Merkmal aktivierter Monozyten ist die Aktivierung des  $\alpha_M\beta_2$ -Integrins CD11b/CD18, bzw. Mac-1. Aktivierter Mac-1 Komplex (CD11b/CD18) bindet Fibrinogen, Faktor X und iC3b (Peter et al 1999). Wie Abb. 4.2.3.1.1 zeigt kann das TSP-1 Peptid RFYVVMWK diese

Monozytenaktivierung auslösen. Es wird vermehrt CD11b an der Oberfläche präsentiert und dieses bindet Fibrinogen.

Auch die Rückbindung des Mutterproteins TSP-1 an die Monozytenoberfläche wird durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK induziert. Dies erleichtert die Adhäsion von Monozyten ans Endothel und die Assoziation von Plättchen an Monozyten (Dissertation Jurk).

Monozyten spielen auch eine große Rolle für die Hämostase, Thromboseentstehung/ Herzinfarktentwicklung, indem sie zur Bildung von Thrombin beitragen.

Aktivierte Monozyten exprimieren Tissue Faktor (TF) auf ihrer Oberfläche, den Starter der Koagulation (Osterud et al 2003). An TF kann der Gerinnungsfaktor VII anbinden, wird dort aktiviert und initiiert die nachfolgenden Schritte der Hämostase und damit die Thrombinbildung. Thrombin wiederum löst zahlreiche physiologische und pathophysiologische Reaktionen aus.

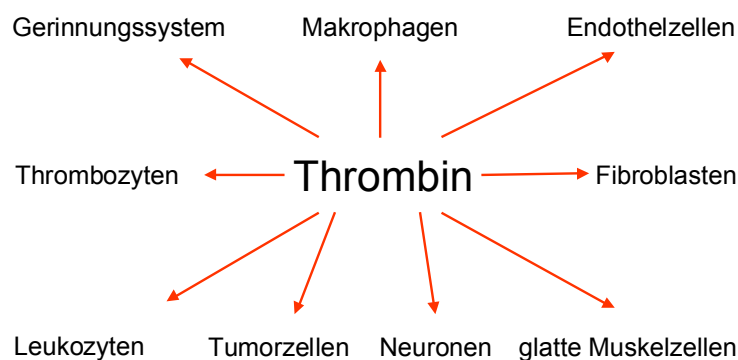


Abb. 5.2.2.1 Thrombin getriggerte Mechanismen

Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK induziert, wie Abbildung 4.2.3.3.1 zeigt, die Expression von Tissue Faktor auf der Monozytenoberfläche. Folgerichtig bindet auch, wie in Abb. 4.2.3.3.2 gezeigt, Faktor VIIa an Monozyten. Da die Versuche mit dem Blut unterschiedlicher Probanden durchgeführt wurden, war zwar deutlich eine Dosisabhängigkeit zu erkennen, aber je nach Proband wurden unterschiedliche Mengen an TSP-1 Peptid RFYVVMWK zum Start der Reaktion benötigt.

Durch die Aktivierung von Monozyten durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK könnte RFYVVMWK auf alle oben erwähnten biologischen Prozesse indirekt Einfluss nehmen.

Ein interessanter Befund dieser Arbeit ist, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK Monozyten zerlegt und Monozytenmikropartikel entstehen. Solche Mikropartikel aus Leukozyten werden

in vivo bei pathologischen Prozessen, wie Diabetes mellitus Typ II (Omoto et al 2002, Diamant et al 2002) und Sepsis (Satta et al 1994, Nieuwland et al 2000) gefunden. Wie diese entstehen und welche Agonisten diesen Prozess auslösen, ist dabei bisher unbekannt. Neben dem TSP-1 Peptid löst auch die Bildung des Komplementkomplexes eine Mikropartikelbildung in vivo aus. Ob das TSP-1 Peptid an der in vivo Entstehung solcher Mikropartikel beteiligt ist, kann erst beantwortet werden, wenn geklärt ist, ob das Peptid in vivo exprimiert oder herausgeschnitten wird, um diese Prozesse in Gang zu setzen. Falls das TSP-1 Peptid RFYVVMWK durch Konformationsänderung zugänglich gemacht wird oder durch Protease(n) aus TSP-1 herausgeschnitten wird, dürfte es von hohem Interesse sein, diesen Mechanismus zu erforschen, damit Ansatzpunkte gefunden werden, diesen zu inhibieren.

Um dem Mechanismus der Zellaktivierung durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK etwas näher zu kommen, wurde untersucht, ob es eine Phosphorylierung von VASP hervorruft (Aszodi et al 1999). Die VASP-Phosphorylierung korreliert im Thrombozyten mit einer Hemmung der Fibrinogenbindung. Ähnlich wie andere Plättchenagonisten leitet eine Aktivierung durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK eine VASP-Phosphorylierung ein und begrenzt so die Aktivierungsreaktion (Aktas et al 2003, Li et al 2003, Schwarz et al 1999). Da CD47 knock out Plättchen sich normal durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktivieren lassen, wurde untersucht, welche Thrombozytenproteine an das TSP-1 Peptid RFYVVMWK binden. Das an Avidin-Sepharose über Biotin gekoppelte RFYVVMWK-Peptid band aus einem Thrombozyten-Solubilisat große Mengen seines Mutterproteins. In der Silberfärbung stellte sich im Eluat dieses Affinitätschromatographie-Gels deutlich TSP-1 dar. Es zeigte die charakteristischen Molekulargewichte im reduzierten Zustand und die Verschiebung zum Rand eines 7,5 % Polyacrylamid SDS-Gels, wenn eine Reduktion unterbunden wurde. Auch der Farbton, den dieses Protein bei der gewählten Silberfärbung annimmt entspricht dem für TSP-1.

Im Western-Blot gelang der Nachweis mit Hilfe eines polyklonalen anti-TSP-1 Antikörpers, dass im Eluat TSP-1 vorhanden war.

Durch ein ELISA-Verfahren wurde verifiziert, dass das TSP-1 Peptid an das Mutterprotein bindet. Die Aktivierung der Plättchen durch das TSP-1 Peptid RFYVVMWK könnte daher über das Mutterprotein TSP-1 selbst vermittelt sein.

TSP-1 bindet an aktivierte Thrombozyten über eine Reihe von Bindungsproteinen (Adams et al 2001). Über seine RGD-Sequenz kann es an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und GPIIb/IIIa anbinden

(Bonney et al 2001). Daher wurde untersucht, ob die TSP-1 Peptid RFYVVMWK induzierte Zellaktivierung Integrin vermittelt und durch das Peptid RGDS inhibierbar ist. Wie Abb. 4.2.3.5.1.1 zeigt, konnte kein Einfluss von RGDS auf den Aktivierungsprozess der Thrombozyten festgestellt werden. Dies macht es sehr unwahrscheinlich, dass die Aktivierung der Thrombozyten durch eine Kette Peptid—TSP-1—Plättchenintegrin vermittelt wird. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den kürzlich publizierten Daten von Tulasne et al 2001. Auch diese Arbeitsgruppe beobachtete keinen Unterschied in der Aktivierbarkeit von Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann, die kein GPIIb/IIIa haben, und von Kontrollprobanden.

Ein anderer Rezeptor für TSP-1 auf aktivierten Thrombozyten ist das CD36. Wir konnten eine gesunde Blutspenderin identifizieren, deren Plättchen, wie Abbildung 4.2.3.5.2.3 zeigt, kein CD36 enthielten. Auf den Monozyten dagegen war CD36 normal ausgeprägt. Solche Blutspender werden überwiegend in Japan angetroffen und wurden von Kashiwagi et al (2001) beschrieben. Auch bei unserer Probandin handelte es sich um einen Mitbürger japanischer Abstammung. Obwohl die Thrombozyten kein CD36 exprimierten, war die aktivierende Funktion des TSP-1 Peptids RFYVVMWK auf die Thrombozyten normal. Versuche mit einem eigenen monoklonalen anti CD36 Antikörper, der die Bindung von TSP-1 an CD36 hemmt, bestätigten, dass ein Aktivierungsmechanismus über die Kette Peptid—TSP-1—CD36 höchst wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend wurde gefunden, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK nicht nur, wie von anderen publiziert, Plättchen aggregieren kann, sondern ein Agonist ist, der in der Stärke vergleichbar dem bisher stärksten bekannten Aktivator Thrombin ist und Plättchengranulafreisetzung und Ausbildung des prokoagulanten Zustands der Plättchen induzieren kann. Dies ist nicht selbstverständlich für einen Plättchenagonisten. ADP löst eine Plättchenaggregation aus, das Signal ist aber zu schwach, um Plättchen prokoagulant zu machen und die Granulafreisetzung ist nur geringfügig.

