Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Markus Böck

#### Einfluss des NO-Donors DEA/NO auf die Integrität der inhibitorischen Signalwege und der Expression purinerger Rezeptoren bei der *ex vivo*-Lagerung von Thrombozyten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Valerie-Noelle Trulley

aus Bielefeld

Würzburg, im März 2018

Referent: Prof. Dr. med. Markus Böck

Koreferent: Prof. Dr. med. Peter Kranke

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einlei	tung	1
1.1	Physiologie der Thrombozyten1		
1.2	Aktivierende und inhibierende Systeme5		
	1.2.1	Purinerge Rezeptoren als Bestandteil aktivierender Systeme	5
	1.2.2	Zyklische Nukleotide als Bestandteil inhibitorischer Systeme	10
1.3	Herste für die	ellung von Thrombozytenkonzentraten und ihre Bedeutung e klinische Versorgung	14
1.4	Proble	ematik der storage lesion	16
1.5	NO-Do	onoren als hemmende Substanzen	18
1.6	Frage	stellung dieser Dissertation	22
2.	Mater	ial und Methoden	24
2.1	Mater	ial	24
	2.1.1	Geräte	24
	2.1.2	Chemikalien	26
	2.1.3	Lösungen & Puffer	29
	2.1.4	Kits	32
	2.1.5	Antikörper	32
	2.1.6	Gebrauchsmaterial	34
	2.1.7	Hard- und Software	36
2.2	Metho	oden	37
	2.2.1	Messmethoden	37
	2.2.1	.1 Western Blot - VASP-Phosphorylierung und PDE5A-Gehalt	41
	2.2.1	.2 ELISA zur Bestimmung der zyklischen Nukleotidspiegel	48
	2.2.1	.3 FACS - Untersuchung der Oberflächenexpression und der	
		Fibrinogenbindung	54

	2.2.2	Statistische Methoden 60	
3.	Ergeb	onisse61	
3.1	Wirku	ung von DEA/NO auf die VASP-Phosphorylierung in	
	gelag	jerten Thrombozyten 61	
3.2	Einflu	uss der Inkubation mit DEA/NO auf zyklische	
	Nukle	eotidspiegel in gelagerten Thrombozyten62	
3.3	PDE5	A-Gehalt nach Inkubation mit DEA/NO63	
3.4	Verän	nderungen der Oberflächenexpression von CD62P nach	
	DEA/I	NO-Inkubation64	
3.5	Ausw	virkungen von DEA/NO auf die Bindung von Fibrinogen	
3.6	Ausw	virkungen der DEA/NO-Inkubation auf die	
	Oberf	flächenexpression von ADP-Rezeptoren67	
	3.6.1	Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2Y169	
	3.6.2	Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2Y1270	
	3.6.3	Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2X171	
4.	Disku	ıssion72	
4.1	Die V	eränderungen der inhibitorischen Signalwege sind unter	
	Einflu	uss von DEA/NO verzögert73	
4.2	Der P	räaktivierungsgrad und die Aktivierbarkeit der	
	Thron	mbozyten während der Lagerung werden durch den	
	Einflu	iss von DEA/NO kaum verändert75	
4.3	Die M	Iobilisierbarkeit von purinergen Rezeptoren verbessert sich	
	unter		
4.4	Bewe	ertung der Eignung von DEA/NO als Additivum für TKs	
5.	Zusar	mmenfassung 82	
6.	Abkü	rzungsverzeichnis	
7.	Litera	aturverzeichnis	
8.	Abbil	dungsverzeichnis103	3

9.	Tabellenverzeichnis	04
Dan	ksagung	

Lebenslauf

# 1. Einleitung

# 1.1 Physiologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine korpuskuläre Bestandteile des Blutes und tragen zur Hämostase bei (Abb. 1.1) [1]. Im menschlichen Blut befinden sich normalerweise 150.000 bis 400.000 Thrombozyten pro  $\mu$ L [2]. Sie besitzen eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 2-5  $\mu$ M [3]. Thrombozyten halten sich für ca. 7 bis 10 Tage in der Blutbahn auf, bevor sie in der Leber und in der Milz sequestriert werden [2].



**Abb. 1.1:** Überblick zu Eigenschaften, Verwendung und Funktion von Thrombozyten Thrombozyten übernehmen wichtige Funktionen in der Blutgerinnung. Für die klinische Anwendung können Thrombozytenkonzentrate (TK) mittels verschiedener Verfahren hergestellt werden.

Thrombozyten werden im Knochenmark aus dem Zytoplasma der Megakaryozyten abgeschnürt [3]. Die Megakaryozyten entstehen aus den dort befindlichen hämatopoetischen Stammzellen [4]. Die Megakaryopoiese wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren gefördert, wie Thrombopoietin oder den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) [2]. Im Anschluss an die Megakaryopoiese erfolgt in reifen Megakaryozyten die Ausbildung von Proplättchen [4]: Dafür bilden reife Megakaryozyten Zytoplasmaausstülpungen aus, auch Pseudopodien genannt, welche über schmale Zytoplasmabrücken verbunden sind [2, 4]. Benötigte Zellorganellen und Granula werden aus dem Zentrum der Megakaryozyten in die endständigen Bereiche transportiert [4]. Aus den Enden der Proplättchen werden die reifen Thrombozyten abgespalten [2]. Die Megakaryozyten befinden sich in der Nähe der Sinusoide des Knochenmarks, sodass die freigesetzten Thrombozyten auf direktem Weg in die Blutbahn gelangen können [4].

Innerhalb der Thrombozyten befinden sich verschiedene Formen von Vesikeln [3, 5]: Dichte Granula ( $\delta$ -Granula),  $\alpha$ -Granula und Iysosomale Granula ( $\lambda$ -Granula) [3]. Weiterhin finden sich Mitochondrien, ein Zytoskelett, ein offenes System aus kleinen Kanälen und ein dichtes, tubuläres System in Thrombozyten, jedoch kein Zellkern [3].

Werden die Thrombozyten aktiviert, z.B. durch Bindung an die subendotheliale Matrix, kommt es zu einem intrazellulären Calciumanstieg, der zu einer Freisetzung von Vesikelbestandteilen führt [5]. In den  $\alpha$ -Granula sind diverse Faktoren enthalten, wie zum Beispiel der Platelet-derived growth factor (PDGF), der von-Willebrand Faktor (vWF) und Fibrinogen [5]. Zudem enthalten sie Proteine der Thrombozytenmembran, wie P-Selektin und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Glykoprotein IIb/IIIa), die mittels Exozytose an die Membran gebracht werden können [5]. Die dichten Granula erhielten ihre Bezeichnung nach ihrer Darstellung im Elektronenmikroskop [6]. Die Thrombozytenaktivatoren Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin sind u.a. Bestandteile der dichten Granula [5]. Zudem können Thrombozyten Mikropartikel freisetzen, welche die Koagulation fördern und die vermehrte Expression von Phosphatidylserin auf der Oberflächenmembran der Thrombozyten unterstützen [7].



Abb. 1.2: Thrombozytenaggregation an einem Endotheldefekt

Thrombozyten bewegen sich im Blutstrom in der äußeren Schicht entlang des Endothels (Abb. 1.2). Bei Endotheldefekten kommt es zur Exposition der subendothelialen Matrix, die Kollagen und den vWF enthält [5, 7]. Der vWF wird von Endothelzellen gebildet oder von aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Er befindet sich auch im Plasma [7]. Durch die Bindung des vWF an Kollagen verändert dieser seine Konformation [5, 7]. Die Thrombozyten können mittels des Glykoproteins Iba (GPIba), einem Bestandteil des von-Willebrand Faktor-Rezeptors (vWF-Rezeptor), an den exponierten vWF binden [5, 8]. Dadurch wird die Geschwindigkeit, mit der sich Thrombozyten entlang des Endothels bewegen, vermindert [1]. Eine feste Bindung an die Matrix erfolgt im nächsten Schritt über die Rezeptoren Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und Glykoprotein VI, dem Kollagenrezeptor [1, 8]. Darauf schließt sich eine Aktivierung der Thrombozyten mit Freisetzung des Inhalts von  $\alpha$ -Granula und dichten Granula, wie PDGF, vWF, Fibrinogen, ADP, Adenosintriphosphat (ATP) und Serotonin [7] an. Die freigesetzten Substanzen aktivieren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren weitere Thrombozyten in der Nähe des sich bildenden Thrombus [5, 7].

Anlagerung der Thrombozyten an den vWF und feste Bindung mittels GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$ . Aktivierung, Freisetzung des Inhalts von  $\alpha$ -Granula und dichten Granula, Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels. Aktivierung und Anlagerung weiterer Thrombozyten sowie Aggregation über Fibrinogenbrücken. Ausbildung eines Fibrinnetzes.

Thrombozytäre, G-Protein gekoppelte Rezeptoren können auch inhibitorische Systeme beeinflussen [8]. Zu den inhibierend wirkenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören z. B. die Rezeptoren für Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Adenosin [8].

Zu den aktivierenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören u. a. die ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 (s. 1.2.1), die Rezeptoren für Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub>, Epinephrin, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Serotonin und diverse Chemokinrezeptoren [8]. Humane Thrombozyten besitzen die Thrombinrezeptoren Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR1) und PAR4; murine Thrombozyten die Rezeptoren PAR3 und PAR4 [8]. Die Wirkung auf den PAR1 entfaltet sich bereits bei niedrigen Thrombinkonzentrationen, während der PAR4 erst bei hohen Thrombinkonzentrationen zur Aktivierung der Thrombozyten führt [8].

In Voruntersuchungen nahm während der fünftägigen Lagerung von TKs der Gehalt beider Rezeptoren ab, jedoch blieb die Funktionalität des PAR1 im Gegensatz zum PAR4 erhalten [9]. Deshalb wurde in dieser Arbeit TRAP-6, eine den PAR1 aktivierende Substanz, verwendet, um die Aktivierbarkeit während der fünftägigen Lagerungszeit zu untersuchen [10].

Die Aktivierung von Thrombozyten führt zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und zwar durch Freisetzung von Calcium aus Zellorganellen und aus dem dichten tubulären System [7]. Weiterhin kommt es zu einem Calciumeinstrom von extrazellulär über Kanäle der Plasmamembran [7]. Durch den Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels wird die Freisetzung von Granula, von Mikropartikeln und die vermehrte Expression von Phosphatidylserin an der Thrombozytenoberfläche, [6, 7] sowie die Entstehung von Thrombin aus Prothrombin, getriggert [7]. Thrombin generiert aus Fibrinogen Fibrin, welches für eine Festigung des Thrombus sorgt [11]. Gleichzeitig kommt es durch die Aktivierung von Integrinen zu einer Formveränderung der Thrombozyten, auch shape change genannt [7]: Die Thrombozyten bilden zuerst Zytoplasmafortsätze, die Pseudopodien, aus [7]. Im Verlauf werden die Thrombozyten flach und rund und enthalten etwas mehr Zytoplasma im Zentrum, in dem sich die Zellorganellen und das Zytoskelett befinden [7]. Durch Exozytose werden auch vermehrt P-Selektin (CD62P) und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert [1, 5, 7]. Integrin  $\alpha_{IIb}\beta$ 3 fungiert als Fibrinogenrezeptor, wobei Fibrinogen gleichzeitig an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eines anderen Thrombozyten binden kann und auf diese Weise die Thrombozytenaggregation in Gang setzt [1, 7].

### 1.2 Aktivierende und inhibierende Systeme

#### 1.2.1 Purinerge Rezeptoren als Bestandteil aktivierender Systeme

Thrombozyten besitzen drei Typen von purinergen Rezeptoren: P2Y12, P2Y1 und P2X1, über die sie aktiviert werden können (Abb. 1.3).



AC	Adenyiaccyclase	15	Filosphatayiniositor-5,4,5-thisphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	DAG	Diacylglycerol
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	CalDAG-GEF	Calcium- und Diacylglycerol-regulierter GTP-Austauschfaktor
РКА/РКС	Proteinkinase A/C	PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
VASP	Vasodilatator-stimuliertes	PL	Phospholipide
	Phosphoprotein	PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
GP	Glykoprotein	AA	Arachidonsäure
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinase	TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
Akt	Proteinkinase B	TX-Synthase	Thromboxan-Synthase
Rap1	Ras-related protein 1		
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase		
ΡLCβ	Phospholipase Cβ		

#### Abb. 1.3: Überblick zu Signalwegen der purinergen Rezeptoren

Der P2Y12-Rezeptor führt über Hemmung der VASP-Phosphorylierung und Stimulation der PI3K zu einer vermehrten Aktivierung von GPIIbIIIa. Zusätzlich werden über Aktivierung der PLCβ mit Erhöhung intrathrombozytärer Calciumspiegel die Exozytose, der shape change und die Aggregation gefördert. Die Calciumfreisetzung stimuliert zudem die PLA<sub>2</sub>. Dadurch wird vermehrt TXA<sub>2</sub> gebildet, das Thrombozyten aktiviert. Der P2Y1-Rezeptor fördert ebenfalls Exozytose, shape change und die Aktivierung der Thrombozyten über Stimulation der PLCβ. Der P2X1-Rezeptor wird durch ATP aktiviert und führt zu einem schnellen Calciumeinstrom.

Die Rezeptoren P2Y12 und P2Y1 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch ADP aktiviert und durch ATP antagonisiert werden [12, 13]. ADP wird intrazellulär in den dichten Granula der Thrombozyten gelagert und bei Aktivierung freigesetzt [14, 15].



#### Abb. 1.4: Signalweg des P2Y12-Rezeptors

Der P2Y12-Rezeptor ist an ein inhibitorisches G-Protein mit den Untereinheiten Gi2α und  $\beta\gamma$  gekoppelt (Abb. 1.4) [16]. Die inhibitorische Untereinheit Gi2α hemmt die Adenylatcyclase [16]. Dadurch werden die Synthese von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und die über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelte Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) gehemmt [16, 17]. Infolge der gehemmten VASP-Phosphorylierung wird der Fibrinogenrezeptor aktiviert, wodurch die Thrombozytenaggregation gefördert wird [16]. Der Fibrinogenrezeptor kann ebenfalls über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert werden [16]. Dies erfolgt durch Stimulation der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und durch Aktivierung weiterer Signalproteine, wie der Proteinkinase B (Akt), der Extra cellular-signal Regulated Kinase (ERK) und des Ras-regulierten Proteins 1 (Rap1) [16].

Die Untereinheit  $\beta \gamma$  aktiviert die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) [8, 16]. Diese bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) sowohl Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (IP3) als auch Diacylglycerol (DAG) [8, 16]. IP3 fördert über den IP3-Rezeptor die Mobilisation von Calcium aus intrazellulären Speichern, die vermehrte Freisetzung intrazellulärer Vesikel und den shape change [16]. Durch den erhöhten intrathrombozytären Calciumspiegel wird die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktiviert [16]. Diese synthetisiert aus Phospholipiden der Thrombozytenmembran Arachidonsäure (AA) [16]. Die Cyclooxygenase (COX) bildet aus AA Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) [18]. PGH<sub>2</sub> wird von der Thromboxan-Synthase (TX-Synthase) zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgesetzt [16, 18]. Durch die Freisetzung von TXA2 in die Umgebung können weitere Thrombozyten aktiviert werden [8]. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC) [8]. Dadurch kommt es über die Aktivierung des Calciumund DAG-regulierten GTP-Austauschfaktors (CalDAG-GEF) und Rap1 ebenfalls zu einer vermehrten Freisetzung intrazellulärer Vesikel und zur Förderung der Thrombozytenaggregation [8]. Die Aktivierung des P2Y12-Rezeptors führt ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Phosphatidylserin, P-Selektin und CD-40-Ligand auf der thrombozytären Oberfläche [16].

Die Aktivierung von P2Y12 trägt stärker zur Thrombozytenaggregation bei als die Aktivierung von P2Y1 [16]. Insgesamt ist das Zusammenspiel der Rezeptoren P2Y12 und P2Y1 für die Auslösung der Aggregation verantwortlich [16, 19].

8



Abb. 1.5: Signalweg des P2Y1-Rezeptors und der P2X1-Rezeptor als Ligandengesteuerter Kationenkanal

Der P2Y1-Rezeptor besitzt die Untereinheit Gαq (Abb. 1.5) [16]. Diese aktiviert die PLCβ, wodurch der damit verbundene Signalweg - wie zuvor beschrieben - stimuliert wird. Durch die Aktivierung des PLCβ-Signalweges wird vermehrt int-razelluläres Calcium freigesetzt, wodurch morphologische Veränderungen der Thrombozyten entstehen, und ihre Fähigkeit zur Aggregation wird gefördert [20]. Der P2Y1-Rezeptor sorgt vor allem für die Einleitung der Aggregation [16]. Die Aggregation ist dabei ohne zusätzliche Aktivierung des P2Y12-Rezeptors nur transient [16]. Folglich sind für eine effiziente Thrombozytenaggregation sowohl die Aktivierung des P2Y12- als auch die Aktivierung des P2Y1-Rezeptors verantwortlich [21].

Sind beide Rezeptoren durchgehend über wenige Minuten einer Stimulation durch ADP ausgesetzt, kommt es zur Desensibilisierung der Rezeptoren [22]. Dabei werden die Rezeptoren mittels Endozytose von der Zelloberfläche entfernt und in intrazellulären Speichern gelagert [23]. Ist die Stimulation beendet und der Agonist abgebaut, wird der P2Y12-Rezeptor im Zuge eines Recyclingprozesses innerhalb von 30 Minuten wieder an die thrombozytäre Oberflächenmembran befördert [23]. Für den Rezeptor P2Y1 konnte nach 30 Minuten dagegen noch nicht die komplette Reaktionsfähigkeit erreicht werden [23]. Die Desensibilisierung des Rezeptors P2Y12 wird vermutlich über G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen, die des Rezeptors P2Y1 über die Proteinkinase C gesteuert [22].

Der Rezeptor P2X1 ist ein nicht-selektiver, Liganden-gesteuerter Kationenkanal, der durch ATP aktiviert wird (Abb. 1.5) [24]. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einem Einstrom von Calcium und Natrium nach intrazellulär [24, 25], wodurch der shape change, die Aktivierung von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation gefördert werden [26, 27]. Die alleinige Aktivierung des P2X1-Rezeptors ist nicht in der Lage, eine Thrombozytenaggregation einzuleiten [26]. Bei fortwährender Stimulation erfolgt eine rasche Desensibilisierung des Rezeptors [28].

#### 1.2.2 Zyklische Nukleotide als Bestandteil inhibitorischer Systeme

Die cGMP- und cAMP-abhängigen Signalwege sind wichtige inhibitorische Systeme zur Regulation der Thrombozytenfunktion (Abb. 1.6).