Unter der Voraussetzung, dass das TSP-1 Peptid RFYVVMWK in vivo im Blut Zellen durch Konformationsänderung des TSP-1 oder durch Proteolyse präsentiert wird, könnte die Aktivierung von Plättchen und Monozyten über das TSP-1 Peptid RFYVVMWK von großer Bedeutung für pathologische Prozesse sein, die mit verstärkter Hämostase oder mit Entzündungsreaktionen einhergehen.

Der Prozess der „Präsentation“ des TSP-1 Peptids für Blutzellen ist Gegenstand meiner laufenden Untersuchungen. Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich die Hypothese

aufstellen, dass das C-terminale TSP-1 Peptid RFYVVMWK Plättchen aktiviert, indem es an das Mutterprotein TSP-1 bindet und dessen Konformation so verändert, dass dieses Plättchen aktivieren kann.

Diese Aktivierung wird nicht über die TSP-1 Rezeptoren CD36 oder GPIIb/IIIa vermittelt.

### 5.3 Untersuchungen zur Spaltung des Glykoprotein V

Während die Erforschung der Thrombozytenfunktionen in den letzten beiden Jahrzehnten große Fortschritte im Bereich der primären und sekundären Aktivierung der Plättchen gemacht hat, sind Prozesse, welche in der Spätphase der Aktivierung ablaufen, bisher wenig untersucht worden. Dies liegt unter anderem daran, dass diese Prozesse für die Physiologie oder Pathophysiologie als unwichtig erachtet wurden. Die Begrenzung des Thrombuswachstums wurde als Aufgabe des Endothels angesehen. Thrombozyten- und Endothelreaktionen waren in dieser Vorstellung auf gegensätzliche Schalen der Waage angeordnet, welche die Hämostase auspendeln. Zunehmend wurden aber auch prokoagulatorische Funktionen des Endothels gefunden, die zeigen, dass das althergebrachte Modell zu einfach ist.

So wie die alte Vorstellung, dass Gerinnung und Fibrinolyse zwei Prozesse sind, die sich gegenseitig regulieren, über Bord geworfen werden musste, als man die eigentlichen Inhibitoren der Fibrinolyse entdeckte, so legt heute eine Regulation der anti- und prokoagulatorischen Funktionen innerhalb des Endothels nahe, dass auch die Thrombozyten über Funktionen verfügen, die ihre eigene Aktivierung und das Thrombuswachstum regulieren. Einer dieser Mechanismen ist das von Peter Newman (2001) entdeckte System der negativen Regulation der Signaltransduktion über ITIM („immunotyrosinebase inhibition motif“) tragende Rezeptoren wie PECAM-1 („platelet/endothelium cell adhesion molecule-1“). Ein anderer Gegenregulationsmechanismus ist wahrscheinlich die Abspaltung von extrazellulären Membranproteinteilen der Thrombozyten in der Spätphase der Thrombusbildung. In dieser Phase der Plättchenaktivierung kommt es zur Spaltung der Glykoproteine GPIb und GPV auf der Thrombozytenoberfläche.

Unter der Vorstellung, dass nicht nur die Abspaltung von Membranproteinen selbst ein Prozess zur Regulation der Thrombusgröße ist, sondern dass möglicherweise auch der abgespaltene Proteinteil eine biologische Funktion haben könnte, wurde der Prozess der GPV Spaltung näher charakterisiert und abgespaltenes GPV<sub>fl</sub> auf mögliche Funktionen untersucht. Dazu wurden Thrombozyten aktiviert und aus dem Aktivierungsüberstand wurde GPV-Fragment angereichert.



Das stark glykosilierte GPV Proteinfragment band, wie bei Bienz et al 1986 beschrieben, an das Lektin Weizen-Keim-Agglutinin und konnte mit N-Acetylglucosamin eluiert werden. Durch Ionenaustauschchromatographie konnte es vom Spaltprodukt des nah verwandten GPIb $\alpha$ , dem Glykocalicin, getrennt werden. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde deutlich eine Bande mit einem polyklonalen Antikörper gegen GPV nachgewiesen. Diese Bande hat ein apparentes Molekulargewicht von 69000 und entspricht dem Fragment von GPV, welches durch Thrombinspaltung freigesetzt wird (Phillips et al 1977, Knupp et al 1985). Bienz et al beschreiben, dass durch eine durch Ca<sup>2+</sup> aktivierte, endogene Protease der Plättchen ein größeres Fragment von GPV, das GPV<sub>s</sub>, abgespalten wird. Dieses GPV Fragment, GPV<sub>s</sub>, hat eine molare Masse von 79000 Dalton.

Um die Spaltung von GPV besser verfolgen zu können, ist in unserer Arbeitsgruppe ein monoklonaler Antikörper gegen das Peptid PAESSSDAAPRPPPG hergestellt worden. Dieses Peptid grenzt direkt an die Thrombin-Spaltstelle an und hat sein Epitop in GPV<sub>s</sub>. GPV<sub>gesamt</sub>, GPV<sub>s</sub> oder GPV<sub>s-fl</sub> werden erkannt, aber nicht GPV<sub>fl</sub>. Ein Antikörper gegen GPV<sub>fl</sub>, der Klon SW16 ist kommerziell erhältlich. So sind für die nachfolgenden Untersuchungen „Werkzeuge“ vorhanden, die es erlauben, sicher zwischen einer Abspaltung von GPV<sub>s</sub> und von GPV<sub>fl</sub> zu unterscheiden.

In Voruntersuchungen wurde das optimale Verhältnis von Antikörpern zu Plättchen in einem konstanten Volumen ausgetestet, um quantitativ GPV auf der Oberfläche von Thrombozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfassen zu können. Dieses Verhältnis Antikörperkonzentration/Thrombozyten wurde in allen weiteren Versuchen konstant eingehalten.

Der Antikörper Klon GPV<sub>s-fl</sub>, sowie der kommerzielle GPV<sub>fl</sub> Antikörper Klon SW16, banden gut an GPV auf der Plättchenoberfläche. Die Anzahl der Antikörperbindungsstellen verringerte sich aber deutlich durch Thrombin-Behandlung der Plättchen (1 U/ml), wie Abbildung 4.3.2.1 zeigt. Dieses Ergebnis war für den Antikörper SW16 zu erwarten, da sein Epitop auf dem GPV Fragment liegt (GPV<sub>fl</sub>), welches durch Thrombin von GPV abgespalten wird. Überraschend ist, dass auch das Epitop auf GPV<sub>s-fl</sub> durch Thrombin-Behandlung der Plättchen verringert zugänglich war. Da Thrombin nicht nur selbst eine Protease ist, die GPV spalten kann, sondern auch ein starker Aktivator der Plättchen ist, wurde untersucht, ob die abnehmende Anbindung des Antikörpers GPV<sub>s-fl</sub> auf eine Plättchenaktivierung zurückzuführen sein könnte. Daher wurden Plättchen nicht-enzymatisch mit Kollagen aktiviert und die Bindungsfähigkeit beider Antikörper vor und nach Aktivierung der Plättchen untersucht. Wie Abbildung 4.3.2.2 zeigt, löste auch Kollagen eine Abnahme der

detektierbaren Epitope für beide Antikörper aus. Dies spricht dafür, dass die Abnahme der detektierbaren Epitope auf  $GPV_{fl}$  und auf  $GPV_{s-fl}$  eine Folge der Plättchenaktivierung ist. Die Aktivierung der Plättchen sowohl durch Thrombin als auch durch Kollagen könnte die noch nicht identifizierte Calcium-aktivierte, endogene Protease aktiviert haben, welche von Bienz et al (1986) postuliert wurde.