#### Abb. 1.6: Signaltransduktion der inhibitorischen Signalwege

NO wird von der eNOS freigesetzt und aktiviert die sGC. Diese bildet cGMP, welches über eine Aktivierung der PKG zur Phosphorylierung von VASP, bevorzugt an Ser<sup>239</sup>, führt. PGI<sub>2</sub> aktiviert über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor die AC, welche cAMP bildet. cAMP aktiviert die PKA, die VASP bevorzugt an Ser<sup>157</sup> phosphoryliert. Ein negatives Feedback auf die cGMP-Synthese erfolgt über die PDE5, auf die cAMP-Synthese über die PDE3.

Der cGMP-abhängige Signalweg wird aktiviert durch Stickstoffmonoxid (NO), synthetisiert von der endothelialen NO-Synthase (eNOS), und durch diverse pharmakologisch zugeführte NO-Donatoren, wie Natriumnitroprussid, Glyceroltrinitrat oder DEA/NO [29]:

NO beziehungsweise die NO-Donatoren stimulieren die Guanylatcyclase, welche vermehrt zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) bildet [17, 29]. cGMP stimuliert wiederum die cGMPabhängige Proteinkinase G (PKG) [17, 29]. Der cAMP-Signalweg kann beispielsweise durch Prostaglandin E1 (PGE1), Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), Adenosin oder durch β-adrenerge Substanzen induziert werden [29]. Diese Induktoren aktivieren über die stimulierende Untereinheit  $G\alpha_s$  eines G-Protein gekoppelten Rezeptors die Adenylatcyclase [17, 29]. Dadurch entsteht intrathrombozytär vermehrt cAMP aus ATP, das die cAMPabhängige PKA aktiviert [17, 29]. Sowohl die Aktivierung der PKA als auch die der PKG führen zu einer Phosphorylierung von VASP an den Serinresten 157 (Ser<sup>157</sup>) und 239 (Ser<sup>239</sup>) [29, 30]. Die PKA phosphoryliert bevorzugt die Phosphorylierungsstelle Ser<sup>157</sup>, die PKG hingegen die Phosphorylierungsstelle Ser<sup>239</sup> [29-31]. Eine weitere Phosphorylierungsstelle am Threoninrest 278 (Thr<sup>278</sup>) wird dann phosphoryliert, wenn die Phosphorylierung an den anderen Phosphorylierungsstellen Ser<sup>157</sup> und Ser<sup>239</sup> bereits abgeschlossen ist [31]. Die Aktivität der inhibitorischen Signalwege kann über spezifische, gegen diese Phosphorylierungsstellen gerichtete Antikörper zum Beispiel mittels Western Blot oder Durchflusszytometrie bestimmt werden [17, 29]. Die Phosphorylierung von VASP durch die PKA und PKG führt zu einer Veränderung des Molekulargewichts von VASP in der SDS-Page Gelelektrophorese von 46 kDa zu 50 kDa [32]. Bei Phosphorylierung durch die PKG kann das Molekulargewicht auch bei 46 kDa bestehen bleiben, nicht jedoch bei Phosphorylierung durch die PKA [32]. Die PKA phosphoryliert vor allem die Phosphorylierungsstelle Ser<sup>157</sup>, die für die Veränderung des Molekulargewichts von VASP verantwortlich ist [31, 32].

VASP interagiert mit zellulären Adhäsionsproteinen, interzellulären Verbindungsproteinen oder Aktin-Myosinfilamenten und ist Bestandteil von Membranen [29]. Die Phosphorylierung von VASP hemmt die Thrombozytenadhäsion [33], ihre Aktivierung und ihre Aggregationsfähigkeit, aber nicht die Freisetzung von Calcium oder die Exozytose [17, 34]. Weiterhin kommt es zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts: Die Phosphorylierung bewirkt eine geringere Bindung von VASP an F-Aktin [29]. Dadurch wird die Polymerisation von Aktin und die Bündelung zu Filamenten gehemmt [29]. Zudem kommt es durch die VASP-Phosphorylierung zu einer Blockade an den Bindungsstellen des Fibrinogenrezeptors [35] und zu einer verminderten Expression von P-Selektin an der thrombozytären Oberflächenmembran [29, 33].

Die inhibitorischen Signalwege selbst werden auch durch die zyklischen Nukleotide beeinflusst [17, 29]. Über einen negativen Feedback-Mechanismus können cGMP und cAMP ihre eigene Freisetzung hemmen [17, 29]:

cGMP selbst oder die PKG aktivieren die Phosphodiesterase 5 (PDE5), welche wiederum die Bildung von cGMP herabsetzt [17, 29, 36]. Die Bildung von cAMP wird über die durch die PKA zuvor aktivierte PDE3 vermindert [17, 29]. Außerdem kann cGMP den cAMP-Signalweg über die PDE2 und die PDE3 beeinflussen [17, 29]. Über eine Aktivierung der PDE2 wird die Bildung von cAMP verringert [17, 29]. Über eine Hemmung der PDE3 kann sie vermehrt werden [17, 29]. Zusätzlich hat die PDE2 auch eine hemmende Wirkung auf die cGMP-Freisetzung (in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt) [17, 29]. Insgesamt wird der cGMP-Spiegel bevorzugt durch die PDE5, der cAMP-Spiegel bevorzugt durch die PDE2 und die PDE3 reguliert [17].

### 1.3 Herstellung von Thrombozytenkonzentraten und ihre Bedeutung für die klinische Versorgung

Zu den Blutprodukten werden diejenigen Arzneimittel gezählt, deren Wirkstoffe aus menschlichen Blutbestandteilen bestehen [37-40]. Blutprodukte mit zellulären Bestandteilen werden in der Untergruppe der Blutkomponenten zusammengefasst, wozu auch die TKs gehören [41]. Die klinischen Hauptanwendungsgebiete erstrecken sich auf die Prophylaxe und Therapie von Blutungen und auf Thrombozytopenien, z.B. bei vermehrtem Thrombozytenverbrauch, bei gestörter Thrombozytenbildung unter Chemotherapie [42] oder im Rahmen von Thrombozytenfunktionsstörungen.

TKs können durch Aphereseverfahren oder durch Aufbereitung aus Vollblut gewonnen werden. Beim Buffy Coat-Verfahren wird ein TK durch Aufbereitung von Buffy Coats aus mehreren Vollblutspenden präpariert [37, 42]. Beim Aphereseverfahren werden die Thrombozyten direkt während einer Spende mittels Zellseparator gesammelt, während die restlichen Blutbestandteile an den Spender zurückgegeben werden [37, 42]. Dabei enthält ein Apherese-TK die Thrombozyten von nur einem Spender [42]. Laut Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) wurden im Jahr 2016 insgesamt 580.728 TKs in Deutschland hergestellt (Angabe bezieht sich auf freigegebene Präparate), wobei der etwas größere Anteil mit 58 % auf Apherese-TKs entfiel [43].

Für die Lagerungsdauer und die Lagerungsbedingungen von TKs wurden folgende Vorschriften festgelegt, um das Risiko für eine bakterielle Kontamination der Präparate zu senken und eine ausreichende Funktionalität der Thrombozyten bei Transfusion zu gewährleisten [39, 44, 45]: TKs sind bei Temperaturen von 22 ± 2 °C unter kontinuierlicher Agitation zu lagern [37]. Die Lagerungsdauer beträgt maximal 4 Tage, ab 24 Uhr des Entnahmetages gerechnet [37]. Die Transporttemperatur sollte zwischen 20 °C und 26 °C liegen [37].

14

Da TKs zu den Arzneimitteln gehören, wird ihre Herstellung durch das Arzneimittelgesetz und die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung geregelt [39, 46]. Darüber hinaus sind das Transfusionsgesetz und die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten der Bundesärztekammer zu berücksichtigen [37, 40].

TKs müssen spezifische Qualitätsstandards für die Anwendung erfüllen, die regelmäßig an einer festgelegten Zahl von hergestellten TKs geprüft werden (Tab. 1.1) [37]. Es werden sowohl das Volumen, der Thrombozyten-, Leukozyten-, und Erythrozytengehalt als auch der pH-Wert bestimmt. Diese Werte müssen sich innerhalb festgelegter Grenzwerte bewegen [37]. Weiterhin findet im Produktionsprozess, wie auch direkt vor der Transfusion, eine optische Prüfung statt [37]. Der TK-Beutel muss intakt sein und es dürfen keine Aggregate entstanden sein. Unter vorsichtigem Schwenken muss ein Swirling-Phänomen (Wolkenbildung) erkennbar sein [37]. Darüber hinaus wird innerhalb eines Zeitraumes von 24 h vor Ende der Haltbarkeit bis 72 h nach Ende der Haltbarkeit des TK eine mikrobiologische Untersuchung auf Keimfreiheit durchgeführt [44].

Prüfparameter	Prüfkriterium	Prüfzeitpunkt
Volumen	gemäß Spezifikation	nach Fertigung
Thrombozytengehalt	≥2x10 <sup>11</sup> /Einheit	nach Fertigung (max. 2 Tage nach Entnahme)
		am Ende der Haltbar- keitsdauer
Leukozytengehalt	<1x10 <sup>6</sup> /Einheit	nach Fertigung
Erythrozytengehalt	<3x10 <sup>9</sup> /Einheit	nach Fertigung
pH-Wert	6,4 – 7,8 (bei min. 90 % der TK zwi- schen 6,5 – 7,6 liegend)	am Ende der Haltbar- keitsdauer
Optische Prüfung	Dichtigkeit des Beutels	nach Fertigung
	Swirling-Phänomen	vor Abgabe
	Fehlen von Aggregaten	am Ende der Haltbar- keitsdauer
Keimfreiheit	kein Wachstum	ab 24 h vor Ende der Haltbarkeitsdauer, max. 72 h nach deren Ende

Tab. 1.1: Kriterien für Qualitätssicherung von TKs (abgeändert nach [37])

# 1.4 Problematik der storage lesion

Der Begriff storage lesion beschreibt sämtliche Veränderungen, z. B. der Morphologie und der Funktion von Thrombozyten, die sich während der Herstellung und Lagerung von TKs entwickeln können [47]. Diese Veränderungen können sich folgendermaßen manifestieren: Thrombozyten setzen während des Lagerungsprozesses Metalloproteinasen frei, die die GPIbα und GPV des vWF-Rezeptors (GPIb-V-IX) abspalten [1]. Dadurch wird die Funktion des Rezeptors beeinträchtigt und die Bindung an den vWF nimmt ab [1]. Der vWF wird an beschädigten Stellen des Endothels exponiert und ist an Kollagen gebunden [1]. Folglich ist ein Andocken der Thrombozyten an diese Stellen erschwert [1]. Außerdem kommt es zu Veränderungen der Thrombozytenmorphologie von einer diskoiden zu einer sphärischen Form [1, 48], einem Phänomen, das auftritt, wenn Thrombozyten aktiviert werden. Darüber hinaus zeigt sich ein veränderter Calciumstoffwechsel mit einem Anstieg intrazellulärer Calciumspiegel. Dadurch verändert sich die Reaktion caliciumsensitiver, G-Protein gekoppelter Rezeptoren, wie der Rezeptoren für Epinephrin, ADP, TXA<sub>2</sub> und Thrombin [1]. Auch Veränderungen der Oberflächenmembran weisen darauf hin, dass Thrombozyten während des Herstellungs- und Lagerungsprozesses präaktiviert werden können: Es kommt u.a. zu einer vermehrten Expression von P-Selektin (CD62P), Phosphatidylserin und zur Ausbildung von Pseudopodien [49-51]. Diese Veränderungen auf der Thrombozytenmembran führen dazu, dass die Thrombozyten vermehrt von Makrophagen aus der Zirkulation entfernt werden [1, 52]. Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Oberflächenexpression und einer vermehrten Aktivierung von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , welche zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts führen [53, 54]. Einerseits wird die Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten durch die vermehrte Expression von Phosphatidylserin auf der Oberfläche und die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel gefördert [55]. Andererseits ist die Reaktionsfähigkeit auf die Agonisten ADP und ATP, die die Aggregation stimulieren, aufgrund der Desensibilisierung purinerger Rezeptoren vermindert [1, 56]. Die Desensibilisierung purinerger Rezeptoren wird durch die Freisetzung von ADP und ATP aus gelagerten Thrombozyten verstärkt [56]. Sie wurde insbesondere in TKs beobachtet, die mit geringeren Plasmaanteilen und mit Additivlösungen hergestellt wurden [56]. Als Ursache wird ein verminderter Anteil an Ektonukleotidasen diskutiert, die sich im Plasma befinden und das von den Thrombozyten freigesetzte ADP und ATP spalten. [11, 56].

Laut Voruntersuchungen entwickelten sich bei purinergen Rezeptoren auch funktionelle Defizite, die zur fehlenden Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten nach Zugabe von ADP am 2. und 5. Tag der Lagerung beitrugen [57]. Die Aktivität des P2Y1-Rezeptors nahm während der Lagerung kontinuierlich ab, die des P2X1-Rezeptors insbesondere initial nach der Apherese [57]. Die P2Y12-Rezeptorfunktion war dagegen nicht beeinträchtigt [57].

Niedrigere Lagerungstemperaturen von etwa 4 °C führten zur Dezeleration des Stoffwechsels und zu einem verbesserten Funktionserhalt von Thrombozyten, z.B. der Aggregationsfähigkeit [52, 58, 59], allerdings verbunden mit einer verringerten Zirkulationszeit nach Retransfusion [1]. Die verringerte Zirkulationszeit beruhte auf einer Clusterbildung von GPIb-V-IX-Rezeptoren. Die Clusterbildung beschleunigte die Entfernung der Thrombozyten durch Makrophagen in der Leber [60, 61].

Die inhibitorischen Systeme sind ebenfalls von der storage lesion betroffen. Während der Lagerung in Apherese-TKs zeigte sich in den Thrombozyten eine vermehrte Aktivierung des cGMP-abhängigen Signalwegs [10]. Diese Aktivierung war verbunden mit einem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels, einer Abnahme des PDE5A-Gehalts und der PDE5A-Aktivität sowie einer vermehrten VASP-Phosphorylierung. An der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>239</sup> war die Phosphorylierung stärker ausgeprägt als an der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>157</sup> [10]. Funktionell waren eine verringerte Aggregationsfähigkeit und eine herabgesetzte Fibrinogenbindung nachweisbar [10].

### 1.5 NO-Donoren als hemmende Substanzen

NO-Donoren gehören zu den Diazeniumdiolaten [62]. Diese chemischen Substanzen kennzeichnen sich dadurch, dass sie die funktionelle Gruppe  $N_2O_2^-$ (Diolatgruppe) besitzen [62], die über eine kovalente Bindung mit einem Nukleophil verbunden ist [63]. Das hier verwendete DEA/NO besteht aus dem Nukleophil Diethylamin und der funktionellen Gruppe (Abb. 1.7) [64].



#### Abb. 1.7: Chemische Strukturformel von DEA/NO

Die hier in dieser Arbeit verwendete Substanz DEA/NO gehört zu den Diazeniumdiolaten. Ihr nukleophiler Bestandteil ist Diethylamin.

Die Diazeniumdiolate sind in fester Form stabil [64]. In flüssiger Form zerfallen sie spontan unter Freisetzung von NO [64]. Der Zerfall der Diazeniumdiolate ist abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert und dem nukleophilem Bestandteil [64]. Er nimmt mit steigender Temperatur und fallendem pH-Wert zu [65]. Beim Zerfall entstehen in etwa 2 Mol NO pro Mol NO-Donor [64]. Dabei handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung [62].

NO wird *in-vivo* in Endothelzellen aus L-Arginin durch die membrangebundene eNOS hergestellt und verteilt sich über Diffusion [66, 67]. NO übernimmt vielfältige Funktionen im Gefäßsystem, wie die Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation und die Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand [67]. Weiterhin hemmt NO die Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) und die Adhäsion und Migration von Leukozyten durch die Gefäßwand [67]. Jedoch ist NO selbst aufgrund seiner Instabilität mit einer Halbwertszeit (HWZ) von wenigen Sekunden und seiner eingeschränkten Löslichkeit in wässrigen Lösungen für einen klinischen Einsatz, z. B. in der medikamentösen Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen oder als Zusatz zu TKs, nur begrenzt geeignet [68, 69]. Die Diazeniumdiolate hingegen besitzen mehrere Eigenschaften, die sich in der Anwendung im Vergleich zu anderen Substanzen, wie NO, Nitraten, S-Nitrosothiolen oder Natriumnitroprussid, als vorteilhaft erweisen [62]: Erstens besteht eine große Bandbreite in der Halbwertszeit der Diazeniumdiolate (Tab. 1.2) [62]. Eine besonders kurze HWZ hat der NO-Donor 1-(Hydroxy-NNOazoxy)-L-proline (PROLI/NO) mit 2 Sekunden [62]. Eine besonders lange HWZ von 20 Stunden hat (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (DETA/NO) [62]. Die HWZ des in dieser Dissertationsarbeit verwendeten NO-Donors DEA/NO liegt bei 2 Minuten (alle Angaben in Bezug auf eine Temperatur von 37 °C und einen pH-Wert von 7,4) [62]. Es kann entsprechend der gewünschten Wirkungszeit die passende Substanz ausgewählt werden. Zweitens ist der Zerfall spontan [65]. Es ist zuvor keine Aktivierung, beispielsweise durch ein Enzym, notwendig [65]. Drittens ist die Freisetzung von NO regelmäßig und wird nicht durch katalytisch wirksame Stoffe beeinflusst, wie z. B. durch das im Blut enthaltene Albumin [65]. Der Effekt der Diazeniumdiolate ist daher gut kalkulierbar [62]. Die NO-Freisetzung kann durch Änderung von pH-Wert und Temperatur beeinflusst werden [65].

	DEA/NO	DETA/NO	MAHMA/NO	PROLI/NO
HWZ	2-4 Min.	20-23 h	1-2 Min.	1,8 Sek.
(37 °C, pH 7,4)				
Freigesetztes NO	1,5	2	2	2
(in Mol pro Mol NO-Donor)				

 Tab. 1.2:
 Eigenschaften verschiedener NO-Donoren

Die Wirkung von NO-Donoren auf Thrombozyten und auf das Gefäßsystem wurden im Rahmen von in vitro- und in vivo-Studien untersucht: Bei Einsatz von PROLI/NO zeigte sich an einem thrombogenen Gefäßtransplantat eine verminderte Thrombozytenaggregation [70]. Im Tierversuch konnte der pulmonalarterielle Druck bei pulmonaler Hypertension gesenkt werden [70]. Experimentell eingeleitete Angiospasmen bei Hunden waren durch Gabe von DETA/NO dosisabhängig reversibel [71]. Durch MAHMA/NO konnten in vitro die inhibitorischen Signalwege in Thrombozyten aktiviert werden [72]. Es zeigten sich ein Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel mit vermehrter VASP-Phosphorylierung [72]. Die inhibitorische Wirkung erfolgte bei niedrigen Konzentrationen über cGMP-abhängige, bei hohen Konzentrationen über cGMPunabhängige Signalwege [72]. Bei Ratten kam es nach i.v.-Infusion von MAHMA/NO zur Hemmung der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und zu einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks [73, 74].