Da eine Plättchenaktivierung sekundär zur Thrombin-Bildung führt, wurde die Kollagenaktivierung in Gegenwart vom Thrombin-Inhibitor Hirudin durchgeführt, um sekundär entstehendes Thrombin weitgehend abzufangen.

Auch in Hirudin (10 U/ml) antikoagulierten Plättchenreichem Plasma führte eine Aktivierung der Plättchen durch Kollagen zu einer Abnahme der Bindungsstellen für AK  $GPV_{s-fl}$ , Abb.

4.3.5.1. Um festzustellen, ob dieser Abnahme eine proteolytische Spaltung von GPV zugrunde liegt, wurde der Aktivierungsüberstand über SDS-PAGE getrennt und die darin enthaltenen Proteine im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen GPV auf GPV-Fragmente untersucht. Es färbte sich deutlich ein GPV-Fragment mit einer molekularen Masse von 79 kDa und eine schwache GPV-Bande von ca. 69 kDa (Abb. 4.3.3.1). Diese Banden entsprechen den GPV Fragmenten  $GPV_s$  und  $GPV_{fl}$ . Dass trotz Hirudin-Antikoagulation etwas  $GPV_{fl}$  entstanden ist, kann damit erklärt werden, dass bei der Plättchenaktivierung durch Kollagen sehr große Mengen an Thrombin auf der Plättchenoberfläche gebildet werden und die eingesetzte Inhibitormenge nicht ausgereicht hat, um alles Thrombin sofort vollständig zu inhibieren.

Die zeitliche Reihenfolge bei der Abspaltung der GPV-Fragmente wurde nachfolgend untersucht. Eine Aktivierung der Plättchen durch Kollagen oder Thrombin führt zu einer simultanen Abnahme der Bindungsstellen für den  $GPV_{fl}$ -Antikörper SW16 und den  $GPV_{s-fl}$  Antikörper. Die Aktivierungsvorgänge, die durch Kollagen oder Thrombin ausgelöst werden und zur Spaltung von GPV führen, müssten daher den gleichen Zeitbedarf/Zeitverlauf haben. Um diese Frage zu beantworten, ob zuerst  $GPV_{fl}$  abgespalten wird und dann  $GPV_s$ , oder aber dies von dem aktivierenden Agonisten abhängt, wurden Thrombozyten mit Kollagen (+ Hirudin) oder Thrombin aktiviert und die Abnahme von  $GPV_{fl}$  und die von  $GPV_s$  in einer Zeitkinetik bestimmt. Die Abnahme der Bindungsstellen für beide Antikörper verlief simultan bei beiden eingesetzten Agonisten. Dies lässt sich erklären, wenn man annimmt, dass erst  $GPV_s$ , welches  $GPV_{fl}$  enthält, abgespalten wird. Nur dann ist die Abnahme zeitgleich. Sowohl Kollagen-, als auch Thrombinaktivierung der Plättchen führen zuerst zu einer Abspaltung des großen Fragments  $GPV_s$ . Thrombin spaltet dann später erst  $GPV_{fl}$  von  $GPV_s$  ab (Abb. 5.3.1).

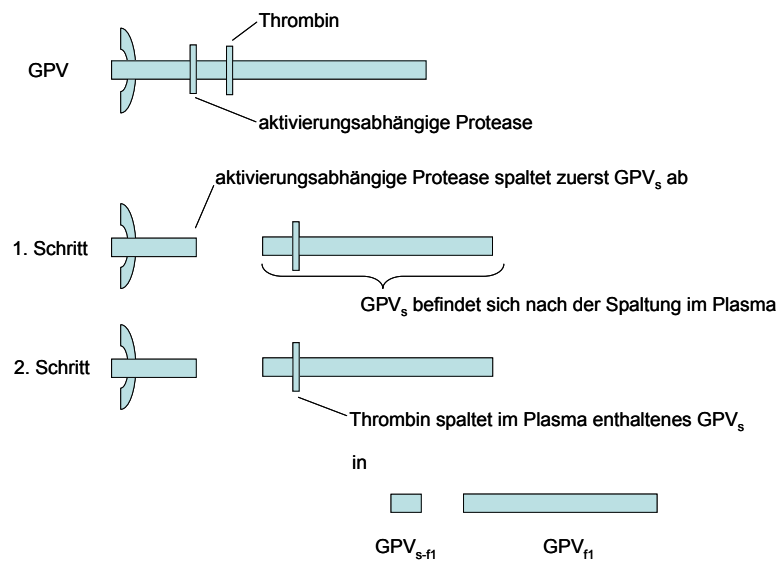


Abb. 5.3.1: Schema über die zeitliche Abfolge der GPV Spaltung

Die endogene Protease der Plättchen, welche selbst durch Aktivierung der Plättchen aktiviert wird, müsste eine höhere Spaltungseffektivität besitzen als Thrombin. Wahrscheinlich wird  $GPV_s$  im Aktivierungsüberstand durch Thrombin weiter gespalten. So erklärt sich das Auftreten von  $GPV_{f1}$  im Aktivierungsüberstand, wenn Thrombinaktivität nicht komplett durch Hirudin gehemmt wird (Abb. 4.3.3.1).

Nachdem gefunden wurde, dass die Aktivierung der Plättchen durch Kollagen eine GPV Spaltung induziert, sollte die Frage beantwortet werden, ob auch andere Thrombozytenagonisten eine GPV Spaltung induzieren können. Die nicht selbst proteolytischen Aktivatoren TRAP (Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid), ADP und das TSP-1 Peptid RFYVVMWK bewirken eine Abnahme der Bindungsstellen für  $GPV_{s-f1}$  (Abbildung 4.3.6.1 - 3) und induzieren wie Kollagen sehr wahrscheinlich auch die Spaltung von  $GPV_s$ . Nachdem gefunden wurde, dass die Aktivierung der Plättchen selbst vermutlich die Spaltung von  $GPV_s$  auslöst, wurde der Einfluss von Aktivierungs-Antagonisten auf die GPV Spaltung untersucht. Die Aktivierung der Adenylat Cyclase führt zur Bildung von cAMP. cAMP bewirkt eine Inhibition der  $Ca^{2+}$ -Mobilisation in den Plättchen, welche durch verschiedene Agonisten ausgelöst wird und für verschiedene Plättchenfunktionen von zentraler Bedeutung ist (Sage et al 1985). Die Inhibition wird beobachtet unabhängig davon, ob extern  $Ca^{2+}$  zugeführt wird. Daher gilt es als gesichert, dass sowohl interne Calcium-Mobilisation, als auch  $Ca^{2+}$ -Influx gehemmt werden. Zwei Aktivatoren der Adenylat Cyclase standen zur Verfügung, das stabile Prostacyclin-Analogon Iloprost und Prostaglandin E1 (PGE1). Während Iloprost irreversibel hemmt, ist die Wirkung von PGE1 nur passager. Die

Prostaglandinabkömmlinge wurden in Konzentrationen eingesetzt, welche die Plättchenaggregation gerade vollständig hemmen. Beide Adenylat Cyclase Aktivatoren zeigten eine deutliche, aber nicht vollständige Hemmung der GPV Spaltung. Der irreversibel wirkende Inhibitor Iloprost zeigte dabei eine deutlich stärkere Wirkung.

Die Plättchenaktivierung wird durch zwei Mechanismen verstärkt, die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> und die Sekretion von ADP aus den elektronendichten Granula. Sowohl Thromboxan A<sub>2</sub> als auch ADP sind selbst Plättchenagonisten. Um den Einfluss dieser „Verstärkerwege“ zu untersuchen, wurden diese spezifisch gehemmt.

Daltroban ist ein Thromboxan-Rezeptor Antagonist und inhibiert in der eingesetzten Konzentration die Thromboxan-vermittelte Plättchenaktivierung vollständig (Pill et al 1992). Die Spaltung von GPV<sub>s</sub> durch die Thrombinaktivierung wird aber durch Daltroban nicht gehemmt. Der Arachidonsäure/Thromboxanweg hat damit vermutlich keinen Einfluss auf die proteolytische Spaltung von GPV, welche durch Plättchenaktivierung induziert wird, wenn wie hier die eingesetzte Konzentration des Agonisten groß genug ist, um eine vollständige Aktivierung zu erreichen.