In Voruntersuchungen von Kobsar et al. zeigte sich nach *in vitro*-Zugabe von DEA/NO zu Thrombozyten aus Apherese-TKs eine überschießende Aktivierung inhibitorischer Signalwege mit vermehrter Akkumulation von cGMP und einer Zunahme der VASP-Phosphorylierung [75]. Diese Effekte waren mit zunehmender Lagerungsdauer stärker ausgeprägt [75]. Die Wirkung von DEA/NO auf purinerge Rezeptoren wurde dagegen bisher noch nicht untersucht.

21

Auf Thrombozyten von gesunden Probanden ohne Gefäßerkrankungen wirken niedrigere Konzentrationen von DEA/NO vor allem über die Aktivierung des cGMP-abhängigen Signalwegs [76]. In höheren Konzentrationen über 40 nM erfolgt die Wirkung zusätzlich vermehrt cGMP-unabhängig [76, 77]. In einigen Studien zeigte sich, dass bei Vorliegen von Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie oder bei Hypoxämie der Anteil der cGMP-unabhängigen Signalwege an der inhibitorischen Wirkung von NO variierte [78-80]. Weiterhin wurde die in vivo-Wirkung von DEA/NO an Affen untersucht, die nach einer Subarachnoidalblutung zerebrale Angiospasmen aufwiesen [81]. Die Substanz wurde mittels Infusion über einen Katheter an der Bifurkation der Arteria carotis communis verabreicht [81]. Nach Infusion konnte ein verbesserter zerebraler Blutfluss mit verminderter Flussgeschwindigkeit festgestellt werden [81]. Zerebrale Angiospasmen konnten durch den Einsatz von DEA/NO verhindert werden oder bildeten sich zurück [81]. Durch seine kurze HWZ hatte der NO-Donor keine relevanten Auswirkungen auf den Blutdruck [81]. Auch Hinweise auf eine Toxizität ergaben sich nicht [81].

### **1.6 Fragestellung dieser Dissertation**

Als Ursache für die storage lesion wird eine Präaktivierung von Thrombozyten im Rahmen des Herstellungs- und Lagerungsprozesses diskutiert [49-51]. Daher könnten Mechanismen, die zur Präaktivierung und damit potenziell zur Entwicklung der storage lesion beitragen, durch eine passagere Thrombozyteninhibition direkt nach TK-Herstellung unterbrochen werden.

In dieser Arbeit wird daher untersucht, ob eine Zugabe des kurzwirksamen und reversiblen NO-Donors DEA/NO in einer submaximalen Konzentration direkt nach TK-Präparation zu einer Abschwächung von ausgewählten Phänomenen der storage lesion während einer fünftägigen Lagerung führt. Durch den Einsatz einer Konzentration von 5 nM DEA/NO werden unspezifische Einflüsse, die nicht über die cGMP-abhängigen Signalwege vermittelt werden, vermieden.

Die Wirkung des Additivums DEA/NO auf die Integrität der gelagerten Thrombozyten wird anhand der VASP-Phosphorylierung, der Konzentration der zyklischen Nukleotid-Spiegel, des PDE5A-Gehalts und der Oberflächenexpression von purinergen Rezeptoren überprüft.

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	
CompoSeal Mobilea II (Schlauch-	Fresenius Kabi AG,	
schweiligerat)	Bad Homburg	
Ecomax X-Ray Film Processor	Protec GmbH & Co. KG,	
	Oberestenfeld	
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH,	
	Heidelberg	
Froster-Lab (Gefrierschrank)	Philipp Kirsch GmbH	
	Offenburg	
Herafreeze Top (Gefrierschrank)	Thermo Scientific Inc.,	
	Waltham, MA USA	
HI 2211 pH/ORP Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH,	
	Kehl am Rhein	
Julabo FL300 (Umlaufkühler)	AlphaMetrix Biotech GmbH,	
	Rödermark	
KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH,	
(Hämatologie-Analyseautomat)	Norderstedt	
Kühlschrank	Philipp Kirsch GmbH	
	Offenburg	

Bezeichnung	Hersteller
LRP3 Labor-Inkubator mit Schüttler	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Magneta Motor Type 421 MGMI-2	Audion Elektro
	Weesp, Niederlande
Mikro 200 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG,
	Tuttlingen
Mikro 200 R (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG,
	Tuttlingen
MFC-9460CDN (Scanner)	Brother International GmbH,
	Bad Vilbel
Multiskan FC (Photometer)	Thermo Scientific Inc.,
	Waltham, MA USA
neoMag Magnetrührer	Neolab, Heidelberg
PLJ 3500-2NM (Waage)	Kern & Sohn GmbH,
	Balingen
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH,
	München
Shaker DRS-12	Neolab, Heidelberg
Thermomixer comfort 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Thrombozyteninkubator TI-2	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH,
	München

Bezeichnung	Hersteller	
TSCD-II (Heißsiegelmaschine)	Terumo Deutschland GmbH,	
	Eschborn	
TV 200 Y twin-plate wide format mini-	Scie-Plas Ltd,	
	Cambridge, UK	
Universal 320 R (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG,	
	Tuttlingen	
VM4 (Rotator mit Vortexer)	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH,	
	Staufen	
Vortexgenie 2	Scientific Industries, Inc.	
	New York	
	USA	
Wellwash Versa	Thermo Scientific Inc.,	
	Waltham, MA USA	
WNB7 (Wasserbad)	Memmert GmbH + Co. KG,	
	Schwabach	
3-1810 (Tischzentrifuge)	Neolab, Heidelberg	

# 2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Bezeichnung	Hersteller
AquaPak®	Teleflex Medical GmbH, Kernen
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH,
(Nonfat dry milk)	München
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
DEA NONOate	Enzo Life Sciences, Inc.
[DEA/NO; 2-(N,N-Diethylamino)- diazenolate-2-oxide diethylammoni- um salt]	Farmingdale, NY, USA
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Sa-	Life Technologies GmbH,
	Darmstadt
Ethylenbis-(oxy-ethylen-nitrilo)-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG,
	Karlsruhe
Formaldehyd	Polysciences, Inc., Washington, USA

Bezeichnung	Hersteller	
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt	
HEPES sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Kaliumchlorid (KCI)	Merck KGaA, Darmstadt	
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt	
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Lad- der	Thermo Scientific, Rockford, USA	
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	Steinheim	
Rotiphorese® Gel (Acrylamidstamm- lösung mit 0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH + Co. KG,	
	Karlsruhe	

Bezeichnung	Hersteller
Salzsäure (HCI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
TRAP-6 Reagent	Hart Biologicals Ltd., Hartlepool, UK
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Triton®X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Steinheim

# 2.1.3 Lösungen & Puffer

Bezeichnung und Inhaltsstoffe		
EGTA, pH 7,0	0,5 M	
Elektrophorese-Puffer	8 L	
Trizma Base	48 g	
Glycin	116 g	
Ampuwa® Spüllösung	8 L	
SDS 10 % w/v	80 mL	

Bezeichnung und Inhaltsstoffe	
cGS-Puffer, pH6,5	500 mL
NaCl	150 mM
Natriumcitrat	12,9 mM
D-Glucose	30 mM
HEPES-Puffer, pH 7,4	500 mL
NaCl	150 mM
KCI	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
Milchlösung 6 % w/v (Blocking Puffer)	39 mL
Nonfat dry milk	2,3 g
PBS-Tween	39 mL
Milchlösung 3 % w/v	2 mL
Milchlösung 6%	1 mL
PBS-Tween	1 mL
PBS/BSA/Glucose	
Dulbecco´s PBS	
D-Glucose	5,5 mM
BSA	0,5 % w/v
Ponceau-S	
Ponceau-S	0,1 % w/v
Acetessigsäure	5 %

Bezeichnung und Inhaltsstoffe		
SDS-Stop-Lösung 3X		
Trizma-Base, pH 6,7	200 mM	
Glycerol	15 % (v/v)	
SDS	6 % (w/v)	
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)	
2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)	
Transfer-Puffer	31	
Trizma Base	9,1 g	
Glycin	43,5 g	
Ampuwa® Spüllösung	2400 mL	
Methanol	600 mL	
Tris Buffered Saline (TBS) 10X, pH 7,6		
Tris Base	24,2 g	
Nacl	80 g	
HCI (1X)	zur pH-Adjustierung	
Washing Puffer (PBS-T)	1 L	
PBS (10X)	100 mL	
Ampuwa®	900 mL	
Tween® 20	500 μL	
# 2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cyclic AMP EIA Kit	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Cyclic GMP EIA Kit	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
ECL Western Blotting Detection Rea- gents Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

# 2.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti Fibrinogen-FITC Mouse Monoclonal Antibody	BioCytex, Marseille, France	1:2
Anti-P2X1 Receptor (extra- cellular) Rabbit Polyclonal Antibody	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:6
Anti-P2Y1 Receptor (extra- cellular) Rabbit Polyclonal Antibody	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:6
Anti-P2Y12 Receptor (ex- tracellular) Rabbit Polyclonal Antibody	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:6
APC Mouse Anti-Human CD41a	BD Biosciences, Pharmingen, USA	1:10
APC Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences, Pharmingen, USA	1:10

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung           SmbH,         1:3000           SmbH,         1:3000           SmbH,         1:3000			
Blotting Grade	Bio-Rad Laboratories GmbH,	1:3000			
Goat Anti-Mouse IgG	München				
Horseradish Peroxidase Conjugate					
Blotting Grade	Bio-Rad Laboratories GmbH,	1:3000			
Goat Anti-Rabbit IgG	München				
Horseradish Peroxidase Conjugate					
CD62P/P-Selectin-FITC	Acris Antibodies, Inc., CA,	1:6			
Mouse Monoclonal Antibody	USA				
Goat Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA	1:100			
F(ab´) <sub>2</sub> fragment-FITC					
Mouse IgG1-FITC, Isotypic Control	BioCytex, Marseille, France	1:2			
Pan-Actin (D18C11)	Cell Signaling Technology,	1:1000			
Rabbit Monoclonal Antibody	Inc., MA, USA				
PDE5A Antibody,	Cell Signaling Technology,	1:1000			
Rabbit Polyclonal Antibody	Inc., MA, USA				
VASP (phospho-Ser 157),	nanoTools Antikörpertechnik	1:100			
clone 5C6	GmbH & Co. KG, Teningen				
Mouse Monoclonal Antibody					
VASP (phospho-Ser 239),	nanoTools Antikörpertechnik	1:100			
clone 16C2	GMDH & CO. KG, Teningen				
Mouse Monoclonal Antibody					

# 2.1.6 Gebrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Aufbewahrungsdose	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH
	Würzburg/Versbach
BD Discardit II slip tip Spritze 5 mL	Becton Dickinson GmbH,
	Heidelberg
BD Plastipak Luer slip tip Spritze	Becton Dickinson GmbH,
	Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Blotting Paper B003	Whatman GmbH,
	Dassel
Cellstar Centrifuge Tubes	Greiner Bio-One GmbH,
(15 mL, 50 mL)	Frickenhausen
Compoflex Einfach Blutbeutel	Fresenius Kabi AG,
	Bad Homburg
Combitips advanced 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Einmal-Insulinspritze	B. Braun Melsungen AG,
	Melsungen
Flow Cytometry Tubes 5 mL	Sarstedt AG & Co.
	Nümbrecht, Deutschland
Frischhalte-Folie	CleanPac Produkte
	Herzogenbuchsee, Schweiz

Bezeichnung	Hersteller
Gelloader-Spitzen	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH
	Würzburg/Versbach
Kryobox	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH
	Würzburg/Versbach
PP Tube sterile/non-sterile, 14 mL	Greiner Bio-One GmbH,
	Frickenhausen
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH + CO KG,
	Wertheim
Pipette mit Spitze	Greiner Bio-One GmbH,
(5 mL, 10 mL, 25 mL)	Frickenhausen
Pipetman (Pipette)	Gilson Inc. Middleton
	USA
Plate Sealers for 96 Wells	Uscn Life Science Inc., Wuhan, China
Protran BA 85 Nitrocellulose Transfer	Whatman GmbH,
Membrane	Dassel
Röntgenkassette	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH
	Würzburg/Versbach
Safety-Kanüle	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg

Bezeichnung	Hersteller
Schlauch-/Dialyseklemme PE gelb	Fa. SMS medipool GmbH,
	Ganting-Buchendorf
S-Monovette (4,9 mL)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Safe-seal Reagiergefäß (1,5 mL;	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
	Nümbrecht
Sterican Standardkanülen	B. Braun Melsungen AG,
	Melsungen
Super RX Fuji Safelight Glass No. 84	Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan
Syringe filtration unit Filtropur S 0.2 (Filter), Porengröße 0,2 μΜ	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Verbindungsdorn mit Injektionsan-	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.,
schluss	Nümbrecht
Verstärkerfolien	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH
	Würzburg/Versbach
Zusätzlicher Thrombozyten-	Terumo BCT, Inc.,
	Lakewood, Colorado, USA

# 2.1.7 Hard- und Software

Bezeichnung	Hersteller
BD CellQuest <sup>™</sup> Pro Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Version 6.0	
Image J 1.51f [82]	Wayne Rasband,
	National Institutes of Health, Bethes-

	da, Maryland, USA
MedCalc statistical software	MedCalc Software, Ostend, Belgien
Version 14.12.0	
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
PaperPort Version 12.1	Nuance Communications Inc.,
	Dublin, Ireland
Skanlt Software Version 3.1 for Mul- tiskan FC	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA USA

# 2.2 Methoden

# 2.2.1 Messmethoden

### Gewinnung der TKs für die Versuche

Die TKs wurden von gesunden Spenderinnen und Spendern nach Aufklärung und Einwilligung entnommen. Zur Anwendung kamen TKs, die mit automatisierter Apheresetechnik und festgelegter Spezifikation (2,5 × 10<sup>11</sup> Thrombozyten, gelöst in 250 mL autologem Plasma; Verhältnis ACD-A zu Plasma 1:10; Trima Accel Terumo BCT, Lakewood, CO, USA; Software LRS PLT, Plasma Set 5.1) in Übereinstimmung mit den aktuellen Richtlinien und der Herstellungserlaubnis präpariert wurden. Die Thrombozytensuspensionen wurden dabei aus dem venösen Blut der Spender maschinell durch Zentrifugation gewonnen [37, 42]. Die weiteren Blutbestandteile wurden wieder an den Spender zurückgeleitet [37, 42]. Die TKs wurden nach Herstellung unter kontinuierlicher Agitation in einem Labor-Inkubator temperaturkontrolliert bei 22  $\pm$  2°C gelagert [37, 42].

Die Entnahme und Verwendung von Thrombozyten für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden von der Ethikkomission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Votum-Nr. 47/12) genehmigt.

### Vorbereitung der Proben aus TKs

Die Thrombozyten wurden während der Gewinnung, Lagerung und zur Versuchsdurchführung in Kunststoffbeutel und –gefäße gegeben, da die Thrombozyten durch Glasoberflächen präaktiviert werden könnten [83].

Ein Teil der entnommenen Thrombozyten wurde direkt nach der Herstellung (nach einer Ruhephase für ca. 30 Minuten unter Raumtemperatur nach Beendigung der Apherese) mit 5 nM DEA/NO stimuliert, der andere Teil blieb unbehandelt. Für die Lagerung wurden sterile, gaspermeable Thrombozyten-Lagerbeutel von Terumo BCT verwendet. Die Lagerbeutel wurden mit dem Magneta Motor mittels Schweißnaht geteilt, um das Verhältnis von Oberfläche und Volumen nach Aufteilung der Thrombozyten zu erhalten. Compoflex® Einfach-Blutbeutel wurden ausschließlich zu Zwecken des Transfers verwendet. Sie sind nicht für eine Lagerung über mehrere Tage geeignet, da ein ausreichender Gasaustausch für ein Überleben der Thrombozyten nicht gewährleistet ist.

Zur Stimulation wurden 5 nM DEA/NO verwendet, um eine passagere, submaximale Hemmung der Thrombozyten zu erzielen [63, 84, 85]. Einflüsse der Apherese auf die Thrombozyten sollten verringert werden, gleichzeitig war aufgrund der kurzzeitigen Wirkung kein Effekt mehr im Beobachtungszeitraum zu erwarten. DEA/NO wurde nach Empfehlungen des Herstellers präpariert [86]. Es wurde zunächst eine 100 mM Stocklösung von DEA/NO hergestellt. Dafür wurden 10 mg DEA/NO mit 485,44  $\mu$ L 0,01M NaOH aufgelöst und für die Lagerung 10  $\mu$ L Aliquots auf – 80 °C tiefgefroren. Die Substanz wurde im alkalischen Milieu gelagert, da sie im sauren Milieu (pH=5) unmittelbar zerfällt [86]. Die Herstellung der Lösung erfolgte auf Eis unter Schutz vor Licht und unter möglichst kurzzeitigem Sauerstoffkontakt. Erst kurz vor der Stimulation wurde aus einem Aliquot unter Zugabe von PBS eine 5  $\mu$ M Lösung hergestellt. Die Endkonzentration im TK betrug 5 nM DEA/NO. Während der Stimulation wurde die Substanz auf Eis gelagert und durch braun gefärbte Eppendorf Safe-Lock Tubes vor Lichteinfluss geschützt.

Die Thrombozyten für die nicht stimulierten Proben und die mit DEA/NOstimulierten Proben wurden von einem Spender entnommen.

Für die Stimulation mit DEA/NO wurde an ein TK ein Compoflex® Einfach-Blutbeutel mittels Heißsiegelmaschine angeschlossen. Unter sterilen Bedingungen wurde die Schweißnaht aufgedrückt und ein Teil des TK in den Einfach-Blutbeutel eingelassen. Der Einfach-Blutbeutel wurde mit einem Verbindungsdorn mit Injektionsanschluss angestochen. Anschließend wurde der Injektionsanschluss mit einer sterilen 5 mL Spritze entlüftet. Die 5 µM DEA/NO Lösung wurde zur Keimreduktion mit einer sterilen 5 mL Spritze durch einen Filter (vgl. 2.1.6) gegeben. Die gefilterte Flüssigkeit wurde mit einer 1 mL Spritze aufgezogen und über den Injektionsanschluss in den Einfach-Blutbeutel injiziert. Die Flüssigkeit aus dem Einfach-Blutbeutel wurde mit der im TK verbliebenen vermischt. Anschließend wurde das Beutelsystem vor Entnahme des Probenmaterials ausgiebig durchmischt.

Die Thrombozyten wurden an den Tagen 0, 2 und 5 wie folgt in S-Monovetten transferiert. Am Tag 0 erfolgte der Transfer etwa 15 Minuten nach DEA/NO-Inkubation.