Apyrase ist ein Enzym, welches ADP in AMP überführt (Zhang et al 2001). So kann ADP nicht mehr agonistisch die Plättchenaktivierung unterstützen. Unter Verwendung von Agonistenkonzentrationen, welche die Plättchen vollständig aktivieren, wie die hier eingesetzten 2 U/ml Thrombin, hat die zusätzliche Aktivierung durch ADP vermutlich keinen Einfluss, da das Wegfangen von ADP durch Apyrase die Spaltung von GPV nicht beeinflusst, wie Abbildungen 4.3.7.3.1 und 2 zeigen.

Kürzlich wurde von der Arbeitsgruppe um Michael Berndt beschrieben, dass die zytoplasmatischen Domänen von GPV und GPIb Calmodulin binden (Andrews et al 2001). Die membranproximale GPIb $\beta$ -Sequenz zeigt Analogien mit der Calmodulinbindungssequenz, die für den Leukozytenadhäsionsrezeptor L-Selektin gefunden wurden. In der zytoplasmatischen Sequenz von GPV, K529-G544, befindet sich ein Calmodulin-Bindungs-IQ-Motiv mit Analogie zur  $\alpha 1c$  Untereinheit des L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanals (Zühlke et al 1999). Nach Aktivierung der Plättchen dissoziiert Calmodulin von den Glykomembranproteinen GPIb $\beta$  und GPV. So kann ein Komplex aus Calmodulin und GPV oder GPIb/IX aus ruhenden Plättchen immunpräzipitiert werden. Nach Thrombinaktivierung der Plättchen gelingt dies jedoch nicht mehr. Die Assoziation von Calmodulin zum zytoplasmatischen Teil des Membranproteins reguliert beim L-Selektin die proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche (Kahn et al 1998).

Wie GPV von den Plättchen, so wird L-Selektin bei Zellaktivierung von der Leukozytenoberfläche gespalten. Beide Proteine binden im zytoplasmatischen Teil Calmodulin. Für L-Selektin wurde gefunden, dass Calmodulin-Inhibitoren, welche diese Bindung hemmen, wie W-7 (N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) und TFP (Trifluoperazin), eine Spaltung von L-Selektin von der Zelloberfläche induzieren können (Kahn et al 1998). Auch die Spaltung anderer Transmembranproteine von der Zelloberfläche, wie das  $\beta$ -Amyloidprecursor Protein, der Precursor vom „transforming growth factor  $\alpha$ “ (TGF  $\alpha$ ), das pro-neurologische  $\alpha 2c$  und die „receptor tyrosine kinase“, TrK A, wird durch Calmodulin-Inhibitoren ausgelöst. Wie diese Untersuchung zeigt, führt auch die Behandlung der Plättchen mit den Calmodulin-Inhibitoren W-7 und TFP zu einer Abspaltung von GPV, wobei TFP sich als der stärkere „Spaltungsinduktor“ erwies. Auch bei der Spaltung von L-Selektin war die Wirkung von TFP deutlich ausgeprägter als die von W-7 (Matala et al 2001).

Wie könnte man sich den Wirkmechanismus erklären?

Eine Möglichkeit ist, dass das Calmodulin die GPV-spaltende Protease hemmt. Eine andere, dass durch Bindung von Calmodulin an GPV dieses (GPV) in einer Konformation gehalten wird, welche bewirkt, dass es von der spaltenden Protease nicht angegriffen werden kann. Dieses wäre ein Mechanismus, der auf ein Signal aus der Zelle nach außen beruht, wie er für die Regulation von Integrinen und ihre Ligandenbindungsstellen bekannt ist (Dustin et al 1989). Eine Plättchenaktivierung führt, wie die Calmodulin-Antagonisten, zur Dissoziation des Calmodulin von GPV. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Dissoziation von Calmodulin für beide Wege ursächlich ist, die zur Spaltung von GPV führt.

Welche Protease spaltet nun  $GPV_s$  von der Plättchenoberfläche bei Aktivierung der Plättchen?

Eine Protease, welche  $Ca^{2+}$ -abhängig aktiviert wird, ist das Calpain. GPV hat eine Sequenz, welche durch Calpain gespalten werden könnte (Hickey et al 1993). Calpain spaltet bei Plättchenaktivierung das „actin-binding protein“ Filamin und löst so die Brücke zwischen dem GPIb/V/IX Komplex und dem Aktin-Zytoskelett. Diese Reaktion wird durch die Calpain-Inhibitoren Calpeptin oder Calpastatin komplett inhibiert (Barnoy et al 1997). Daher wurde geprüft, ob durch Calpain-Inhibitoren die Abspaltung von  $GPV_s$  erreicht werden kann. Der Verlust der Epitope für den  $GPV_{fl}$  Antikörper SW16 und den  $GPV_{s-fl}$  Antikörper konnte durch die beiden Calpain-Inhibitoren nicht beeinflusst werden. Dieses Ergebnis schließt aus, dass die gesuchte Protease Calpain ist.

Sawicki et al (1997) berichteten, dass in Plättchen Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) vorhanden ist, welche bei der Plättchenaktivierung in eine aktive Form gebracht wird. Diese aktive Form kann dann weiter die Plättchen aktivieren. Auch die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) wurde in Plättchen entdeckt. Diese wird bei der Plättchenaktivierung freigesetzt und soll der aggregierenden Wirkung der MMP2 entgegenwirken (Fernandez-Patron et al 1999). Neben den klassischen Gelatinasen wurden auch ADAM10 in Plättchen detektiert (Colciaghi et al 2002).

Um zu untersuchen, ob das GPV<sub>s</sub> abspaltende Enzym eine Matrixmetalloproteinase sein könnte, wurden die Plättchen mit dem breit wirkenden MMP-Inhibitor BB3103 vorinkubiert, Wie Abbildung 4.3.9.2.1 zeigt, hemmt BB3103 vollständig und dosisabhängig die Spaltung von GPV.

Der auf Hydroxamate basierende MMP-Inhibitor BB3103 hemmt sowohl MMP2 als auch MMP9 (Mirastschijski et al 2002), besonders empfindlich ist es aber gegenüber ADAMs („**a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloproteinase“), insbesondere ADAM10 und TACE (ADAM17) (Mitsiades et al 1998, Ratzinger et al 2002). BB3103 hemmt die Spaltung von L-Selektin auf Leukozyten (Feehan et al 1996). Damit zeichnet sich wieder eine neue Parallele auf zwischen der Spaltung des L-Selektin und der Spaltung des GPV.

Zwei weitere MMP-Inhibitoren wurden getestet, TIMP-1 und der so genannte MMP-2 Inhibitor III. Beide hemmen dosisabhängig und vollständig die Spaltung von GPV, welche durch Kollagen auf der Thrombozytenoberfläche induziert wird. Zur Kontrolle wurden Plättchen mit reinen, aktivierten Gelatinasen inkubiert. Sowohl MMP2-, als auch MMP9-Zugabe führt zum Verlust der Epitope für den Antikörper GPV<sub>s-fl</sub>. Eine direkte Spaltung von GPV durch diese Matrixmetalloproteinasen ist daher wahrscheinlich.

Somit ist die Protease, welche GPV<sub>s</sub> bei Plättchenaktivierung abspaltet, eine Matrixmetalloproteinase (Abb. 5.3.2). Auch für andere Transmembranproteine, die bei Aktivierung der Zelle abgespalten wurden, wurden die Matrixmetalloproteinasen als auslösende Proteasen identifiziert (Diaz-Rodriguez et al 2000).

Da die gewählten Inhibitoren nicht spezifisch nur eine MMP inhibieren, konnte noch nicht identifiziert werden, um welche MMP es sich handelt und ob in allen Fällen die gleiche MMP aktiv ist. Mit Thrombozyten von TACE-defizienten Mäusen und MMP2, bzw. MMP9 knock out Mäusen könnte diese Frage in Zukunft weiter geklärt werden.

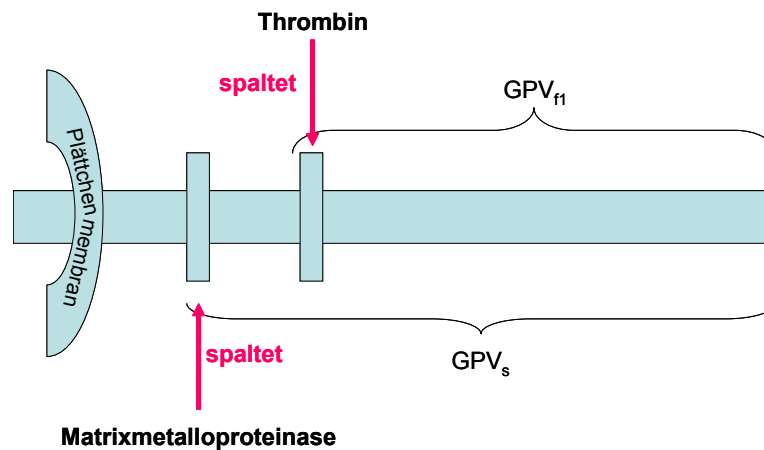


Abb. 5.3.2: GPV spaltende Proteasen

Über die biologische Funktion von GPV ist noch nicht viel bekannt. Die Arbeitsgruppe von Clemetson wies schon 1986 nach, dass GPV zwar Thrombin bindet und von Thrombin gespalten wird, aber nicht Teil des Thrombin Aktivierungsrezeptors ist (Bienz et al 1986). GPV ist Teil des GPIb/V/IX Komplex. Das Teilprotein GPIb $\alpha$  enthält eine Thrombinbindungsstelle, an die Thrombin mit hoher Affinität bindet (Clemetson 1995). Diese Bindung von Thrombin an GPIb ist notwendig, damit Thrombin Plättchen prokoagulant machen kann (Dörmann et al 2000) und ist notwendig, damit schon bei niedrigen Konzentrationen an Thrombin eine Plättchenaggregation ausgelöst werden kann (De Marco et al 1991). GPV<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine normale Expression des „Restkomplexes“ GPIb/IX. Überraschenderweise konnte in diesen Tieren über Thrombin schon bei geringen Konzentrationen eine Thrombusbildung induziert werden und die Blutungszeit war kürzer (Ramakrishnan et al 1999). In einer späteren Arbeit wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Fehlen von GPV erlaubt, dass Plättchen auch mit Thrombin aktiviert werden können, welches proteolytisch inaktiv ist. Diese Aktivierung verläuft über die Anbindung an das GPIb $\alpha$ . GPV-Spaltung demaskiert nach Meinung der Autoren die GPIb Bindungsstelle für Thrombin. Poujol et al (2000) fanden in einem anderen GPV<sup>-/-</sup>-Mausmodell keine Veränderung der GPIb/IX Expression und eine normale Adhäsion dieser Thrombozyten an die Gefäßwand. GPV-defiziente Plättchen haben normale Größe und Struktur und zeigen eine normale Fähigkeit, den vWF zu binden und über ihn zu agglutinieren. Auch die ATP-Sekretion aus den elektronendichten Granula und die Plättchenaggregation auf Thrombin wurden von Kahn et al (1999) als normal beschrieben.

Der Einfluss von GPV<sub>f1</sub> auf verschiedene Plättchenfunktionen wurde in dieser Arbeit untersucht. Gereinigtes GPV<sub>f1</sub> hat in einer Konzentration von 0,8 µM keinen Einfluss auf Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierungsreaktionen. Die gewählte Konzentration ist hochgerechnet etwa diejenige, die in der Nähe eines Thrombus zu erwarten ist. Weder die Fibrinogenbindung, noch die Freisetzung der α-Granula Proteine, hier gezeigt an der Expression des α-Granulamembranproteins CD62, noch die Freisetzung der Inhaltsstoffe der elektronendichten Granula (Marker-Expression von CD63) wurde durch die Zugabe von GPV<sub>f1</sub> beeinflusst.

Dies bestätigt, dass Thrombin zwar an GPV binden kann, GPV die Thrombin-induzierte Aktivierung aber nicht beeinflusst, wie bei Bienz et al beschrieben.

Auch auf die Plättchenaktivierung durch Kollagen hatte die Zugabe des GPV-Fragments keinen Einfluss. Fibrinogenbindung, CD62- und CD63-Expression waren nach Aktivierung der Plättchen in Gegenwart von GPV<sub>f1</sub> nicht von den Werten zu unterscheiden, die ohne GPV<sub>f1</sub>-Zusatz gemessen wurden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Moog et al (2001), die feststellten, dass GPV<sub>f1</sub> an Kollagen bindet und vermuteten, dass GPV für die Kollagen induzierte Plättchenadhäsion und –aggregation wichtig ist (Moog et al 2001). Ein monoklonaler Antikörper gegen GPV<sub>f1</sub> hemmt die Kollagen-induzierte Plättchenadhäsion und –aggregation. GPV-defiziente Plättchen aus k.o.-Mäusen dieser Arbeitsgruppe zeigten eine verringerte Adhäsion an Kollagen. Der Unterschied zwischen beiden knock-out-Modellen, welche die beobachtete Diskrepanz erklären könnte und auch die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, ist nicht bekannt.

In Übereinstimmung zu den Untersuchungen mit beiden GPV<sup>-/-</sup>-Mausmodellen wurde durch Zusatz von löslichem GPV<sub>f1</sub> keine Veränderung der Ristocetin-induzierten vWF-Bindung beobachtet. Mit und ohne GPV<sub>f1</sub> (0,8 µM) Zusatz wurde gleich viel vWF an die Thrombozyten gebunden, wenn den Plättchen Ristocetin zugesetzt wurde.

Die biologische Funktion von GPV bleibt damit noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.



## 6. Ausblick

Thrombospondin-1 wird in erhöhtem Maß aus aktivierten Plättchen freigesetzt und sorgt zusammen mit Heparin für eine verstärkte Thrombozytenaggregation. Bei Patienten mit voraktivierten Plättchen ist damit eine Behandlung mit Heparin nicht unkritisch. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Heparin in niedermolekularer Form in vitro zu geringerer TSP-1 vermittelter Aggregation geführt hat, wäre es interessant zu überprüfen, ob dieses Laborergebnis mit Untersuchungen an Patienten in (ex) vivo übereinstimmt. Desweiteren wäre es interessant herauszufinden, wie die Bindung des TSP-1 an Heparin verhindert werden kann.

Das TSP-1 Peptid RFYVVMWK aktiviert sowohl Thrombozyten als auch Monozyten und spielt vermutlich eine große Rolle in der Thrombus-Entstehung und der Entzündung. Es stellt sich daher die Frage, ob Peptide aus dem „Mutterprotein“ in vivo herausgeschnitten werden oder ob das „Mutterprotein“ seine Konformation so ändert, dass dieses Peptid für Zellaktivierungsvorgänge zugänglich wird.

Dazu müsste man die Protease(n) identifizieren, welche für das Herausschneiden verantwortlich ist (sind). Eine Inhibierung der Protease(n) könnte Grundlage neuer anti-thrombotischer Medikamente sein.

Über die Konformationsänderung des TSP-1 ist zur Zeit noch nichts bekannt. Eine Aufklärung dieser Mechanismen und Verhinderung der Konformationsänderung würde weitere anti-thrombotische Grundlagen legen.

Das Glykoprotein V wird bei Aktivierungsprozessen gezielt gespalten und liegt fragmentiert am Orte der Entstehung vor. Bei GPV knock out Mäusen konnte man eine erhöhte Thromboseneigung beobachten.

Es stellt sich die Frage, ob GPV Fragmente anti-thrombotische Eigenschaften haben oder GPV als intaktes Membranprotein anti-thrombotisch wirkt.

Um der Lösung dieses Problems näher zu kommen, wäre es interessant herauszufinden, ob das GPV Fragment mit Proteinen der Hämostase in Wechselwirkung tritt und wenn ja, wie diese Interaktion auf molekularer Ebene aussieht.