39

- Überführung von 10 mL TK aus Lagerbeutel in sterilen Compoflex® Einfach-Blutbeutel, Entlüften und steriles Abschweißen mittels Schlauchschweißgerät vom TK,
- 2) Verbindungsdorn mit Injektionsanschluss in Einfach-Blutbeutel gesteckt,
- 3) Einführen von Safety-Kanüle in Injektionsanschluss, darüber Befüllen von zwei S-Monovetten mit 4,9 mL Thrombozytensuspension.

Die vom TK entnommene Thrombozytensuspension in den S-Monovetten wurde folgendermaßen weiterverarbeitet:

- Hinzufügen von 29,4 µL 0,5 M Ethylenbis-(oxy-ethylen-nitrilo)-Tetraessigsäure (EGTA) zu 4,9 mL Thrombozytensuspension,
- Zentrifugieren der Thrombozytensuspension für 5 Minuten bei 430 g,
- Entnehmen des Überstands, Pellet in 5 mL cGS-Puffer gelöst,
- Zentrifugieren der Lösung für 5 Minuten bei 430 g,
- Entnehmen des Überstands, Pellet in 1 mL Hepes-Puffer gelöst,
- Zählen der Thrombozyten mit Hämatologie-Analyseautomat Sysmex KX-21N,
- Verdünnung der Lösung auf 3 x 10<sup>8</sup> Thrombozyten/mL,
- Verteilung der Suspension auf Eppendorf Safe-Lock Tubes,
- Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten.

Im Anschluss an diesen Waschvorgang wurden die Proben für die einzelnen Versuche vorbereitet.

# 2.2.1.1 Western Blot - VASP-Phosphorylierung und PDE5A-Gehalt

Mit dem Western Blot werden Proteingemische aufgetrennt und einzelne Proteine nachgewiesen [87, 88]. Dieses Verfahren besteht aus den Schritten Gelelektrophorese, Membrantransfer und Proteinnachweis [87-90].

### Vorbereitung der Proben für den Western Blot

Sowohl für den Nachweis der VASP-Phosphorylierung als auch für den Nachweis des PDE5A-Gehalts wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet:

- Zu 200 µL Thrombozytensuspension wurden 100 µL dreifache SDS-Stop-Lösung gefügt,
- Durchmischung mit Vortexgenie 2 und Inkubation der Proben bei 95 °C für 5 Minuten,
- Aufteilen der Suspension auf neue Eppendorf Safe-Lock Tubes (140 µL in jedes Eppendorf Safe-Lock Tube),
- Lagerung bei 20 °C.

Durch die Inkubation der Proben bei 95 °C und durch die Zugabe von SDS werden die enthaltenen Proteine denaturiert und liegen in ihrer Primärstruktur vor [87]. Die Primärstruktur wird durch SDS markiert [87]. Dadurch sind alle Proteine negativ geladen [87]. Während der Elektrophorese werden sie in Richtung der Anode laufend aufgetrennt [87]. Durch 2-Mercaptoethanol erfolgt eine Trennung von Bindungen zwischen Cystein-Resten der Proteine [91]. Bromphenolblau wurde eingesetzt, um die Proteinspur im Gel sichtbar zu machen.

### Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit einem Sammel- und einem Trenngel durchgeführt. Mittels des Sammelgels wurden die Proteine auf eine breite Linie konzentriert [88, 91]. Das Trenngel enthielt eine höhere Acrylamidkonzentration als das Sammelgel und bestand dadurch aus kleineren Poren [88, 91]. Im Trenngel wurden die Proteine nach Molekularmasse aufgetrennt [88, 91].

Sammelgel	5 %	Trenngel	10 %	
Ampuwa®	4,93 mL	Ampuwa®	15,8 mL	
30 % Acrylamid,	2,46 mL	30 % Acrylamid,	10 mL	
0,8 % Bisacrylamid		0,8 % Bisacrylamid		
0,5 M Trizma-Base,	1,88 mL	3 M Trizma-Base,	3,76 mL	
рН 6,7		рН 8,9		
10 % SDS w/v	150 µL	10 % SDS w/v	300 µL	
TEMED	7,5 µL	TEMED	15 µL	
10 % APS (0,1 g/mL)	300 µL	10 % APS (0,1 g/mL)	300 µL	

Zur Zusammensetzung der Gele:

Durch die Zugabe von APS und TEMED als Katalysatoren wird die Acrylamidpolymerisation gefördert [92].

Es wurde die Gelelektrophorese-Einheit TV 200 Y von Scie-Plas mit Gelen einer Größe von 16 mm x 6,5 mm und einer Dicke von 2 mm verwendet. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelelektrophorese-Einheit gefüllt. Auf das Gel wurde Ethanol gegeben, um zu verhindern, dass die Polymerisation des Gels durch Luftzufuhr gestört wird. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und die Gelelektrophorese-Einheit mit dem Sammelgel aufgefüllt. Die Taschen des Gels wurden durch Einfügen von Kämmen in die Gelelektrophorese-Einheit gebildet. Das Gel wurde für 12 bis 24 Stunden bei 4 °C gelagert, um eine vollständige Polymerisation und eine bessere Verfestigung des Gels sicherzustellen.

Probenaufbereitung und Befüllen der Gel-Taschen:

- Auftauen der Proben bei 65 °C f
  ür 1 Minute, danach Zentrifugation f
  ür 10 Sekunden, Vortexen,
- Befüllen der Gelelektrophorese-Einheit mit Elektrophorese-Puffer,
- Einfüllen je 20 µL einfacher SDS-Stop-Lösung, Marker und Proben in die Gel-Taschen. Eine Probe enthielt 6,6 µg Protein.

Als Marker für die Ermittlung des Molekulargewichts der Proteine wurde der PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder verwendet (s. Abb. 2.1).



#### Abb. 2.1: PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder

Der PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder wurde verwendet um das Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific übernommen [93].

Die Gelelektrophorese wurde bei 80 Volt betrieben, und zwar bis die Proteinspur durch das Sammelgel bewegt wurde und sich in einer breiten Linie konzentriert hatte. Danach wurde die Gelelektrophorese auf 150 Volt umgestellt und weitergeführt, bis die Proteinspur am Ende des Gels angekommen war.

# Wet-Blot Verfahren zur Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembran

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran nach dem Prinzip des Western Blot [89]. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde eine Trans-Blot Cell von Bio-Rad Laboratories verwendet.

Die Kammer wurde für das Wet-Blot Verfahren wie folgt aufgebaut:

- Entnahme des Gitters aus der Trans-Blot Cell, Einlegen der schwarzen Seite in Transferpuffer,
- Legen eines Schwamms auf jede Seite des Gitters, darauf jeweils Blotpapier,
- Einweichen der Nitrozellulosemembran in Transferpuffer,
- Legen des Gels auf Blotpapier auf die schwarze Seite, luftblasenfrei Auflegen der Nitrozellulosemembran,
- Auflegen eines weiteren Blotpapiers und eines Schwamms, Verschluss des Gitters und Einstellen in Trans-Blot Cell,
- Auffüllen der Trans-Blot Cell mit Transferpuffer.

Die Trans-Blot Cell enthielt neben dem Gitter mit der Membran einen Kühler zur Vermeidung von Proteinbeschädigung durch zu starke Hitze, sowie einen Magnetrührer, um die Kühlung der ganzen Trans-Blot Cell zu fördern.

Der Transfer wurde in der Trans-Blot Cell bei 1000 mA für eine Stunde durchgeführt.

### Proteinnachweis

Nach dem Proteintransfer wurden die gesuchten Proteine für ihren Nachweis mit Antikörpern markiert [90].

Für den Nachweis der VASP-Phosphorylierung und des PDE5A-Gehalts wurden mehrere vorbereitende Arbeitsschritte durchgeführt:

1) Färbung mit Ponceau S

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer mit Ponceau S gefärbt, um den Proteintransfer auf die Membran zu kontrollieren [94]. Dafür wurde 0,1 %-iges Ponceau S mit 5 % Acetessigsäure auf die Membran gegeben und diese darin geschwenkt, bis rotgefärbte Proteinbanden zu erkennen waren. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran in einen Waschpuffer gelegt und kontinuierlich geschwenkt, um das Ponceau S abzuwaschen (vgl. 2.1.3).

2) Blocken mit Trockenmilchpulver

Die Nitrozellulosemembran wurde zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen für 20 Minuten in 6 %-iger Milchlösung geblockt. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte in 3 %-iger Milchlösung. Um 3 %-ige Milchlösung herzustellen, wurde die 6 %-ige Milchlösung mit 1 mL PBS-Tween 1:2 verdünnt (vgl. 2.1.3).

3) Markierung mit Primär-Antikörper

Es wurden zwei verschiedene Primär-Antikörper in folgenden Verdünnungen verwendet:

• VASP (phospho-Ser 157), Mouse Monoclonal Antibody,

Verdünnung von 1:100;

• VASP (phospo-Ser 239), Mouse Monoclonal Antibody,

Verdünnung von 1:100;

• PDE5A, Rabbit Polyclonal Antibody, Verdünnung von 1:1000.

Die Antikörper binden nur an VASP, dessen Serin an Position 157, bzw. 239, phosphoryliert ist [95, 96]. Nicht-phosphoryliertes VASP und andere an Serin phosphorylierte Proteine werden nicht vom Antikörper gebunden [95, 96].

20 µL Primär-Antikörper (VASP) wurden in 2 mL Milchlösung auf die Nitrozellulosemembran gegeben, geschwenkt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. 3 µL Primär-Antikörper (PDE5A) wurden in 3 mL Milchlösung auf die Membran gegeben, geschwenkt und unter gleichen Bedingungen inkubiert.

4) Markierung mit Sekundär-Antikörper

Vor Zugabe des Sekundär-Antikörpers wurde die Nitrozellulosemembran 3 Mal für 5 bis 7 Minuten in PBS-Tween gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen.

Es wurden folgende Sekundär-Antikörper verwendet und wie genannt verdünnt:

- Blotting Grade Goat Anti-Mouse IgG, Meerrettichperoxidasekonjugiert, Verdünnung von 1:3000 (für Anti-VASP);
- Blotting Grade Goat Anti-Rabbit IgG, Meerrettichperoxidasekonjugiert, Verdünnung von 1:3000 (für Anti-PDE5A).

1 μL Sekundär-Antikörper wurden in 3 mL Milchlösung auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die Membran wurde unter Schwenken für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten 5 Waschschritte in PBS-Tween für 12 Minuten.

### 5) Chemilumineszenz-Reaktion

Der Proteinnachweis erfolgte mittels des ECL-Analysesystems von Amersham. Das ECL-Analysesystem basiert auf einer Chemilumineszenz-Reaktion: Das ECL-Analysesystem enthält Luminol und Phenole [97]. Das Luminol wird durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert und in einen angeregten Zustand überführt [97, 98]. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Licht einer Wellenlänge von 428 nm emittiert [97, 98]. Durch Zugabe von Phenolen wird die Stärke und Dauer des Lichtsignals erhöht [97].

Für den Proteinnachweis wurde je 1 mL der beiden Reagenzien des ECL-Analysesystems in ein Greiner-Zentrifugenröhrchen gegeben und durchgemischt. Im Anschluss wurde 1 mL der Lösung auf die Nitrozellulosemembran gegeben und für 1 Minute inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung durch Abtropfen der Membran und kurzes Auflegen von Blotpapier entfernt. Die Darstellung der Banden erfolgte mittels Röntgenfilmen. Sie wurden mit einem Ecomax X-Ray Film Processor von Protec in einer Dunkelkammer entwickelt, um ein Ausbleichen der Röntgenfilme zu verhindern. Für die Filmentwicklung wurde die Nitrozellulosemembran in einer Folie in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt. Die Röntgenfilme wurden auf die Membran gelegt und bei verschlossener Kassette jeweils für 30 Sekunden bis zu 5 Minuten dort belassen. Die Lichtfreisetzung führte zu einer Schwärzung der Röntgenfilme an den Stellen, an denen Primär- und Sekundärantikörper gebunden hatten. Für die Auswertung wurde ein für 5 Minuten belichteter Röntgenfilm ausgewählt.

### 6) Normalisierung gegen Aktin

Die auf den Röntgenfilmen gezeigten Banden wurden mit Image J quantifiziert und gegen Aktin normalisiert [94]. Der Proteinnachweis für Aktin erfolgte in den gleichen Arbeitsschritten wie beim Nachweis der VASP-Phosphorylierung und des PDE5A-Gehalts. Folgende Antikörper wurden verwendet:

• Primärantikörper

Pan-Actin, Rabbit Monoclonal Antibody, Verdünnung von 1:1000

• Sekundärantikörper

Blotting Grade Goat Anti-Rabbit IgG, Meerrettichperoxidasekonjugiert, Verdünnung von 1:3000.

### 2.2.1.2 ELISA zur Bestimmung der zyklischen Nukleotidspiegel

Die Analyse der cGMP- und cAMP-Spiegel basierte auf der in Vorpublikationen bereits beschriebenen Methode des Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) [99, 100].

### Vorbereitung der Proben für den ELISA

Der ELISA wurde mit Proben durchgeführt, die aus mit 5 nM DEA/NOstimulierten TKs entnommen wurden. Die Untersuchung der Proben wurde an den Tagen 0, 2 und 5 der Lagerung der TKs ausgeführt.

Die Thrombozyten wurden, wie in Absatz 2.2.1 beschrieben, gewaschen.

Die weitere Vorbereitung der Proben wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Zugabe von 20  $\mu L$  50 %-iger Trichloressigsäure (TCA) zu 200  $\mu L$  Probe,
- Durchmischung der Probe mit Vortexgenie 2, danach 10 Minuten K
  ühlung auf Eis,
- Zentrifugieren bei 21.380 g für 10 Minuten,
- Gabe des Überstands in neues Eppendorf Safe-Lock Tube,

- Extraktion von TCA mit Ether: 5-faches Volumen Ether f
  ür 1faches Volumen Probe (1 mL Ether f
  ür 200 µL Probe), Durchmischen mit Vortexgenie 2, Entfernung der Etherschicht,
- Zweimaliges Wiederholen der Ether-Extraktion,
- Entfernen des verbliebenen Ethers durch Erhitzen der Probe bei 70 °C f
  ür 5 bis 7 Minuten,
- Übertragen der Probe in neue Eppendorf Safe-Lock Tubes, Aufbewahrung bei -80 °C.

### ELISA zur Untersuchung des cGMP-Spiegels

Für den ELISA wurde das Cyclic GMP EIA Kit des Herstellers Cayman Chemical Company verwendet [101]. Zur Funktionsweise des Cyclic GMP EIA Kits (Abb. 2.2):

Die Grundlage bildete eine Mikrotiterplatte, deren Kavitäten monoklonale IgG (mouse anti-rabbit) enthielten [101]. Für die Untersuchung wurden die Probe, ein Tracer und ein cGMP-spezifischer Antikörper (rabbit) hinzugefügt [101]. Der Tracer bestand aus dem Enzym Acetylcholinesterase, das an cGMP gebunden war [101]. Der Tracer und das cGMP der Probe konkurrierten um den cGMPspezifischen Antikörper [101]. Der cGMP-spezifische Antikörper wurde von den monoklonalen IgG der Mikrotiterplatte gebunden [101]. Je mehr cGMP in der Probe enthalten war, desto weniger Tracer konnte an den cGMP-spezifischen Antikörper binden [101]. War weniger Tracer an der Mikrotiterplatte gebunden, fiel auch die durch den gebundenen Tracer und Ellmans Reagenz entstandene Farbreaktion geringer aus [101]. Das Ellmans Reagenz war zusammengesetzt aus Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) [101]. Das Acetylthiocholin wurde durch die Acetylcholinesterase hydrolysiert zu Thiocholin [101]. Aus Thiocholin und 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) bildete sich nicht-enzymatisch 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, die die Kavität gelb färbte und Licht bei einer Wellenlänge von 412 nm absorbierte [101].



#### Abb. 2.2: Schema zur Funktionsweise des Cyclic GMP EIA Kits.

Die Kavitäten waren mit monoklonalen IgG-Antikörpern beschichtet. Es wurden der Tracer, cGMP-spezifische Antikörper und die Probe mit freiem cGMP hinzugegeben. Die ungebundenen Antikörper wurden durch einen Waschvorgang entfernt. Durch die Farbreaktion aus gebundenem Tracer und Ellmans Reagenz entstand eine Gelbfärbung der Kavität. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Cayman Chemical übernommen [101, 102].

Für die Durchführung des ELISA wurden folgende Vorbereitungen getroffen:

Puffer:

- EIA Pufferkonzentrat 1:10 verdünnt mit Ampuwa® Spüllösung
- Waschpufferkonzentrat 1:400 verdünnt mit Ampuwa® Spüllösung

Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cGMP-Standard:

Für die Verdünnungsreihe wurde TCA (5 %) verwendet, da diese auch zur Vorbereitung der Proben eingesetzt wurde.

- cGMP-Standard gelöst in 1 mL EIA Puffer
- 10 µL des cGMP-Standards in 990 µL TCA (Verdünnung 1:100)

Nummer des Standards	0	1	2	3	4	5	6
Verdünnung			1:2,5	1:2,5	1:2,5	1:2,5	1:2,5
Konzentration (pmol/mL)		3,0	1,2	0,48	0,192	0,077	0,031
Zusammen- setzung	150 µL TCA	100 µL verdünnter c-GMP Standard (1:100)	90 μL TCA + 60 μL aus 1	90 μL TCA + 60 μL aus 2	90 μL TCA + 60 μL aus 3	90 μL TCA + 60 μL aus 4	90 μL TCA + 60 μL aus 5, danach 60 μL verworfen

 Tab. 2.1:
 Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cGMP-Standard

Die Proben wurden für den ELISA unverdünnt eingesetzt.

Acetylierung der Proben und cGMP-Standards:

- 70 μL Probe mit 14 μL Kaliumhydroxid (KOH) und 3,5 μL Essigsäure versetzt,
- Durchmischung mit Vortexgenie 2 für ca. 15 Sekunden,
- Hinzufügen von 3,5 µL KOH.

Die Acetylierung wurde eingesetzt, um die Sensitivität des ELISA zu erhöhen. Mit der Acetylierung können auch cGMP-Konzentrationen kleiner als 1 pmol/mL nachgewiesen werden [101].

Die für den ELISA verwendete Mikrotiterplatte bestand aus 96 Kavitäten. Sie enthielt Kavitäten

- gefüllt mit den Proben,
- gefüllt mit den cGMP-Standards,

- für den Leerwert,
- f
  ür die Untersuchung der unspezifischen Bindungen des Tracers an die Mikrotiterplatte,
- für die Untersuchung der maximalen Bindung des Tracers durch den cGMP-spezifischen Antikörper ohne Anwesenheit einer Probe mit cGMP.