Da GPV in Abhängigkeit von der Thrombozytenaktivierung gespalten wird, könnte die Quantifizierung der gefundenen Fragmente Grundlage eines neuen diagnostischen Tests sein,

der auf Intensivstationen bei Patienten mit Erkrankungen, die mit einer aktivierten Hämostase einhergehen, breiten Einsatz finden könnte.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADAM10	Protein mit Disintegrin und Metalloproteinase enthaltender Domäne 10 (a disintegrin and metalloproteinase domain 10)
(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
APC	aktiviertes Protein C
APMA	4-Aminophenyl-Quecksilberacetat
APS	Ammoniumpersulfat
ATIII	Antithrombin III
BCA	Bicinchinon-Säure (bicinchoninic acid)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CBP	CSVTCG bindendes Protein
CGSE	Puffer, der Natriumcitrat, Glukose, Natriumchlorid und EDTA (Citrate-Glycose-Sodium-EDTA) enthält
COMP	Knorpel oligomeres Matrixprotein (cartilage oligomeric matrix protein)
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
DTS	elektronendichtes tubuläres System (dense tubular system)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor (epithel growth factor)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunfluoreszenz-Test (enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	Elektronenmikroskopie
FA	Formaldehyd
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GP	Glykoprotein

---

HAT	Heparin assoziierte Thrombozytopenie
HBD	Heparin-Bindungsdomäne
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
IAA	Iodacetamid
IAP	Integrin assoziiertes Protein (integrine associated protein)
Ig	Immunglobulin
ITIM	Immunrezeptor auf Tyrosin-basierendes Inhibitionsmotiv (immunereceptor tyrosine-based inhibitory motif)
k.o.	knock out
Mes	2-N-Morpholino-ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MHCC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
MMP 2/9	Matrix-Metalloproteinase 2/9
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
NGS	Ziegenserum (normal goat serum)
NM-Heparin	niedermolekulares Heparin
n.s.	nicht signifikant
OCS	offenes Kanalsystem (open canalicular system)
OPD	o-Phenylendiamin Dihydrochlorid
PAI-1/2	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1/2
PAR-1	Protease aktivierender Rezeptor (protease activating receptor)-1
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung (phosphat buffered saline)
PDGF	Wachstumsfaktor aus Plättchen (platelet derived growth factor)
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PE	R-Phycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten/Endothelzell Adhäsionsmolekül-1 (platelet/endothelium cell adhesion molecule-1)
PerCP	Peridin Chlorophyll
PGE-1	Prostaglandin E1
Plt	Plättchen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)

---

PS	Phosphatidylserin
PTCA	Perkutane transluminale Koronar Angioplastie (percutaneous transluminal coronary angioplasty)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TACE	TNF $\alpha$ verwandelndes Enzym (TNF $\alpha$ converting enzyme)
TBS	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan gepufferte Natriumchloridlösung (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TF	Gewebefaktor (tissue factor)
TFPI	Inhibitor des Gewebefaktor Reaktionswegs (tissue factor pathway inhibitor)
TGF $\alpha/\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\alpha/\beta$ (transforming growth factor $\alpha/\beta$ )
TIMP-1	Gewebesinhibitor 1 von Matrix-Metalloproteinasen (tissue inhibitor of metalloproteinases 1)
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
t-PA	gewebsabhängiger Plasminogen Aktivator (tissuetype plasminogen activator)
TRAP-6	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid-6 (thrombin receptor activatable peptide-6) (6-Aminosäuren)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan
TrK A	Tyrosin Kinase Rezeptor A
TSP-1	Thrombospondin-1
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
Tz	Thrombozyten
UF-Heparin	unfraktioniertes Heparin
u-PA	Urokinase Plasminogen Aktivator (urokinase plasminogen activator)
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (vasodilator-stimulated phosphoprotein)
vWF	von Willebrand Faktor
WGA	Weizenkeim Agglutinin (wheat germ agglutinin)

## 8. Literaturverzeichnis

- Adams JC. Thrombospondin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1997) 29, 861-5
- Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2001) 17, 25-51
- Akkermann J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ. Thrombose und Arteriosklerose-Pathophysiologie. *Thomae Thromboseforschung* (1987)
- Aktas B, Utz A, Hoenig-Liedl P, Walter U, Geiger J. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke* (2003) 34, 764-9
- Aktulga A, Ulutin ON. Platelets: Recent advances in basic research and clinical aspects. *Excerpta Medica* (1974) 185-91, Amsterdam
- Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* (2002) 106, 896-9
- Andrews RK, Munday AD, Mitchell CA, Berndt MC. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* (2001) 98, 681-7
- Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* (1999) 190, 1175-82
- Arnljots B, Dougan P, Bergqvist D. Antithrombotic and platelet activating effects of heparin in prevention of microarterial thrombosis. *Plast. Reconstr. Surg.* (1997) 99, 1122-8
- Arya M, Lopez JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Anvari B. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J. Thromb. Haemost.* (2003) 1, 1150-7
- Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* (1993) 262, 1436-40
- Aster RH. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *N. Engl. J. Med.* (1995) 332, 1374-6
- Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* (1999) 18, 37-48

- Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J. Immunol.* (2000) 165, 4624-31
- Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur. J. Immunol.* (1971) 1, 394-6
- Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1971) 68, 240-3
- Barnoy S, Glaser T, Kosower NS. Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* (1997) 1358, 181-8
- Bienz D, Schnippering W, Clemetson KJ. Glycoprotein V is not the thrombin activation receptor on human blood platelets. *Blood* (1986) 68, 720-5
- Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (1987) 8, 93-99
- Bonnefoy A, Hantgan R, Legrand C, Frojmovic MM. A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 5605-12
- Booth NA. Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* (1999) 12, 423-33
- Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* (1962) 196, 927-928
- Bornstein P. Thrombospondins as extracellular modulators of cell function. *J. Clin. Invest.* (2001) 107, 929-34
- Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr. Opin. Hematol.* (2001) 8, 263-9
- Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* (2001) 11, 130-5
- Burgess JK, Chong BH. The platelet proaggregating and potentiating effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and heparinoid in intensive care patients and healthy controls. *Eur. J. Haematol.* (1997) 58, 279-85
- Cauwenberghs N, Schlamadinger A, Vauterin S, Cooper S, Descheemaeker G, Tornai I, Deckmyn H. Fc-receptor dependent platelet aggregation induced by monoclonal antibodies against platelet glycoprotein Ib or von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* (2001) 85, 679-85
- Chung J, Gao AG, Frazier WA. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 14740-6

- Cicmil M, Thomas JM, Leduc M, Bon C, Gibbins JM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood* (2002) 99, 137-44
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* (1995) 21, 130-6
- Clemetson KJ., Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* (1995) 74, 111-6
- Colan SD, Trowitzsch E, Wernovsky G, Sholler GF, Sanders SP, Castaneda AR. Myocardial performance after arterial switch operation for transposition of the great arteries with intact ventricular septum. *Circulation* (1988) 78, 132-41
- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol. Med.* (2002) 8, 67-74
- Coller BS. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Annu. Rev. Med.* (1992) 43, 171-80
- Coller BS. Platelets and thrombolytic therapy. *N. Engl. J. Med.* (1990) 322, 33-42
- Coller BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J. Clin. Invest.* (1997) 100, S57-60
- Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* (2002) 415, 175-9
- Dardik R, Lahav J. Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. *Exp. Cell Res.* (1999) 248, 407-14
- Dardik R, Lahav J. The structure of endothelial cell thrombospondin. Characterization of the heparin-binding domains. *Eur. J. Biochem.* (1987) 168, 347-55
- Daws J. Lifting and moving patients. 3. A revision training programme. *N. Z. Nurs. J.* (1983) 76, 10-2
- de Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol. Med.* (2001) 7, 401-7
- De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW 2nd, Ruggeri ZM. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 23776-83
- Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* (2002) 106, 2442-7



- Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Montero JC, Yuste L, Pandiella A. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem. J.* (2000) 346, 359-67
- Dixit VM, Haverstick DM, O'Rourke KM, Hennessy SW, Grant GA, Santoro SA, Frazier WA. Effects of anti-thrombospondin monoclonal antibodies on the agglutination of erythrocytes and fixed, activated platelets by purified thrombospondin. *Biochemistry* (1985) 24, 4270-5
- Dorahy DJ, Berndt MC, Shafren DR, Burns GF. CD36 is spatially associated with glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3) on the surface of resting platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) 218, 575-81
- Dorahy DJ, Thorne RF, Fecondo JV, Burns GF. Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 1323-30
- Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* (2000) 96, 2469-78
- Dörmann D, Kardeous J, Zimmermann RE, Kehrel B. Flow cytometric analysis of agonist-induced annexin V, factor Va and factor Xa binding to human platelets. *Platelets* (1998) 9, 171-177
- Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* (1989) 341, 619-24
- Edens RE, LeBrun LA, Linhardt RJ, Kaul PR, Weiler JM. Certain high molecular weight heparin chains have high affinity for vitronectin. *Arch. Biochem. Biophys.* (2001) 391, 278-85
- Eika C. The platelet aggregating effect of eight commercial heparins. *Scand. J. Haematol.* (1972) 9, 480-2
- Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta.* (1971) 251, 427-34
- Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Ann. Med.* (2002) 34, 598-605
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* (2001) 108, 785-91
- Feehan C, Darlak K, Kahn J, Walcheck B, Spatola AF, Kishimoto TK. Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 7019-24

- Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb. Haemost.* (1999) 82, 1730-5
- Fox JE, Reynolds CC, Phillips DR. Calcium-dependent proteolysis occurs during platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 9973-81
- Fox JEB, Boyles JK, Bernd MC, Steffen PK, Aderson LK. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J. Cell Biol.* (1988) 106, 1525-38
- Francois PP, Preissner KT, Herrmann M, Haugland RP, Vaudaux P, Lew DP, Krause KH. Vitronectin interaction with glycosaminoglycans. Kinetics, structural determinants, and role in binding to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 37611-9
- Frazier WA, Gao AG, Dimitry J, Chung J, Brown EJ, Lindberg FP, Linder ME. The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 8554-60
- Frazier WA. Thrombospondins. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1991) 3, 792-9
- Freedman JE. CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis. Comment on: *Circ Res.* (2003) 92, 1041-8
- Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* (2000) 191, 1413-22
- Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb. Haemost.* (1995) 74, 224-7
- Gachet C. Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. *Int. J. Hematol.* (2001) 74, 375-81
- Gao AG, Frazier WA. Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 29650-7
- Gartner TK, Doyle MJ, Mosher DF. Effect of anti-thrombospondin antibodies on the hemagglutination activities of the endogenous platelet lectin and thrombospondin. *Thromb. Haemost.* (1984) 52, 354-7
- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron. Artery Dis.* (1997) 8, 121-8
- Hayward CS, Kalnins WV, Rogers P, Feneley MP, Macdonald PS, Kelly RP. Left ventricular chamber function during inhaled nitric oxide in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1999) 34, 749-54
- Heffner JE. Platelet-neutrophil interactions in sepsis--platelet guilt by association? *Intensive Care Med.* (1997) 23, 366-8

- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* (1998) 391, 591-4
- Hickey MJ, Hagen FS, Yagi M, Roth GJ. Human platelet glycoprotein V: characterization of the polypeptide and the related Ib-V-IX receptor system of adhesive, leucine-rich glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1993) 90, 8327-31
- Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Platelet-dependent action of high-dose factor VIIa. *Blood* (2002) 100, 364-5
- Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1997) 17, 646-53
- Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta.* (1998) 1388, 478-88
- Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur. J. Haematol.* (2001) 66, 143-51
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.* (2000) 6, 41-8
- Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J.* (2003) 17, 1490-2
- Kahn J, Walcheck B, Migaki GI, Jutila MA, Kishimoto TK. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* (1998) 92, 809-18
- Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, Lanza F, Trejo J, Coughlin SR. Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and Do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. *Blood* (1999) 94, 4112-2
- Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, Kiyoi T, Tadokoro S, Matsumoto K, Honda S, Kosugi S, Kurata Y, Matsuzawa Y. Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum. Genet.* (2001) 108, 459-66
- Kehrel B, Flicker E, Wigbels B, Osterfeld M, van de Loo J, Luscher EF. Thrombospondin measured in whole blood--an indicator of platelet activation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* (1996) 7, 202-5

- Keij JF, Herweijer H. Flow cytometry analysis and sorting of viable cells. In: W.T. Mason (Hrsg.): Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis. Biological techniques series (1992)
- Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF, Packham MA, Harfenist EJ. Factors influencing the deaggregation of chymotrypsin-treated human platelets aggregated by fibrinogen. *Thromb. Haemost.* (1983) 49, 196-8
- Klein B, Faridi A, von Tempelhoff GF, Heilmann L, Mittermayer C, Rath W. A whole blood flow cytometric determination of platelet activation by unfractionated and low molecular weight heparin in vitro. *Thromb. Res.* (2002) 108, 291-6
- Knight CJ, Panesar M, Wilson DJ, Patrinely A, Chronos N, Wright C, Clarke D, Patel D, Fox K, Goodall AH. Increased platelet responsiveness following coronary stenting. Heparin as a possible aetiological factor in stent thrombosis. *Eur. Heart J.* (1998) 19, 1239-48
- Knupp CL, White GC 2nd. Effect of active site-modified thrombin on the hydrolysis of platelet-associated glycoprotein V by native thrombin. *Blood* (1985) 65, 578-83
- Kosfeld MD, Frazier WA. Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin. *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 8808-14
- Kosfeld MD, Frazier WA. Identification of active peptide sequences in the carboxyl-terminal cell binding domain of human thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 16230-6
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227, 680-5
- Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell. Biol.* (1986) 103, 1635-48
- Legrand C, Thibert V, Dubernard V, Begault B, Lawler J. Molecular requirements for the interaction of thrombospondin with thrombin-activated human platelets: modulation of platelet aggregation. *Blood* (1992) 79, 1995-2003
- Leithner C, Sinzinger H, Stummvoll HK, Klein K, Silberbauer K, Peskar BA. Enhanced 6-oxo-PGF1 alpha levels in plasma during hemodialysis. *Prostaglandins Med.* (1980) 5, 425-7
- Leung LL, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen. *J. Clin. Invest.* (1982) 70, 542-9
- Leung LL. Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* (1984) 74, 1764-72
- Li Q, Loeb JA. Neuregulin-heparan-sulfate proteoglycan interactions produce sustained erbB receptor activation required for the induction of acetylcholine receptors in muscle. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 38068-75

- Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* (2003) 101, 4423-9
- Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y, Tandon NN, Van Der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes* (2002) 51, 3113-9
- Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* (1998) 137, S89-95
- Matala E, Alexander SR, Kishimoto TK, Walcheck B. The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J. Immunol.* (2001) 167, 1617-23
- McGregor JL, Catimel B, Parmentier S, Clezardin P, Dechavanne M, Leung LL. Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein IIIb. Interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 501-6
- Mirastschijski U, Impola U, Karsdal MA, Saarialho-Kere U, Agren MS. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo. *J. Invest.Dermatol.* (2002) 118, 55-64
- Misenheimer TM, Mosher DF. Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 1729-33
- Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Leone A, Tsokos M. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am. J. Pathol.* (1998) 153, 1947-56
- Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 364-9
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2002) 22, 1381-9
- Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, Freund M, Santer M, Kahn M, Nieswandt B, Gachet C, Cazenave JP, Lanza F. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* (2001) 98, 1038-46
- Morgenstern E, Korell U, Richter J. Platelets and fibrin strands during clot retraction. *Thromb. Res.* (1984) 33, 617-23
- Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Ultrastructure of the interaction between human platelets and polymerizing fibrin within the first minutes of clot formation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* (1990) 1, 543-6

- Newman DK, Hamilton C, Newman PJ. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood* (2001) 97, 2351-7
- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* (2000) 95, 930-5
- Noris P, Bertolino G, Previtali M, Ferrario M, Balduini CL. Heparin infusion facilitates ex vivo spontaneous platelet aggregation in patients with acute myocardial infarction who have undergone thrombolytic therapy. *Haemostasis* (1993) 23, 185-91
- Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* (2002) 45, 550-5
- Ormerod MG. Flow cytometry. *Microscopy handbooks 29 bios scientific publishers, Oxford* (1994)
- Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Dis. Mon.* (2003) 49, 7-13
- Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kubler W, Bode C. Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation* (1999) 100, 1533-9
- Peters JH, Baumgarten H. *Monoklonale Antikörper*. 1990 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) 75, 940-7
- Phillips DR, Law D, Scarborough RM. Glycoprotein IIb-IIIa in platelet aggregation: an emerging target for the prevention of acute coronary thrombotic occlusions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (1998) 122, 811-2
- Pill J, Metz J, Stegmeier K, Hartig F. Effects of daltroban, a thromboxane (TX) A2 receptor antagonist, on lipid metabolism and atherosclerosis. *Agents Actions Suppl.* (1992) 37, 107-13
- Poujol C, Ramakrishnan V, DeGuzman F, Nurden AT, Phillips DR, Nurden P. Ultrastructural analysis of megakaryocytes in GPV knockout mice. *Thromb. Haemost.* (2000) 84, 312-8
- Preissner KT, Seiffert D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb. Res.* (1998) 89, 1-21
- Raffael A. *Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie Labor-Medizin* (1988) 11, 89-97