Gemäß folgendem Pipettier-Schema wurde die Mikrotiterplatte gefüllt:

Kavität	Puffer (µL)	Probe/ cGMP- Standard (µL)	Tracer (μL)	Antikörper (µL)	
Leerwert					
Unspezifische Bindung	100		50		
Maximale Bindung	50		50	50	
Probe/cGMP- Standard		50	50	50	

Tab. 2.2: Pipettier-Schema der Mikrotiterplatte für den ELISA

Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte für 18 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kavitäten entleert und die Mikrotiterplatte 5 Mal mit 300 µL Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 200 µL Ellmans Reagenz in jede Kavität gefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Plastikfolie abgedeckt und in Dunkelheit auf dem Schüttler für 1 Stunde und 10 Minuten inkubiert.

Die Mikrotiterplatte wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem Multiskan FC Photometer abgelesen. Es wurde für das Ablesen vorausgesetzt, dass die Absorption in der Kavität, in der die maximale Bindung des Tracers an den spezifischen cGMP-Antikörper gemessen wurde, zwischen 0,3 und 1,0 arbitrary units (A.U.) lag [101].

Mithilfe der Skanlt 3.1 Software wurde die Standardkurve erstellt und die Konzentration der Proben in ng/mL berechnet.

### ELISA zur Untersuchung des cAMP-Spiegels

Es wurde das Cyclic AMP EIA Kit des Herstellers Cayman Chemical Company verwendet [102]. Der ELISA ist analog aufgebaut wie das Cyclic GMP EIA Kit. Es konkurrieren das cAMP der Probe und ein Tracer, bestehend aus cAMP gebunden an das Enzym Acetylcholinesterase, um einen cAMP-spezifischen Antikörper [102].

Vorbereitungen für den cAMP-ELISA:

Der EIA Puffer und der Waschpuffer wurden wie für den cGMP-ELISA verdünnt.

Für die Verdünnungsreihe wurde TCA (5 %) verwendet, da diese auch zur Vorbereitung der Proben eingesetzt wurde.

Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cAMP-Standard:

- cAMP-Standard gelöst in 1 mL EIA Puffer,
- 8 µL des cAMP-Standards in 292 µL TCA (Verdünnung 1:37), weiter verwendet f
  ür Erstellen des Standards 1.

Nummer des Stan- dards	0	1	2	3	4	5	6	7
Verdünnung		1:20	1:2,5	1:2,5	1:2,5	1:2,5	1:2,5	1:2,5
Konzentra- tion		10	4	1,6	0,64	0,256	0,103	0,041
(pmol/mL)								
Zusammen- setzung	150 μL TCA	142,5 μL TCA +	90 μL TCA +	90 μL TCA +	90 µL TCA +	90 µL TCA +	90 μL TCA +	90 µL TCA +
		7,5 μL c-AMP Standard (1:37)	60 μL aus 1	60 μL aus 2	60 µL aus 3	60 μL aus 4	60 μL aus 5	60 μL aus 6, da- nach 60 μL ver- worfen

Tab. 2.3: Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cAMP-Standard

Die Proben wurden für den ELISA unverdünnt eingesetzt.

Die Acetylierung, das Pipettier-Schema der Mikrotiterplatte, die Inkubationszeiten und die Messung der Mikrotiterplatte wurden wie beim Cyclic GMP EIA Kit durchgeführt (vgl. ELISA zur Untersuchung des cGMP-Spiegels).

### 2.2.1.3 FACS - Untersuchung der Oberflächenexpression und der Fibrinogenbindung

### Technik

Das Fluorescent activated cell sorting (FACS) besitzt eine Charakterisierungsund eine Sortierfunktion [91]:

Aus einer Zellsuspension können einzelne Zellen auf ihre Eigenschaften hin untersucht und gemäß derer sortiert werden [91].

Die Zellsuspension wird zu Beginn in einen zellfreien Flüssigkeitsstrom aufgenommen [103-105]. Durch Vibration werden die einzelnen Zellen innerhalb von Tröpfchen isoliert [104, 105]. Kurz bevor der Flüssigkeitsstrom in Tröpfchen aufgeteilt wird, wird jede einzelne Zelle mit einem Laser bestrahlt [104, 105]. Es wird die Vorwärtsstreuung zur Bestimmung der Zellgröße und die Seitwärtsstreuung zur Bestimmung der Granularität der Zelle gemessen [104, 105]. Zudem können Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine über den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper bestimmt werden [105, 106]. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laserstrahl angeregt und emittiert ein Signal einer bestimmten Wellenlänge [106]. Dieses Signal wird von einem Detektor registriert [106]. Vor dem Detektor befindet sich ein Bandpassfilter, der für einen Bereich um diese Wellenlänge durchlässig ist [106]. Das Registrieren von Wellenlängen außerhalb dieses Bereichs soll durch den Bandpassfilter vermindert werden [106].

Die in Tröpfchen isolierten Zellen werden mit unterschiedlichen elektrischen Ladungen versehen [103, 105]. Dadurch können sie anhand der vorher bestimmten Eigenschaften in verschiedenen Sammelgefäßen sortiert werden [103, 105].

Für die Versuche dieser Dissertationsarbeit wurde ein FACSCalibur von Becton Dickinson verwendet. Das FACS-Gerät besitzt einen 488 nm Argon-Ionen-Laser mit Detektoren für Fluoreszenzsignale der Wellenlängen 530/30 nm, 585/42 nm und >670 nm [107]. Zusätzlich enthält es einen 633 nm Dioden-Laser mit zugehörigem Detektor für Wellenlängen im Bereich von 661/16 nm [107]. Zudem sind eine Diode zum Messen der Vorwärtsstreuung und ein Detektor zum Messen der Seitwärtsstreuung enthalten [107].

Für die Datenerhebung und –analyse wurde die BD CellQuest Pro Software verwendet.

Mit Hilfe der BD CellQuest<sup>™</sup> Pro Software wurde die Thrombozytenpopulation durch Gating (R1) für die Analyse ausgewählt. Unspezifische Signale und Zelldetritus wurden durch Gating und den M-Gradienten von der Analyse ausgeschlossen (Abb. 2.3) [108, 109]. Die Software ermittelte das mittlere Fluoreszenzsignal für die untersuchten fluoreszenzmarkierten Proteine, das für die Auswertung weiterverwendet wurde.



# Abb. 2.3: Darstellung eines Scattergramms erstellt mit der BD Cellquest<sup>™</sup> Pro Software

A. Gezeigt ist ein Dot Plot mit Angabe der Seitwärtstreuung (SSC) zur Bestimmung der Zellgranularität auf der x-Achse und der Vorwärtsstreuung (FSC) zur Bestimmung der Zellgröße auf der y-Achse. Mit dem Gate R1 kann die gesuchte Zellpopulation ausgewählt werden.

B. Histogramm Plot mit Darstellung der Intensität des Fluoreszenzsignals auf der x-Achse (FL1) und Darstellung der gezählten Ereignisse auf der y-Achse (Counts).

### Probenvorbereitung für die FACS-Analyse

Es wurden unstimulierte TKs und mit 5 nM DEA/NO stimulierte TK an den Tagen 0, 2 und 5 untersucht. Ein Teil der unstimulierten Proben und ein Teil der Proben mit DEA/NO wurde mit dem Thrombinrezeptor Aktivator Peptid 6 (TRAP-6) versetzt, um die Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu untersuchen. Der zweite Teil der Proben blieb im Vergleich zum ersten Teil ohne Zusatz von TRAP-6.

Die Thrombozyten wurden auf die Expression folgender Glykoproteine und Oberflächenrezeptoren analysiert:

• Expression der ADP-Rezeptoren P2X1, P2Y1 und P2Y12;

- Expression von P-Selektin (CD62P);
- Fibrinogenbindung mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorkomplex (CD41a).

Die Gewinnung der TKs und die Entnahme des Probenmaterials daraus erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

Die Thrombozytensuspension aus zwei 4,9 mL S-Monovetten mit Citrat wurde nach folgendem Pipettier-Schema weiter verarbeitet:

1a. Isotypkontrolle CD41a 1b. CD41a	17,5 μL PBS + 12,5 μL TK + 3 μL anti-CD41a-APC <b>iso- typ</b> 17,5 μL PBS + 12,5 μL TK + 3 μL <b>anti-CD41a-APC</b>	<ul> <li>→15 Min. Raum- temperatur (RT), im Dunklen (nur bei Isotypkontrol- le für Proben für ADP-Rezeptor- Messung)</li> </ul>
		15 Min., 37 °C, im Dunklen
2. P2X1	25 μL PBS + 25 μL TK + 6 μL <b>anti-CD41a-APC</b> + 10 μL <b>anti-P2X1</b>	<ul> <li>→15 Min. RT, im Dunklen</li> <li>→danach</li> <li>15 Min., 37 °C, im Dunklen</li> </ul>
3. P2Y1	25 μL PBS + 25 μL TK + 6 μL <b>anti-CD41a-APC</b> + 10 μL <b>anti-P2Y1</b>	<ul> <li>→15 Min. RT, im Dunklen</li> <li>→danach</li> <li>15 Min., 37 °C, im Dunklen</li> </ul>
4. P2Y12	25 μL PBS + 25 μL TK + 6 μL <b>anti-CD41a-APC</b> + 10 μL <b>anti-P2Y12</b>	<ul> <li>→15 Min. RT, im Dunklen</li> <li>→danach</li> <li>15 Min., 37 °C, im Dunklen</li> </ul>
5. CD62P	30 μL PBS + 30 μL TK + 6 μL <b>anti-CD41a-APC</b> + 10 μL <b>anti-CD62P-FITC</b>	→15 Min. RT, im Dunklen
<ul><li>6a. Isotypkontrolle</li><li>Fibrinogen</li><li>6b. Fibrinogen (Fg)</li></ul>	15 μL TK + 3 μL anti-CD41a- APC + 15 μL anti-Fg-FITC isotyp 30 μL TK + 6 μL anti-CD41a- APC + 30 μL anti-Fg-FITC	→15 Min. RT, im Dunklen

 Tab. 2.4:
 Pipettier-Schema f
 ür die FACS-Analyse

Die Proben 2 bis 5 und 6 b wurden auf zwei Safe-Lock Tubes aufgeteilt:

- 1) unstimuliert: 30 µL TK-Probe + 1 µL PBS →2 Minuten bei 37 °C
- 2) 10 µM TRAP-6: 30 µL TK-Probe + 1 µL TRAP-6 (0,3 mM) →2 Minuten
   bei 37 °C (1:30 Verdünnung von TRAP-6)
- Abstoppen der Reaktion mit 3 µL 10 %-igem Formaldehyd (final 1 %) für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Im Anschluss daran wurden folgende Schritte durchlaufen:

Proben für CD62P und Fibrinogen:

 Verdünnung der Proben f
ür CD62P und Fibrinogen mit 500 μL PBS/BSA/Glc-Lösung; danach Aufbewahrung im Dunklen bei 4 °C

Proben für ADP-Rezeptoren:

- Zentrifugieren der Proben f
  ür ADP-Rezeptoren bei 21.380 g f
  ür 2 Minuten bei Raumtemperatur; 
  Überstand verworfen;
- Lösen des Pellets in 60 µL PBS/BSA/Glc-Lösung (vgl. 2.1.3) versetzt mit einem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper (vgl. 2.1.5; 1:100 verdünnt in PBS/BSA/Glc-Lösung), erkennt die an ADP-Rezeptoren gebundenen Primär-Antikörper;
- Inkubation für 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur;
- Verdünnung der Proben mit 500 µL PBS/BSA/Glc-Lösung.

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) hat sein Absorptionsmaximum bei 495 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm [106, 110]. Er wird durch den Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt [107, 110].

Der Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) hat sein Absorptionsmaximum bei 650 nm, sein Emissionsmaximum bei 660 nm und wird durch den Dioden-Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm angeregt [106, 107, 110].

## 2.2.2 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen MedCalc und Microsoft Excel durchgeführt. Es wurde ein gepaarter, zweiseitiger T-Test durchgeführt und das Signifikanzniveau auf p < 0,05 festgelegt. Es wurde ein gepaarter T-Test durchgeführt, da die gleiche Stichprobe zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurde [111]. Es wurde ein zweiseitiger T-Test ausgewählt, da eine Veränderung der Werte sowohl in Form einer Zunahme als auch einer Abnahme zu erwarten war [111]. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem Shapiro-Francia-Test geprüft. Aus den Einzelergebnissen der Untersuchungen wurde der Mittelwert gebildet, sowie die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet.

# 3. Ergebnisse

Während der Lagerung von TKs kommt es zu Funktionseinbußen von Thrombozyten, der storage lesion. In dieser Dissertationsarbeit wurde der Einfluss des NO-Donors DEA/NO auf die storage lesion von Thrombozyten untersucht. Dieser NO-Donor wurde wegen seiner kurzen, submaximal hemmenden Wirkung auf die Thrombozyten ausgewählt. Die Effekte des NO-Donors auf inhibierende und aktivierende Systeme der Thrombozyten werden im Folgenden dargestellt.

## 3.1 Wirkung von DEA/NO auf die VASP-Phosphorylierung in gelagerten Thrombozyten

Im ersten Schritt wurden die inhibitorischen Signalwege in den mit DEA/NOinkubierten Thrombozyten während der Lagerungszeit von 5 Tagen anhand der VASP-Phosphorylierung an Ser<sup>157</sup> und an Ser<sup>239</sup> analysiert (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** VASP-Phosphorylierung an Ser<sup>157</sup> (A) und Ser<sup>239</sup> (B) während der Lagerung Die Thrombozyten wurden aus mit 5 nM DEA/NO-inkubierten TKs an den Tagen 0, 2 und 5 entnommen. Die gewaschenen und lysierten Thrombozyten ( $3 \times 10^8$ /mL) wurden im Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes VASP an Ser<sup>157</sup> und an Ser<sup>239</sup>. Die Banden wurden mit dem Programm Image J quantifiziert und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in arbiträren Einheiten (AU); n=6; \*p-Wert < 0,05: stat. signifikant.

Am Tag 0 lag die VASP-Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>157</sup> bei 0,80  $\pm$  0,15 AU (Abb. 3.1 A). Vom Tag 0 auf Tag 2 stieg sie tendenziell um 19 % auf 0,95  $\pm$  0,22 AU (p=0,14). Vom Tag 2 auf Tag 5 wurde ein weiterer, tendenzieller Anstieg um 13 % auf 1,08  $\pm$  0,23 AU beobachtet (p=0,05). Insgesamt zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung vom Tag 0 auf Tag 5 um 35 % (p=0,05).

Am Tag 0 lag die VASP-Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>239</sup> bei 1,63  $\pm$  0,62 AU (Abb. 3.1 B). Vom Tag 0 auf Tag 2 fiel die VASP-Phosphorylierung tendenziell um 27 % (p=0,23). Sie lag am Tag 2 bei 1,20  $\pm$  0,31 AU. Vom Tag 2 auf Tag 5 wurde ein signifikanter Anstieg um 52 % auf 1,82  $\pm$  0,42 AU beobachtet (p=0,01). Im gesamten Verlauf der Lagerung vom Tag 0 auf Tag 5 zeigte sich ein tendenzieller, nicht signifikanter Anstieg um 12 % (p=0,48).

# 3.2 Einfluss der Inkubation mit DEA/NO auf zyklische Nukleotidspiegel in gelagerten Thrombozyten

Zusätzlich zur VASP-Phosphorylierung wurden die zyklischen Nukleotidspiegel, wichtige Second-Messenger der inhibitorischen Signalwege, während der fünftägigen Lagerung der DEA/NO-inkubierten Thrombozyten gemessen (Abb. 3.2).





Im Vergleich zu Tag 0 war am Tag 2 der Lagerung der cGMP-Spiegel mit  $1,00 \pm 0,15$  bzw.  $0,96 \pm 0,16$  nahezu unverändert (Abb. 3.2 A).

Vom Tag 2 auf Tag 5 der Lagerung zeigte sich ein signifikanter Anstieg des cGMP-Spiegels um 54 % auf 1,47  $\pm$  0,10 (p=0,03).

Im Vergleich von Tag 0 zu Tag 5 stieg der cGMP-Spiegel um insgesamt 47 % (p=0,07). Damit wird das festgelegte Signifikanzniveau von p<0,05 gerade überschritten. Ursächlich dafür ist eine Probe, die entgegen dem Trend im Verlauf der Lagerung eine Abnahme des cGMP-Spiegels zeigte.

Im Gegensatz dazu änderte sich der cAMP-Spiegel während der Lagerung nicht (Abb. 3.2 B). Die Werte lagen ausgehend von  $1,00 \pm 0,18$  am Tag 0 bei  $0,95 \pm 0,17$  am Tag 2 und bei  $1,20 \pm 0,22$  am Tag 5.

### 3.3 PDE5A-Gehalt nach Inkubation mit DEA/NO

Als wesentliches Enzym, das den cGMP-Spiegel in Thrombozyten reguliert, wurde der Gehalt an PDE5A in mit DEA/NO-inkubierten Thrombozyten während der 5-tägigen Lagerungsdauer gemessen (Abb. 3.3).





Die Thrombozyten wurden aus mit 5 nM DEA/NO-inkubierten TKs an den Tagen 0, 2 und 5 entnommen. Die gewaschenen und lysierten Thrombozyten (3 x  $10^8$ /mL) wurden im Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen PDE5A. Die Banden wurden mit dem Programm Image J quantifiziert und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM; n=6; \*p-Wert < 0,05: stat. signifikant.

Es konnte dabei keine signifikante Änderung des Gehalts an PDE5A über 5 Tage der Lagerung festgestellt werden (p=0,17).

Am Tag 0 betrug der Gehalt des Enzyms  $0,48 \pm 0,06$  AU, am Tag 2 wurden  $0,60 \pm 0,10$  AU gemessen, am Tag 5  $0,62 \pm 0,14$  AU.

### 3.4 Veränderungen der Oberflächenexpression von CD62P nach DEA/NO-Inkubation

Im Anschluss an die inhibitorischen Signalwege wurde die CD62P-Oberflächenexpression als Marker der Aktivierbarkeit bzw. der Präaktivierung während der fünftägigen Lagerung von Thrombozyten ohne und mit Inkubation mit DEA/NO untersucht.

Hierfür wurde an den Tagen 0, 2 und 5 die CD62P-Expression ohne und mit Stimulation durch 10 µM TRAP-6 an nicht-inkubierten und DEA/NO-inkubierten Thrombozyten durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 3.4).



#### Abb. 3.4: Expression von CD62P auf der Thrombozyten-Oberfläche

Die Thrombozyten wurden aus nicht-inkubierten TKs und aus mit 5 nM DEA/NO-inkubierten TKs an den Tagen 0, 2 und 5 entnommen. Jeweils ein Teil der nicht-inkubierten Thrombozyten und der mit DEA/NO-inkubierten Thrombozyten wurde mit 10  $\mu$ M TRAP-6 stimuliert (schraffierte Säulen). Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Oberflächenexpression von CD62P. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM; n=5; \*p-Wert < 0,05: stat. signifikant.

Bei Thrombozyten aus nicht-DEA/NO-inkubierten TKs stieg die basale CD62P-Expression signifikant um 40 % vom Tag 0 auf Tag 2 an (20,49 ± 2,8 MFI auf 28,8 ± 1,12 MFI, p=0,02) und um 20 % auf 33,3 ± 1,31 MFI vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,001). Vom Tag 0 auf Tag 5 stieg die Oberflächenexpression insgesamt signifikant um 62 % an (p=0,01). Unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP-6 zeigte sich eine deutliche Erhöhung der CD62P-Expression um das 5,9-fache auf 120,1 ± 7,3 MFI am Tag 0, um das 4,7-fache auf 135,1 ± 3,2 MFI am Tag 2 und um das 3,9-fache auf 129,0 ± 1,6 MFI (jeweils p≤0,0003) am Tag 5. Die Stimulierbarkeit durch TRAP-6 blieb im Verlauf der 5-tägigen Lagerung unverändert.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Thrombozyten aus DEA/NO-inkubierten TKs. Die basale CD62P-Expression stieg signifikant um 75 % vom Tag 0 auf Tag 2 an  $(16,2\pm0,5$  MFI auf  $28,4\pm1,9$  MFI, p=0,002) und um 16 % auf  $33,0\pm1,6$  MFI vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,01). Insgesamt stieg die basale CD62P-Expression um das 2-fache vom Tag 0 auf Tag 5 (p=0,0004). Unter Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP-6 zeigte sich wiederum eine deutliche Erhöhung der CD62P-Expression um das 7,1-fache auf 115,9  $\pm$  2,9 MFI am Tag 0 bzw. um das 4,7-fache auf 134,5  $\pm$  5,7 MFI am Tag 2 bzw. um das 3,6-fache auf 118,8  $\pm$  2,6 MFI am Tag 5 (jeweils p< 0,00002). Im Verlauf der 5-tägigen Lagerung war die Stimulierbarkeit durch TRAP-6 am Tag 2 um 16 % höher als am Tag 0 und am Tag 5 um 12 % geringer als am Tag 2 (jeweils p=0,02). Beim Vergleich von Tag 0 und Tag 5 zeigte sich dabei kein Unterschied.

Beim Vergleich der DEA/NO-inkubierten und nicht-inkubierten Thrombozyten ergaben sich in der basalen CD62P-Expression an den Tagen 0, 2 und 5 jeweils keine wesentlichen Unterschiede. Dies trifft auch für TRAP-stimulierte Thrombozyten an den Tagen 0 und 2 zu. Nur am Tag 5 ergab sich für die DEA/NO-inkubierten Thrombozyten eine minimal verringerte CD62P-Expression nach TRAP-Stimulation um 8 % (p=0,004).

65

# 3.5 Auswirkungen von DEA/NO auf die Bindung von Fibrinogen

Die Binde- und Vernetzungsfähigkeit von Thrombozyten mittels Bindung von Fibrinogen an den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex (CD41a) im Rahmen ihrer Aktivierung wurde über 5 Tage der Lagerung untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivierbarkeit der nicht-DEA/NO-inkubierten und der DEA/NO-inkubierten Thrombozyten ohne und mit 10 µM TRAP-6-Stimulation überprüft (Abb. 3.5).



#### Abb. 3.5: Fibrinogenbindung bei nicht-inkubierten und mit DEA/NO-inkubierten Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden aus nicht-inkubierten TKs und aus mit 5 nM DEA/NO-inkubierten TKs an den Tagen 0, 2 und 5 entnommen. Jeweils ein Teil der nicht-inkubierten Thrombozyten und der mit DEA/NO-inkubierten Thrombozyten wurde mit 10  $\mu$ M TRAP-6 stimuliert (schraffierte Säulen). Die Fibrinogenbindung wurde mittels FACS untersucht und ist als Änderung im Vergleich zur unstimulierten Probe am Tag 0 angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM relativ bezogen auf den Tag 0 ohne DEA/NO, ohne TRAP-6; n=5; \*p-Wert < 0,05: stat. signifikant.

In nicht DEA/NO-inkubierten Thrombozyten blieb die basale Fibrinogenbindung während der 5-tägigen Lagerung weitgehend unverändert mit Werten von  $1,00 \pm 0,28$  am Tag 0,  $0,56 \pm 0,04$  am Tag 2 und  $0,59 \pm 0,03$  am Tag 5. Unter Stimulation mit 10 µM TRAP zeigte sich jeweils ein deutlicher Anstieg der Fibrinogenbindung um das 3,8-fache auf  $3,82 \pm 0,43$  am Tag 0, um das 6,3-fache auf  $3,52 \pm 0,21$  am Tag 2 und um das 5,6-fache auf  $3,33 \pm 0,27$  am Tag 5 (jeweils p≤0,0001).

Ein ähnlicher Verlauf ergab sich bei Thrombozyten aus DEA/NO-inkubierten TKs. Die basalen Werte lagen bei  $0,71 \pm 0,10$  am Tag 0, bei  $0,55 \pm 0,05$  am Tag 2 und bei  $0,59 \pm 0,04$  am Tag 5. Unter der Stimulation mit 10 µM TRAP kam es wiederum zu einer deutlichen Erhöhung der Fibrinogenbindung um das 4,8-fache auf 3,40 ± 0,25 am Tag 0, um das 6,3-fache auf 3,45 ± 0,23 am Tag 2 und um das 5,4-fache auf 3,17 ± 0,15 am Tag 5 (jeweils ≤0,0002).

Beim Vergleich der DEA/NO-inkubierten und nicht-inkubierten Thrombozyten waren keine Unterschiede in der basalen Fibrinogenbindung oder in der TRAP-6-stimulierten Fibrinogenbindung erkennbar.

# 3.6 Auswirkungen der DEA/NO-Inkubation auf die Oberflächenexpression von ADP-Rezeptoren

Neben den inhibitorischen Signalwegen und der Aktivierbarkeit wurde auch der Einfluss der DEA/NO-Inkubation auf die basale und TRAP-stimulierte Oberflächenexpression der ADP-Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 untersucht (Abb. 3.6).


Abb. 3.6: Expression von ADP-Rezeptoren auf der Thrombozyten-Oberfläche

Die Thrombozyten wurden aus nicht-inkubierten TKs und aus mit 5 nM DEA/NO-inkubierten TKs an den Tagen 0, 2 und 5 entnommen. Jeweils ein Teil der nicht-inkubierten Thrombozyten und der mit DEA/NO-inkubierten Thrombozyten wurde mit 10  $\mu$ M TRAP-6 stimuliert (schraffierte Säulen). Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Oberflächenexpression der ADP-Rezeptoren P2Y1 (A), P2Y12 (B) und P2X1 (C). Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM; n=5; \*p-Wert < 0,05: stat. signifikant.

## 3.6.1 Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2Y1

Während der 5-tägigen Lagerung fiel die basale P2Y1-Expression tendenziell von 79,1 ± 7,3 MFI am Tag 0 auf 71,5 ± 3,6 MFI am Tag 2 und blieb am Tag 5 mit 71,6 ± 3,8 MFI stabil (Abb. 3.6.A). Insgesamt wurde ein Abfall von 10 % beobachtet (p=0,02). Unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP-6 erhöhte sich die P2Y1-Expression 2,6-fach auf 204,1 ± 19,0 MFI am Tag 0, 2,1-fach auf 147,2 ± 8,6 MFI am Tag 2 und um 75 % auf 125,2 ± 11,1 MFI am Tag 5 (jeweils p≤0,002). Über die 5-tägige Lagerungszeit fiel die Expression nach Stimulation um 28 % vom Tag 0 auf Tag 2 (p=0,02) und um 15 % vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,04). Insgesamt wurde ein Abfall um 39 % vom Tag 0 auf Tag 5 festgestellt (p=0,01).

Ein ähnliches Bild verzeichnete sich bei DEA/NO-inkubierten TKs. Die Werte fielen tendenziell von 80,6 ± 6,9 MFI am Tag 0 auf 77,6 ± 3,4 MFI am Tag 2 und auf 69,7 ± 5,8 MFI am Tag 5. Insgesamt zeigte sich ein Abfall von 14 % (p=0,04). Unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression und zwar 2,9-fach auf 236,8 ± 19,2 MFI am Tag 0, 2,1-fach auf 163,6 ± 15, MFI am Tag 2 und 2-fach auf 140,1 ± 12,3 MFI am Tag 5 (jeweils p≤0,006). Über die Dauer der 5-tägigen Lagerung zeigte sich eine zunehmend verringerte Stimulierbarkeit der P2Y1-Expression um 31 % vom Tag 0 auf Tag 2 (p=0,03), tendenziell um 14 % vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,18) und um insgesamt 41 % vom Tag 0 auf Tag 5 (p=0,004).

Beim Vergleich der DEA/NO-inkubierten und nicht-inkubierten TKs waren keine Unterschiede in der basalen Oberflächenexpression von P2Y1 feststellbar. Unter TRAP-Stimulation war die P2Y1-Expression bei DEA/NO-inkubierten TKs signifikant größer, um 16 % am Tag 0 (p=0,04) und um 12 % an Tag 5 (p=0,04). Am Tag 2 war sie nur tendenziell größer (p=0,17).

### 3.6.2 Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2Y12

In nicht DEA/NO-inkubierten Thrombozyten blieb die basale Oberflächenexpression von P2Y12 während der 5-tägigen Lagerung unverändert mit Werten von 37,8 ± 3,8 MFI am Tag 0, 40,9 ± 1,7 MFI am Tag 2 und 40,1 ± 1,2 MFI am Tag 5 (Abb. 3.6.B). Unter der Stimulation mit 10 µM TRAP-6 zeigte sich jeweils ein deutlicher Anstieg um das 2,3-fache auf 86,6 ± 1,9 MFI am Tag 0, um 83 % auf 74,7 ± 4,2 MFI am Tag 2 und um 68 % auf 67,5 ± 3,5 MFI am Tag 5 (jeweils p≤0,001). Hierbei wurde eine Abnahme der Stimulierbarkeit vom Tag 0 auf Tag 2 um 14 % (p=0,02) und tendenziell vom Tag 2 auf Tag 5 um 10 % festgestellt (p= 0,13). Insgesamt nahm die Stimulierbarkeit im Verlauf um 22 % vom Tag 0 auf Tag 5 signifikant ab (p=0,002).

Bei DEA/NO-inkubierten Thrombozyten ergab sich ein anderes Bild für die basale Oberflächenexpression. Sie stieg vom Tag 0 mit 36,1 ± 1,1 MFI auf Tag 2 mit 44,7 ± 2,1 MFI um 24 % an (p=0,005). Danach fiel sie tendenziell wieder ab, sodass der Gesamtanstieg vom Tag 0 auf Tag 5 mit 42,7 ± 1,1 MFI bei 18 % lag (p=0,0002). Ein ähnlicher Verlauf wie bei nicht-inkubierten Thrombozyten wurde unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP beobachtet mit einem deutlichen Anstieg der Oberflächenexpression um das 2,7-fache auf 96,9 ± 3,5 MFI am Tag 0, um 83 % auf 81,6 ± 3,3 MFI am Tag 2 und um 69 % auf 72,3 ± 3,2 MFI am Tag 5 (jeweils p<0,0002). Wiederum nahm die Stimulierbarkeit über die 5tägige Lagerung ab und zwar um 16 % vom Tag 0 auf Tag 2 (p=0,02), tendenziell um 11 % vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,16), signifikant um 25 % vom Tag 0 auf Tag 5 (p=0,009).

Beim Vergleich der DEA/NO-inkubierten mit nicht-inkubierten TKs waren Unterschiede in der basalen P2Y12-Expression lediglich am Tag 2 mit höheren Werten bei DEA/NO-inkubierten TKs erkennbar (p=0,03).

Nach TRAP-Stimulation war die Oberflächenexpression bei DEA/NOinkubierten TKs am Tag 0 um 12 % (p=0,03) und tendenziell am Tag 2 um 9 % und am Tag 5 um 7 % (für Tag 2 und Tag 5 p=0,07) höher als bei nichtinkubierten TKs.

70

## 3.6.3 Oberflächenexpression des ADP-Rezeptors P2X1

In nicht DEA/NO-inkubierten TKs fiel die basale P2X1-Expression tendenziell um 9 % von 96,1 ± 8,2 MFI am Tag 0 auf 87,2 ± 3,2 MFI am Tag 2 (p=0,31) (Abb. 3.6.C). Ein weiterer tendenzieller Abfall um 14 % erfolgte vom Tag 2 auf Tag 5 auf 74,9 ± 4,4 MFI (p=0,25). Insgesamt wurde ein Abfall von 22 % vom Tag 0 auf Tag 5 festgestellt (p=0,04). Unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP-6 wurde ein deutlicher Anstieg um das 2,7-fache auf 256,2 ± 27,0 MFI am Tag 0, um 97 % auf 171,9 ± 14,1 MFI am Tag 2 und um 99 % auf 149,0 ± 11,4 MFI am Tag 5 beobachtet (jeweils p≤0,005). Dabei fiel die Stimulierbarkeit zuerst tendenziell um 33 % vom Tag 0 auf Tag 2 (p=0,07) und um 13 % vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,25) ab; insgesamt schließlich signifikant um 42 % vom Tag 0 auf Tag 5 (p=0,01).

Bei Thrombozyten aus DEA/NO-inkubierten TK lagen die basalen P2X1-Werte nahezu unverändert bei 90,9  $\pm$  9,3 MFI am Tag 0, bei 89,0  $\pm$  3,2 MFI am Tag 2 und bei 79,9  $\pm$  3,8 MFI am Tag 5. Unter der Stimulation mit 10  $\mu$ M TRAP kam es zu einer deutlichen Erhöhung der P2X1-Expression um das 3,1-fache auf 281,3  $\pm$  32,3 MFI am Tag 0, um das 2,1-fache auf 183,6  $\pm$  10,4 MFI am Tag 2 und um 90 % auf 152,0  $\pm$  8,7 MFI am Tag 5 (jeweils p≤0,001). Die Stimulierbarkeit fiel ebenfalls tendenziell um 35 % vom Tag 0 auf Tag 2 (p=0,07) ab, um 17 % vom Tag 2 auf Tag 5 (p=0,13) und insgesamt signifikant um 46 % vom Tag 0 auf Tag 5 (p=0,01).

Beim Vergleich der DEA/NO-inkubierten und nicht-inkubierten TK waren keine Unterschiede der basalen und der stimulierten P2X1-Expression feststellbar.

## 4. Diskussion

Während der Lagerung von TKs kommt es zur Entwicklung von morphologischen, funktionellen und hämostatischen Defiziten, einem Prozess, der als storage lesion bezeichnet wird [1]. Verschiedene Ansätze wurden in der Vergangenheit verfolgt, um nachteilige *ex-vivo*-Effekte im Rahmen der TK-Herstellung und -lagerung zu verringern. Neben der Weiterentwicklung von Präparationstechniken, von Beutelmaterialien und der Optimierung der Lagerungsumgebung wurde auch darauf abgezielt, das Lagerungsmilieu mit Hilfe von additiven Zusätzen günstig zu beeinflussen [112].

Für diese Dissertationsarbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen durch die Zugabe des kurzlebigen, reversibel wirksamen NO-Donors DEA/NO direkt nach der Herstellung von Apherese-TKs auf verschiedene funktionelle Systeme hervorgerufen werden. Es wurden dafür die Effekte von DEA/NO auf die inhibitorischen Signalwege, den Aktivierungszustand sowie die Expression und Mobilisation von purinergen Rezeptoren analysiert. Durch die passagere Hemmung der Thrombozyten durch den NO-Donor kann vermutet werden, dass präaktivierende Einflüsse, die im Rahmen der TK-Apherese und TK-Herstellung auftreten und möglicherweise Prozesse der storage lesion in Gang setzen, vermindert werden. Zudem wäre für die Lagerungszeit und im Fall einer *in vivo*-Applikation des TK keine Fortwirkung der Hemmung anzunehmen.

Die Substanz DEA/NO setzt als NO-Donor spontan NO frei [63, 77]. Sie zeigt eine zeit- und dosis-abhängige, reversible Wirkung mit einer Halbwertszeit von 2 Minuten bei 37 °C und physiologischem pH von 7,4 [63, 84, 85]. Auf der Grundlage von Vorarbeiten (hier in dieser Arbeit nicht dargestellt) und anhand von Vorpublikationen ist davon auszugehen, dass 15 Minuten nach der Inkubation der Thrombozyten mit DEA/NO - als Zeitpunkt der ersten Probenentnahme am Tag 0 - keine NO-Freisetzung mehr stattgefunden hat [85] und NOvermittelte Effekte abgeklungen waren [84]. Daher ist von einer reversiblen, passageren Wirkung von DEA/NO auszugehen, die vor allem die postulierte, durch Apherese-bedingte Präaktivierung der Thrombozyten abschwächen sollte. Eingesetzt wurde eine niedrige, submaximale Konzentration von 5 nM DEA/NO. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass nur Effekte auf den cGMPabhängigen Signalweg in Thrombozyten untersucht werden. Effekte auf cGMPunabhängige Signalwege in Thrombozyten werden erst ab Konzentrationen von 40 nM DEA/NO erreicht [77].

## 4.1 Die Veränderungen der inhibitorischen Signalwege sind unter Einfluss von DEA/NO verzögert.

Zunächst wurde der Einfluss von DEA/NO auf die inhibitorischen Signalwege während der 5-tägigen Lagerung von Apherese-TKs analysiert. In früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass bei Lagerung unter standardisierten Blutbankbedingungen (Lagerung bei 22 °C unter Agitation in Gas-permeablen Beuteln) die inhibitorischen Signalwege von der storage lesion betroffen sind [10]. Die VASP-Phosphorylierung nahm dabei an der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>239</sup> vom Tag 0 bis Tag 2 der Lagerung um 87 %, bis zum Tag 5 um das 5-fache zu [10]. An der zweiten VASP-Phosphorylierungsstelle Ser<sup>157</sup> zeigte sich, wenngleich schwächer ausgeprägt, die gleiche Tendenz wie bei Ser<sup>239</sup> mit einem Anstieg von 15 % bis zum Tag 2 bzw. um 74 % bis zum Tag 5 [10].

Nach initialer Inkubation mit DEA/NO war das Ausmaß der VASP-Phosphorylierungszunahme während der Thrombozytenlagerung dagegen deutlich reduziert. Bei Ser<sup>239</sup> war bis zum Tag 2 eine tendenzielle Abnahme und bis zum Tag 5 eine Verstärkung von lediglich 12 % nachweisbar. Bei Ser<sup>157</sup> war der Phosphorylierungsanstieg bis zum Tag 2 etwas stärker ausgeprägt, nach der gesamten Lagerungsdauer von 5 Tagen mit 35 % aber ebenfalls schwächer als in den routinemäßig hergestellten Apherese-TKs. Insgesamt ergab sich ein geringerer Anstieg der VASP-Phosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen Ser<sup>239</sup> und Ser<sup>157</sup> nach DEA/NO-Inkubation.