- Ramakrishnan V, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridg e RB, Phillips DR. Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1999) 96, 13336-41
- Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol.* (2002) 168, 4361-71
- Rauterberg J, Kühn K. The renaturation behaviour of modified collagen molecules. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* (1968) 349, 611-22
- Reininger AJ, Reininger CB, Heinzmann U, Wurzing er LJ. Residence time in niches of stagnant flow determines fibrin clot formation in an arterial branching model--detailed flow analysis and experimental results. *Thromb. Haemost.* (1995) 74, 916-22
- Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor, *FASEB J.* (1993) 7, 308-16
- Sage SO, Rink TJ. Inhibition by forskolin of cytosolic calcium rise, shape change and aggregation in quin2-loaded human platelets. *FEBS Lett.* (1985) 188, 135-40
- Saglio SD, Slayter HS. Use of a radioimmunoassay to quantify thrombospondin. *Blood* (1982) 59, 162-6
- Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* (1980) 65, 64-73
- Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* (1994) 153, 3245-55
- Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 11300-6
- Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* (1997) 386, 616-9
- Scandura JM, Walsh PN. Factor X bound to the surface of activated human platelets is preferentially activated by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry* (1996) 35, 8903-13
- Schmitz G, Rothe G. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik* Verlag Schattauer, Stuttgart, New York (1994)
- Schmitz G, Wulf G, Bruning T, Assmann G. Flow-cytometric determination of high-density-lipoprotein binding sites on human leukocytes. *Clin. Chem.* (1987) 33, 2195-203

- Schneider DM, von Tempelhoff GF, Heilmann L. Retrospective evaluation of the safety and efficacy of low-molecular-weight heparin as thromboprophylaxis during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1997) 177, 1567-8
- Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N. Engl. J. Med.* (1996) 334, 1084-9
- Schvartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1999) 31, 539-44
- Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb. Haemost.* (1999) 82, 1145-52
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* (2001) 62, 1153-61
- Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 17049-57
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* (1985) 150, 76-85
- Speziale MV, Detwiler TC. Free thiols of platelet thrombospondin. Evidence for disulfide isomerization. *J. Biol. Chem.* (1990) 265, 17859-67
- Sun X, Skorstengaard K, Mosher DF. Disulfides modulate RGD-inhibitable cell adhesive activity of thrombospondin. *J. Cell Biol.* (1992) 118, 693-701
- Timmons S, Hawiger J. Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration. *Methods Enzymol.* (1989) 169, 11-21
- Tomiya Y, Kunicki TJ, Zipf TF, Ford SB, Aster RH. Response of human platelets to activating monoclonal antibodies: importance of Fc gamma RII (CD32) phenotype and level of expression. *Blood* (1992) 80, 2261-8
- Tulasne D, Judd BA, Johansen M, Asazuma N, Best D, Brown EJ, Kahn M, Koretzky GA, Watson SP. C-terminal peptide of thrombospondin-1 induces platelet aggregation through the Fc receptor gamma-chain-associated signaling pathway and by agglutination. *Blood* (2001) 98, 3346-52
- Tuszynski GP, Rothman VL, Deutch AH, Hamilton BK, Eyal J. Biological activities of peptides and peptide analogues derived from common sequences present in thrombospondin, properdin, and malarial proteins. *J. Cell Biol.* (1992) 116, 209-17



- Underwood PA, Kirkpatrick A, Mitchell SM. New insights into heparin binding to vitronectin: studies with monoclonal antibodies. *Biochem. J.* (2002) 365, 57-67
- Vallejo AN, Mugge LO, Klimiuk PA, Weyand CM, Goronzy JJ. Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J. Immunol.* (2000) 164, 2947-54
- Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* (1971) 15, 232-236
- Vincent JL. Infection/Inflammation and hemostasis. *Curr. Hematol. Rep.* (2003) 2, 407-10
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med.* (2002) 8, 349-357
- Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Penzes I, Kubler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM; KyberSept Trial Study Group. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* (2001) 286, 1869-78
- Wicki AN, Clemetson KJ. Structure and function of platelet membrane glycoproteins Ib and V. Effects of leukocyte elastase and other proteases on platelets response to von Willebrand factor and thrombin. *Eur. J. Biochem.* (1985) 153, 1-11
- Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* (1988) 175, 231-7
- Xia Z, Wong T, Liu Q, Kasirer-Friede A, Brown E, Frojmovic MM. Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* (1996) 93, 204-14
- Yasaka T, Mantich NM, Boxer LA, Baehner RL. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J. Immunol.* (1981) 127, 1515-8
- Zhang DX, Zou AP, Li PL. Adenosine diphosphate ribose dilates bovine coronary small arteries through apyrase- and 5'-nucleotidase-mediated metabolism. *J. Vasc. Res.* (2001) 38, 64-72
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* (1999) 399, 159-62

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel für die Stellung des interessanten Themas dieser Arbeit und die stets engagierten und hilfreichen Diskussionen im experimentellen und theoretischen Bereich.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. F. Spener danke ich für die Betreuung im Fachbereich Chemie der naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. J. Clemetson, Bern, Schweiz, für die Bereitstellung der hier von mir verwendeten, polyklonalen Antikörper.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Karakassopoulos vom Deutschen Roten Kreuz in Münster für die Überlassung zahlreicher „Buffy Coats“ für die Proteinaufreinigungen.

Für die Überlassung des humanen Kollagens Typ I bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Rauterberg, Institut für Arterioskleroseforschung, Münster.

Ich bedanke mich bei der Probandin K. I.-H. für ihre Bereitschaft zur Blutspende.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin danke ich für das herzliche Arbeitsklima sowie die stets bereitwillige Hilfe bei fachbezogenen und fachübergreifenden Problemen sowie der zahlreichen Blutspenden, Frau Dr. rer. nat. D. Dörmann, Frau Dr. rer. nat. K. Jurk, Frau Dr. rer. nat. S. Zippel, Frau Dr. rer. nat. H. Grahl, Frau S. Niemann, Frau U. Niehues und Herrn M. Glauner.

## Lebenslauf

Name: Martin F. Brodde

geboren: 23.11.1971 in Telgte, Westf.

Familienstand: ledig

Eltern: Prof. Dr. Otto-Erich Brodde  
Gieslind Brodde, geb. Mikosch

Schulbildung: 1978-1980: Grundschule Senden  
1980-1982: Josef-Grundschule Essen-Kupferdreh  
1982-1991: Carl-Humann-Gymnasium Essen-Steele  
5-1991: Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium: 10-1991: Immatrikulation zum Studium der Chemie  
24.04.1995: Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
27.06.1997: Diplom-Chemiker-Prüfung  
07.04.1998: Abgabe der Diplomarbeit, Betreuerin:  
PD. Dr. B. Kehrel, Innere Medizin, Abt. Experimentelle  
Hämostaseforschung, Betreuer im Fachbereich Chemie:  
Prof. Dr. K. Cammann  
seit 05.1998: Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin, UKM Münster, Frau Prof. Dr. B.  
Kehrel, Experimentelle und Klinische Hämostaseologie

Tätigkeiten: Studentische Hilfskraft an der Westfälischen Wilhelmsuniversität bei  
PD. Dr. B. Kehrel in der Inneren Medizin

Wissenschaftliche Hilfskraft an der Westfälischen  
Wilhelmsuniversität/Universitätsklinikum Münster bei Frau Prof. Dr.  
B. Kehrel in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und  
operative Intensivmedizin

---

Unterschrift: Martin Brodde