73

Da die VASP-Phosphorylierung von der Aktivität zyklischer Nukleotidabhängiger Proteinkinasen beeinflusst wird [10, 29, 31], wurden die cGMP- und cAMP-Spiegel im Lagerungsverlauf gemessen. Die Akkumulation von cGMP bis zum Tag 5 um 47 % nach DEA/NO-Inkubation war dabei vergleichbar mit der Zunahme von 56 % bei Thrombozyten aus unmodifizierten Apherese-TKs [10].

Der cAMP-Spiegel blieb bei beiden TK-Präparationen über den Zeitraum der Lagerung jeweils stabil [10].

Der Antigengehalt und die Aktivität der PDE5A als cGMP-degradierendes Enzym nahm bei nicht-inkubierten TKs bis zum Tag 5 um 40 % bzw. um 23 % ab [10]. Im Gegensatz dazu konnten bei den DEA/NO-inkubierten Thrombozyten keine Veränderungen des PDE5A-Gehalts verzeichnet werden. Zwar war aktuell aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit der Reagenzien eine Aktivitätsmessung nicht durchführbar, jedoch waren in früheren Untersuchungen die Ergebnisse für den Antigengehalt und die Aktivität der PDE5A weitgehend korrelierend [10].

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte die Inkubation von frisch präparierten TKs mit dem NO-Donor DEA/NO eine Aktivierung des cGMPabhängigen Signalweges mit cGMP-Akkumulation nicht verhindern. Offensichtlich bewirkt der NO-Donor aber eine Verzögerung der Veränderungen: Es zeigte sich nach 5 Lagerungstagen im Vergleich zu routinemäßig hergestellten TKs ein noch stabiler PDE5A-Gehalt mit noch verminderter VASP-Phosphorylierung, insbesondere an der von der PKG-präferierten Phosphorylierungsstelle Ser<sup>239</sup> [31]. Analysen über den Tag 5 der Lagerung hinaus könnten dazu weitere Aufschlüsse geben. Generell von Bedeutung wäre zudem die Untersuchung der DEA/NO-vermittelten Effekte auf proteinabbauende Mechanismen in *ex-vivo* gelagerten Thrombozyten, z. B. von Effekten auf die Proteasomaktivität oder auf die Polyubiquitinierung, die vom Aktivitätszustand der Thrombozyten beeinflusst werden [113-115], und den Abbau der PDE5A steuern könnten.

# 4.2 Der Präaktivierungsgrad und die Aktivierbarkeit der Thrombozyten während der Lagerung werden durch den Einfluss von DEA/NO kaum verändert.

Neben den inhibitorischen Signalwegen wurden der Präaktivierungsgrad und die Aktivierbarkeit der Thrombozyten nach DEA/NO-Inkubation während der 5tägigen Lagerung überprüft.

In früheren Studien wurde eine Zunahme der P-Selektin-Expression während der TK-Lagerung mehrfach nachgewiesen und war abhängig von der Präparationstechnik [116, 117]. In den Experimenten bestätigte sich der Anstieg der basalen P-Selektin-Expression, während die Stimulierbarkeit mit TRAP-6 über die 5-tägige Lagerung konstant blieb, sodass die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten durch die DEA/NO-Inkubation offensichtlich nicht beeinträchtigt wurde: Nach der Inkubation mit DEA/NO zeigte sich eine ähnliche Entwicklung wie bei unbehandelten TKs mit Ausnahme einer fraglich relevanten, minimal verringerten Aktivierbarkeit durch TRAP-6 am Tag 5 der Lagerung.

Die basale Fibrinogenbindung als weiterer Präaktivierungsmarker blieb dagegen sowohl bei unbehandelten, als auch bei DEA/NO-inkubierten Thrombozyten während der Lagerungsdauer konstant, was möglicherweise in der geringeren Sensitivität der Fibrinogenbindung gegenüber präaktivierenden Einflüssen im Vergleich zu P-Selektin begründet liegt. Ein analoges Bild ergab sich bei der TRAP-stimulierten Fibrinogenbindung mit vergleichbaren Werten für regulär hergestellte TKs und mit DEA/NO-behandelte TKs. Die in früheren Studien gezeigte abnehmende TRAP-stimulierte Fibrinogenbindung am Tag 2 um 14 % und am Tag 5 um 23 % [10] ist am ehesten dadurch zu erklären, dass in den hier durchgeführten Experimenten mit 10  $\mu$ M TRAP-6 eine höhere Induktorkonzentration verwendet wurde als in der Vorarbeit mit 5  $\mu$ M TRAP-6. Insgesamt wird demzufolge durch die passagere Inhibition der Thrombozyten durch den NO-Donor in der gewählten Konzentration in der frühen Phase nach TK-Herstellung der Prozess der Präaktivierung - bestimmt anhand der P-Selektin-Expression - während der Lagerungsphase nicht messbar unterdrückt. Das Ausmaß der Präaktivierung ist jedoch auch in den regulär hergestellten TKs generell nur sehr schwach ausgeprägt. Ein langfristiger Funktionsverlust der Thrombozyten war durch die DEA/NO-Inkubation nicht nachweisbar, so dass der NO-Donor - wie postuliert [63, 84, 85] - nur eine vorübergehende, reversible inhibitorische Wirkung ausübt.

# 4.3 Die Mobilisierbarkeit von purinergen Rezeptoren verbessert sich unter Einfluss von DEA/NO geringfügig.

Die Expression von Glykoproteinen und von Oberflächenrezeptoren kann sich als weiterer Ausdruck der storage lesion während der Lagerung von Thrombozyten verändern und zu funktionellen Defiziten beitragen, wie beispielsweise für Thrombin-Rezeptoren gezeigt wurde [9]. Kürzlich wurden in diesem Zusammenhang auch die purinergen Rezeptoren untersucht [57].

Die ADP-Rezeptoren sind von besonderer klinischer Bedeutung und wurden unter anderem bezüglich der medikamentösen Therapie der koronaren Herzerkrankung umfassend untersucht [118-120]. Eine besondere Rolle spielt dabei der ADP-Rezeptor P2Y12 als Ansatzpunkt für die pharmakologische Aggregationshemmung durch Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor [119, 121-123]. Für die Auslösung einer Thrombozytenaggregation ist das Zusammenspiel der Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 entscheidend [21, 23, 28, 121, 124]. Es stellte sich heraus, dass die basale Expression der Rezeptoren P2X1, P2Y1 oder P2Y12 durch eine 5-tägige Lagerung mit Ausnahme eines lediglich tendenziellen Rückgangs bei P2X1 nicht wesentlich beeinflusst wird [57]. Während die Funktion des P2Y12-Rezeptors, gemessen mit dem "platelet reactivity index", erhalten blieb, kam es zu einem zunehmenden Verlust der P2X1-Funktion und insbesondere der P2Y1-Funktion, gemessen anhand des spezifisch induzierten intrathrombozytären Calciumanstiegs [57]. Dadurch erklärt sich zumindest zum Teil der zu beobachtende rasche Verlust der ADP-induzierten Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten [57].

Neben der basalen Rezeptorexpression könnte auch die Mobilisierbarkeit von Rezeptoren im Rahmen der Thrombozytenaktivierung für die Entwicklung der storage lesion von Bedeutung sein. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von DEA/NO bei gelagerten Thrombozyten sowohl auf die basale Expression der purinergen Rezeptoren als auch auf die Oberflächenexpression nach Stimulation mit TRAP-6 untersucht. Für die TRAP-6-Stimulation sind bisher keine Daten verfügbar. Durch die Stimulation mit TRAP-6 können weitere Informationen zur Regulationsfähigkeit und dem Rearrangement der purinergen Rezeptoren gewonnen werden.

In der Vorpublikation zeigte sich keine Veränderung der basalen Expression bei den ADP-Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 [57]. In dieser Promotionsarbeit zeigte sich für P2Y1 und P2X1 - anders als in der Vorpublikation [57] - ein zwar signifikanter, aber insgesamt vergleichbar geringer Abfall der basalen Expression über die 5 Tage der Lagerung bei stabiler Expression des Rezeptors P2Y12.

Nach der Inkubation mit DEA/NO blieb lediglich die Expression des Rezeptors P2X1 unverändert, während die Expression von P2Y1 leicht abfiel und die von P2Y12 anstieg. Die Veränderungen waren ähnlich wie bei nicht mit DEA/NO-inkubierten TKs nur gering ausgeprägt. Daher ist unter Einfluss des NO-Donors nicht von einem generellen Abbau oder Verlust der purinergen Rezeptoren auszugehen.

Nach Stimulation mit TRAP-6 zeigte sich für die drei Rezeptortypen ohne DEA/NO-Inkubation eine deutliche Stimulierbarkeit der Rezeptorexpression an der Thrombozytenoberfläche, wobei das Ausmaß über die 5-tägige Lagerung rückläufig war. Die gleiche Tendenz einer abnehmenden Rezeptormobilisation unter TRAP-6 fand sich auch nach der DEA/NO-Inkubation. Dennoch war die Stimulierbarkeit bei P2Y1 am Tag 0 und am Tag 5 und bei P2Y12 am Tag 0 geringfügig stärker ausgeprägt als ohne Zugabe von DEA/NO. Kein Unterschied ergab sich bei P2X1 zu Thrombozyten, die nicht mit DEA/NO behandelt wurden.

Der Rückgang der Rezeptormobilisation unter Aktivierung kann als ein Zeichen der storage lesion gewertet werden. Ursächlich könnte eine gestörte Rekrutierung der purinergen Rezeptoren aus den intrazellulären Pools sein, z. B. durch lagerungsbedingte Veränderungen der intrathrombozytären Membranstrukturen, die in früheren Studien beschrieben wurden [22, 23, 125-127]. Die mit DEA/NO beobachtete besser erhaltene Mobilisierbarkeit der für die Aggregation bedeutsamen Rezeptoren P2Y12 und P2Y1 könnte dabei einen Hinweis auf einen möglichen positiven Effekt des NO-Donors darstellen. Für die weitere Beurteilung dieses DEA/NO-vermittelten Effekts wäre als Ergänzung eine Funktionstestung der Rezeptoren während der Lagerung nach vorhergehender DEA/NO-Inkubation sinnvoll. Analog zu Vorpublikationen könnte für die Funktion des Rezeptors P2Y12 der platelet reactivity index (PRI) und für die Funktion der Rezeptoren P2Y1 und P2X1 der induzierte Calciumanstieg analysiert werden [57, 128]. Weitere Ergänzungen könnten die Messung der Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten unter DEA/NO mittels Aggregometrie und auch die Bestimmung der Gesamtzahl der purinergen Rezeptoren mittels Western Blot darstellen [57].

## 4.4 Bewertung der Eignung von DEA/NO als Additivum für TKs

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es mit DEA/NO während der Lagerung zu einer geringeren Aktivierung inhibitorischer Signalwege mit reduzierter Hemmung der Thrombozyten kommt, als Hinweis auf eine Abschwächung von Zeichen einer storage lesion. Es ergab sich darüber hinaus ein weniger stark ausgeprägter Rückgang der Mobilisation der purinergen Rezeptoren nach Inkubation mit DEA/NO. Die über den Zeitraum der Lagerung erhaltene Aktivierbarkeit der Thrombozyten - gemessen anhand der Fibrinogenbindung und der P-Selektin-Expression - weist daraufhin, dass die *in vitro*-Zugabe von DEA/NO nicht zu einem funktionellen Verlust der Thrombozyten führt.

In der Vergangenheit wurden bereits einige Substanzen in ihrer Auswirkung auf die Funktionalität gelagerter Thrombozyten untersucht, u.a. mit dem Ziel, präaktivierende Einflüsse durch Herstellung und Lagerung zu minimieren. Zu den Wirkstoffen gehörten Stimulatoren der Adenylatcyclase (z.B. lloprost als Prostazyklinanalogon, Prostaglandin E1 (PGE1) oder Forskolin) und Phosphodiesterasehemmer (z.B. Theophyllin oder Isobutylmethylxanthin), wobei die damit durchgeführten Studien kontroverse Ergebnisse erbrachten [129-137]. Einigen Arbeiten zufolge konnte die Präaktivierung der Thrombozyten während des Produktionsprozesses durch Zugabe von Prostazyklin, PGE<sub>1</sub>, Forskolin und Theophyllin oder Kombinationen der genannten Substanzen reduziert werden [130-132, 135-137]. Jedoch zeigte der Einsatz von PGE1 oder Prostazyklin in vivo eine vasodilatatorische Wirkung in Abhängigkeit von Dosierung und Infusionsdauer, die bei lloprost geringer ausgeprägt war [130, 131, 138, 139]. Bei geringerer inhibitorischer Funktion wies PGE1 eine größere Stabilität in Plasma als Prostazyklin auf [130]. Nach der Transfusion war allerdings für PGE1behandelte TKs in vivo ein verminderter Transfusionseffekt mit herabgesetzter Funktion der Thrombozyten zu beobachten [133, 140]. In einer anderen Studie blieben die Substanzen PGE<sub>1</sub>, Forskolin, Theophyllin und Isobutylmethylxanthin ohne Einfluss auf die Präaktivierung der Thrombozyten [129].

DEA/NO gehört zu den Diazeniumdiolaten und weist im Vergleich zu den anderen Substanzklassen von NO-Donoren auch günstigere chemische und pharmakologische Eigenschaften auf. DEA/NO hatte im Vergleich zu Glycerintrinitrat, S-Nitrosoglutathion und Natriumnitroprussid einen stärkeren hemmenden Effekt auf die Induktor-induzierte Thrombozytenaggregation und war mit einer höheren Freisetzung von NO verbunden [141]. Die durch DEA/NO ausgelöste Hemmung ist dabei abhängig von der Inkubationszeit und der eingesetzten Dosierung [77, 84, 85]. Damit ist das Ziel, eine passagere und reversible Wirkung auf Thrombozyten im Rahmen der TK-Herstellung zu erzielen, gut kalkulierbar. Die NO-Freisetzung ist kontinuierlich im Vergleich zur schrittweisen Freisetzung bei Natriumnitroprussid [84].

Für die Substanz Natriumnitroprussid liegen diskrepante Studien vor. Einerseits war ein fehlender bzw. nur sehr geringer Hemmeffekt auf die Thrombozytenfunktion zu erkennen [74, 141, 142]. In anderen Arbeiten dagegen zeigte sich eine antiaggregatorische Wirkung mit zum Teil langanhaltender, von Zeit und Dosierung abhängiger und zum Teil in der Ausprägung sehr variabler Aktivierung inhibitorischer Signalwege [84, 141, 143]. Glycerintrinitrat hatte je nach Induktor keine oder nur sehr geringe hemmende Auswirkungen auf die Thrombozytenaggregation [74, 141]. S-Nitrosoglutathion wiederum zeigte stärkere antiaggregatorische als vasodilatatorische Effekte mit Aktivierung inhibitorischer Signalwege [141, 144, 145]. Der Einfluss auf die Präaktivierung von Thrombozyten bei der TK-Herstellung ist für diese Substanzen jedoch unzureichend untersucht.

Ein anderes Diazeniumdiolat, MAHMA/NO, zeigte ähnlich wie DEA/NO eine rasche, kurzzeitige Aggregationshemmung mit Aktivierung cGMP-abhängiger Signalwege vor allem bei niedrigen Dosierungen von 5-15 nM [72, 76, 77]. Die inhibitorischen Effekte auf die Thrombozytenaggregation waren dabei stärker als bei S-Nitrosogluthation [72-74]. Diese Eigenschaften machen MAHMA/NO ebenfalls zu einer potenziellen Substanz, um die Präaktivierung von Thrombozyten zu reduzieren, ohne die Thrombozytenfunktion langfristig zu hemmen.

80

Für eine mögliche Anwendung von DEA/NO als NO-Donor im Rahmen der TK-Herstellung sind allerdings einige Einschränkungen zu bedenken. Erstens ist nicht geklärt, ob der NO-Donor einen toxischen oder kanzerogenen Effekt im menschlichen Körper verursachen könnte und somit als Zugabe für Arzneimittel ungeeignet wäre. Hierzu sind weitere Studien, z.B. tierexperimentelle Versuche, erforderlich. Zweitens wäre es problematisch, wenn für die Zugabe von DEA/NO steril hergestellte TKs eröffnet werden müssten, verbunden mit einer bakteriellen Kontaminationsgefahr. Es müsste zunächst eine Lösung gefunden werden, die eine automatische Zugabe während der Produktion unter sterilen Bedingungen ermöglicht, wie zum Beispiel eine Integration von DEA/NO in die Wandbeschichtung des Beutelsystems. Außerdem ist ungewiss, ob der Einsatz des NO-Donors auch eine verbesserte *in vivo*-Wirksamkeit vermitteln würde. Es sind dazu klinische Studien zur Ermittlung der Wiederfindungsrate (recovery), des Inkrements und des klinischen Ansprechens im Vergleich mit standardmäßig hergestellten TKs erforderlich.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Präparation und Lagerung von TKs entstehen bei Thrombozyten morphologische, funktionelle und hämostatische Defizite, die unter dem Begriff storage lesion zusammengefasst werden. In dieser Dissertation wurde untersucht, ob durch Zugabe des kurzzeitig und reversibel wirksamen NO-Donors DEA/NO zu Apherese-TKs Zeichen der storage lesion über eine 5-tägige Lagerung vermindert werden können. Dafür wurde den Apherese-TKs direkt nach der Herstellung 5 nM DEA/NO zugesetzt. An den Tagen 0 (nach Abklingen der NO-Donor-Wirkung), 2 und 5 wurden verschiedene funktionelle Systeme der Thrombozyten analysiert. Verglichen mit früheren Untersuchungen von unbehandelten TKs ergab sich unter Einsatz von DEA/NO eine abgeschwächte Aktivierung der inhibitorischen Signalwege mit geringerem Anstieg der VASP-Phosphorylierung und des cGMP-Spiegels sowie mit stabilem PDE5A-Gehalt. Gemessen anhand der P-Selektin-Expression und der Fibrinogenbindung zeigte sich ein unverändert niedriger Präaktivierungsgrad der Thrombozyten bei erhaltener Stimulierbarkeit. Bei der Oberflächenexpression von purinergen Rezeptoren war der Rückgang der Mobilisation während der 5-tägigen Lagerung im Vergleich zu unbehandelten TKs vermindert. Damit war unter dem Einfluss von DEA/NO eine Abschwächung von Phänomenen der storage lesion zu beobachten.

Für eine mögliche klinische Anwendung des NO-Donors DEA/NO bei der TK-Herstellung sind allerdings weitere Studien bezüglich Wirksamkeit und möglicher unerwünschter Wirkungen *in vivo* notwendig. Darüber hinaus muss eine technische Lösung für die sterile Zugabe von DEA/NO zum TK gefunden werden.

82

# 6. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
APC	Allophycocyanin (APC)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units, arbiträre Einheiten
BSA	Bovine Serum Albumin
CalDAG-GEF	Calcium- und Diacylglycerol- regulierter GTP- Austauschfaktor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD62P	P-Selektin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DEA/NO	2-(N,N-Diethylamino)-diazenolate-2-oxide di- ethylammonium salt
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2- ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate
EGTA	Ethylenbis-(oxy-ethylen-nitrilo)-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

FACS	Fluorescent activated cell sorting (Durchflusszytome- trie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gi2α, βγ, Gαq	Untereinheiten von G-Proteinen
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GP	Glykoprotein
HWZ	Halbwertszeit
IBMX	IsobutyImethyIxanthin
IP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
IP-R	Prostazyklinrezeptor
кон	Kaliumhydroxid
LDL	Low Density Lipoprotein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NO	Stickstoffmonoxid
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS/BSA/Glc-Lösung	PBS/BSA/Glucose-Lösung
PDE5A	Phosphodiesterase 5A
p.d.u.	procedure defined unit
PGE1	Prostaglandin E1
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>

- PGI<sub>2</sub> Prostazyklin
- PI3K Phosphoinositid-3-Kinase
- PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
- PKA Proteinkinase A
- PKC Proteinkinase C
- PKG Proteinkinase G
- PL Phospholipide
- PLA<sub>2</sub> Phospholipase A<sub>2</sub>
- PLCβ Phospholipase Cβ
- PRI platelet reactivity index
- PROLI/NO 1-(Hydroxy-NNO-azoxy)-L-proline
- Rap1 Ras-related protein 1
- Rpm revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
- SD standard deviation
- SDS-PAGE SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- SEM standard error of the mean
- Ser157 und Ser239Serinreste157 und239(VASP-Phosphorylierungsstellen)
- TCA Trichloressigsäure
- Thr<sup>278</sup> Threoninrest 278 (VASP-Phosphorylierungsstelle)
- TK/s Thrombozytenkonzentrat/e
- TRAP-6 thrombin receptor-activating peptide 6

TRIS, Trizma-Base	Hydroxymethylaminomethan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
v/v	percent volume
vWF	von-Willebrand Faktor
vWF-Rezeptor	von-Willebrand Faktor-Rezeptor
w/v	mass per unit volume

## 7. Literaturverzeichnis

- Cauwenberghs, S., et al., *Hemostatic and signaling* functions of transfused platelets. Transfus Med Rev, 2007. 21(4): p. 287-94.
- 2. Wang, B. and J. Zheng, *Platelet generation in vivo and in vitro.* Springerplus, 2016. **5**(1): p. 787.
- 3. Michelson, A.D., Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 154-69.
- Deutsch, V.R. and A. Tomer, *Megakaryocyte development and platelet production*. Br J Haematol, 2006. **134**(5): p. 453-66.
- 5. Horiuchi, H., *Recent advance in antiplatelet therapy: the mechanisms, evidence and approach to the problems.* Ann Med, 2006. **38**(3): p. 162-72.
- 6. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, Secrets of platelet exocytosis what do we really know about platelet secretion mechanisms? Br J Haematol, 2013. **165**: p. 204-216.
- 7. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis.* Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
- 8. Offermanns, S., Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
- 9. Schlagenhauf, A., et al., *Thrombin receptor levels in platelet concentrates during storage and their impact on platelet functionality.* Transfusion, 2012. **52**(6): p. 1253-9.
- 10. Kobsar, A., et al., *Decreasing phosphodiesterase 5A* activity contributes to platelet cGMP accumulation during storage of apheresis-derived platelet concentrates. Transfusion, 2014. **54**(4): p. 1008-14.
- 11. Cauwenberghs, S., et al., *Plasma ectonucleotidases* prevent desensitization of purinergic receptors in stored platelets: importance for platelet activity during

*thrombus formation.* Transfusion, 2006. **46**(6): p. 1018-28.

- Daniel, J.L., et al., Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. J Biol Chem, 1998.
   273(4): p. 2024-9.
- Aslam, M., et al., Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: role of P2Y(1) and P2Y(1)(2) receptors. Thromb Res, 2013. 132(5): p. 548-57.
- 14. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation.* Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
- 15. Holmsen, H., *Platelet metabolism and activation.* Semin Hematol, 1985. **22**(3): p. 219-40.
- Gurbel, P.A., A. Kuliopulos, and U.S. Tantry, *G-protein-coupled receptors signaling pathways in new antiplatelet drug development.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(3): p. 500-12.
- Smolenski, A., Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. J Thromb Haemost, 2012. 10(2): p. 167-76.
- Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. Pharmacological Reviews, 2014. 56(3): p. 387-437.
- 19. Hechler, B. and C. Gachet, *P2 receptors and platelet function.* Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 293-303.
- Jin, J., J.L. Daniel, and S.P. Kunapuli, Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. J Biol Chem, 1998. 273(4): p. 2030-4.
- 21. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-*

*induced platelet aggregation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8070-4.

- 22. Hardy, A.R., et al., *P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms.* Blood, 2005. **105**(9): p. 3552-60.
- 23. Mundell, S.J., et al., *Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets.* J Thromb Haemost, 2008. **6**(8): p. 1393-404.
- Mahaut-Smith, M.P., et al., ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. Br J Pharmacol, 2000. 131(1): p. 108-14.
- Kawa, K., ADP-induced rapid inward currents through Ca(2+)-permeable cation channels in mouse, rat and guinea-pig megakaryocytes: a patch-clamp study. J Physiol, 1996. 495 (Pt 2): p. 339-52.
- Rolf, M.G. and M.P. Mahaut-Smith, *Effects of* enhanced P2X1 receptor Ca2+ influx on functional responses in human platelets. Thromb Haemost, 2002. 88(3): p. 495-502.
- 27. Toth-Zsamboki, E., et al., *P2X1-mediated ERK2* activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46661-7.
- 28. Hechler, B. and C. Gachet, *Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(11): p. 2307-15.
- 29. Schwarz, U.R., U. Walter, and M. Eigenthaler, *Taming platelets with cyclic nucleotides.* Biochem Pharmacol, 2001. **62**(9): p. 1153-61.
- Smolenski, A., et al., Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20029-35.

- Butt, E., et al., cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. J Biol Chem, 1994.
   269(20): p. 14509-17.
- 32. Halbrugge, M., et al., Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3088-93.
- 33. Massberg, S., et al., *Enhanced in vivo platelet* adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. Blood, 2004. **103**(1): p. 136-42.
- Aszodi, A., et al., 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(1): p. 37-48.
- Horstrup, K., et al., Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. Eur J Biochem, 1994. 225(1): p. 21-7.
- Mullershausen, F., et al., Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. J Cell Biol, 2003. 160(5): p. 719-27.
- 37. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie), Aufgestellt gemäß §§ 12 a und 18 Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut. Deutscher Ärzteverlag, Köln, Gesamtnovelle 2017.
- 38. Henseler, O., et al., Bericht zur Meldung nach § 21 TFG für die Jahre 2010 und 2011.
  Bundesgesundheitsblatt, 2013. 56: p. 1352-1367.

- Verordnung über die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft (Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung -AMWHV). Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2006 (BGBI. I S. 2523), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 7. Juli 2017 (BGBI. I S. 2842).
- Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz - TFG). Fassung der Bekanntmachung vom 28. August 2007 (BGBI. I S. 2169), zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBI. I S. 2757).
- Eckstein, R. and R. Zimmermann, *Immunhämatologie* und klinische Transfusionsmedizin. 6. Auflage ed. Urban & Fischer Verlag, München. 2010. XIV + 255 S., S. 221.
- 42. Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Herausgegeben vom Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des wissenschaftlichen Beirats, Deutscher Ärzteverlag, Köln, 4. überarbeitete und aktualisierte Auflage 2014.
- 43. Paul-Ehrlich-Institut. *Tabellen Gewinnung, Herstellung, Import, Export und Verbrauch 2016 und Auswertungen über mehrere Jahre*. Last Update Date: 31.08.2017; Available from: http://www.pei.de/DE/infos/meldenflichtige/meldung-

http://www.pei.de/DE/infos/meldepflichtige/meldungblutprodukte-21-transfusionsgesetz/berichte/berichte-21tfg-node.html#doc3258776bodyText1.

44. Mindestanforderungen an die mikrobiologische Kontrolle von Blutkomponenten zur Transfusion -Aktualisierung des Votums 16. Votum 43 des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, Bundesgesundheitsblatt, 2013. **56**: p. 474-475.

- Festlegung Haltbarkeitsfrist von Thrombozyten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. Votum 38 des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, Bundesgesundheitsblatt, 2008. 51: p. 1484.
- Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG). Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2015 (BGBI. I S. 3394), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBI. I S. 2757).
- 47. Schubert, P. and D.V. Devine, *Towards targeting* platelet storage lesion-related signaling pathways. Blood Transfus, 2010. 8 Suppl 3: p. 69-72.
- Feinberg, H., et al., *Platelet storage: changes in cytosolic Ca2+ actin polymerization and shape.* Blood, 1988. **72**(2): p. 766-9.
- Shapira, S., et al., The effect of storage on the expression of platelet membrane phosphatidylserine and the subsequent impacton the coagulant function of stored platelets. Transfusion, 2000. 40(10): p. 1257-63.
- 50. Curvers, J., et al., *Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma.* Transfusion, 2004. **44**(1): p. 49-58.
- 51. Holme, S., et al., *The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability.* Transfusion, 1997. **37**(1): p. 12-7.
- 52. Leytin, V., et al., *Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates.* Transfusion, 2004. **44**(10): p. 1487-95.

- Rinder, H.M., et al., *Reversibility of severe metabolic* stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vivo transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival. Transfusion, 2003. 43(9): p. 1230-7.
- 54. Thiele, T., et al., *Early storage lesions in apheresis platelets are induced by the activation of the integrin alphallbbeta(3) and focal adhesion signaling pathways.* J Proteomics, 2012. **76 Spec No.**: p. 297-315.
- 55. Cauwenberghs, S., et al., Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrinmediated destabilization of actin cytoskeleton. FEBS Lett, 2006. **580**(22): p. 5313-20.
- Keuren, J.F., et al., *Platelet ADP response deteriorates in synthetic storage media.* Transfusion, 2006. 46(2): p. 204-12.
- Koessler, J., et al., *Expression and function of purinergic receptors in platelets from apheresis-derived platelet concentrates.* Blood Transfus, 2015. 14(6): p. 545-551.
- Badlou, B.A., et al., Prolonged platelet preservation by transient metabolic suppression. Transfusion, 2005.
   45(2): p. 214-22.
- 59. Holme, S. and A. Heaton, *In vitro platelet ageing at 22 degrees C is reduced compared to in vivo ageing at 37 degrees C.* Br J Haematol, 1995. **91**(1): p. 212-8.
- 60. Hoffmeister, K.M., et al., *The clearance mechanism of chilled blood platelets.* Cell, 2003. **112**(1): p. 87-97.
- Hoffmeister, K.M., et al., *Glycosylation restores* survival of chilled blood platelets. Science, 2003.
   **301**(5639): p. 1531-4.
- Fitzhugh, A.L. and L.K. Keefer, *Diazeniumdiolates:* pro- and antioxidant applications of the "NONOates". Free Radic Biol Med, 2000. 28(10): p. 1463-9.

- 63. Keefer, L.K., et al., "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. Methods Enzymol, 1996.
  268: p. 281-93.
- Morley, D. and L.K. Keefer, *Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators.* J Cardiovasc Pharmacol, 1993. 22 Suppl 7: p. S3-9.
- 65. Morley, D., et al., *Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators.* J Cardiovasc Pharmacol, 1993. **21**(4): p. 670-6.
- 66. Wallis, J.P., *Nitric oxide and blood: a review.* Transfus Med, 2005. **15**(1): p. 1-11.
- Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease.* J Pathol, 2000. 190(3): p. 244-54.
- 68. Maragos, C.M., et al., *Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects.* J Med Chem, 1991. **34**(11): p. 3242-7.
- Lancaster, J.R., Jr., A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. Nitric Oxide, 1997. 1(1): p. 18-30.
- 70. Saavedra, J.E., et al., *Localizing antithrombotic and vasodilatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor.* J Med Chem, 1996. **39**(22): p. 4361-5.
- 71. Wolf, E.W., et al., *Reversal of cerebral vasospasm* using an intrathecally administered nitric oxide donor. J Neurosurg, 1998. **89**(2): p. 279-88.
- Kobsar, A., et al., Specific inhibitory effects of the NO donor MAHMA/NONOate on human platelets. Eur J Pharmacol, 2014. 735: p. 169-76.
- 73. Homer, K.L. and J.C. Wanstall, *Platelet inhibitory effects of the nitric oxide donor drug MAHMA*

*NONOate in vivo in rats.* Eur J Pharmacol, 2003. **482**(1-3): p. 265-70.

- 74. Homer, K.L. and J.C. Wanstall, *Inhibition of rat platelet aggregation by the diazeniumdiolate nitric oxide donor MAHMA NONOate.* Br J Pharmacol, 2002. **137**(7): p. 1071-81.
- Kobsar, A., et al., Increasing susceptibility of nitric oxide-mediated inhibitory platelet signaling during storage of apheresis-derived platelet concentrates. Transfusion, 2014. 54(7): p. 1782-9.
- Wanstall, J.C., K.L. Homer, and S.A. Doggrell, Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. Curr Vasc Pharmacol, 2005. 3(1): p. 41-53.
- 77. Crane, M.S., A.G. Rossi, and I.L. Megson, A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMPindependent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. Br J Pharmacol, 2005. 144(6): p. 849-59.
- Mingone, C.J., et al., *Hypoxia enhances a cGMP-independent nitric oxide relaxing mechanism in pulmonary arteries.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 285(2): p. L296-304.
- Adachi, T., et al., Reduced sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+) uptake activity can account for the reduced response to NO, but not sodium nitroprusside, in hypercholesterolemic rabbit aorta. Circulation, 2001. 104(9): p. 1040-5.
- Najibi, S., et al., Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. Am J Physiol, 1994. 266(5 Pt 2): p. H2061-7.
- 81. Pluta, R.M., E.H. Oldfield, and R.J. Boock, *Reversal* and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of

subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg, 1997. **87**(5): p. 746-51.

- 82. National Institutes of Health Image J 1.51f. Last Update Date: 10.01.2018; Available from: https://imagej.nih.gov/ij/download.html.
- 83. Margolis, J., *Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces.* J Physiol, 1957. **137**(1): p. 95-109.
- 84. di Villa Bianca, R., et al., *An ex vivo standardized* assay to measure human platelet cGMP. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011. **64**(2): p. 164-7.
- 85. Crane, M.S., et al., *Novel role for low molecular weight plasma thiols in nitric oxide-mediated control of platelet function.* J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 46858-63.
- Enzo Life Sciences, I.F., NY, USA. Produktdatenblatt DEA NONOate ALX-430-034 Nitric oxide donor. 2017 04.12.2017; Available from: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/Dat asheet-ALX-430-034.pdf.
- 87. Egger, D. and K. Bienz, *Protein (western) blotting.* Mol Biotechnol, 1994. **1**(3): p. 289-305.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
- 89. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.* J Biochem Biophys Methods, 1984. **10**(3-4): p. 203-9.
- Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
- Lottspeich, F. and J.W.H. Engels, *Bioanalytik*. 3. Auflage ed. 2012, Springer-Verlag Berlin XXIV + 1201 S., S. 112 ff., S. 281-285.

- 92. Rüchel, R.S., Russell L. Erbe, Eric F., *Transmissionelectron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels.* Journal of Chromatography A, 1978. **166**(2): p. 563-575.
- 93. ThermoFisher Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa. Last Update Date: 30.10.2017; Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26 616.
- 94. Romero-Calvo, I., et al., *Reversible Ponceau staining* as a loading control alternative to actin in Western blots. Anal Biochem, 2010. **401**(2): p. 318-20.
- 95. Nanotools Antikörpertechnik Mouse Monoclonal Antibody to VASP (phospho-Ser 157). Last Update Date: 30.10.2017; Available from: http://www.nanotools.de/datasheets/DS-0085-100-VASP-5C6-04-080507F.pdf.
- 96. Nanotools Antikörpertechnik Mouse Monoclonal Antibody to VASP (phospho-Ser239). Last Update Date: 30.10.2017; Available from: http://www.nanotools.de/datasheets/DS-0047-100-VASP-16C2-03-080507F.pdf.
- 97. Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system. Last Update Date: 30.10.2017; Available from: https://www.gelifesciences.com/gehcls\_images/GELS/ Related%20Content/Files/1314723116657/litdoc28955 347 20161013131532.pdf.
- Whitehead, T.P., et al., *Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory.* Clin Chem, 1979. 25(9): p. 1531-46.
- 99. Van Weemen, B.K. and A.H. Schuurs, *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Lett, 1971.
  15(3): p. 232-236.
- 100. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of*

*immunoglobulin G.* Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.

101. Handbuch Cyclic GMP EIA Kit, Item No. 581021, Cayman Chemical Company. Last Update Date: 31.10.2017; Available from:

https://www.caymanchem.com/pdfs/581021.pdf.

102. Handbuch Cyclic AMP EIA Kit, Item No. 581001, Cayman Chemical Company. Last Update Date: 31.10.2017; Available from:

https://www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf.

- 103. Bonner, W.A., et al., *Fluorescence activated cell sorting.* Rev Sci Instrum, 1972. **43**(3): p. 404-9.
- 104. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford.* Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.
- Herzenberg, L.A., R.G. Sweet, and L.A. Herzenberg, Fluorescence-activated cell sorting. Sci Am, 1976.
   234(3): p. 108-17.
- 106. Baumgarth, N. and M. Roederer, A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J Immunol Methods, 2000. 243(1-2): p. 77-97.
- 107. BD Biosciences FACSCalibur Instructions For Use, San Jose, USA. Last Update Date: 01.11.2017; Available from: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD\_FACS Calibur\_instructions.pdf.
- 108. Ault, K.A., *Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets.* Ann N Y Acad Sci, 1993. **677**: p. 293-308.
- Ault, K.A. and J. Mitchell, *Analysis of platelets by flow cytometry.* Methods Cell Biol, 1994. 42 Pt B: p. 275-94.
- 110. Shapiro, H.M., *Practical Flow Cytometry*. 2003: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. xlix + 681 S., S. 45, 113, 138, 144.

- 111. Hüsler Jürg, Z.H., Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. 5. Auflage ed. 2010, Bern: Verlag Hans Huber. 382 S., S. 95-105.
- 112. Gulliksson, H., *Platelet storage media.* Vox Sang, 2014. **107**(3): p. 205-12.
- 113. Kraemer, B.F., A.S. Weyrich, and S. Lindemann, *Protein degradation systems in platelets.* Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 920-4.
- 114. Koessler, J., et al., *Evaluation of dose-dependent* effects of the proteasome inhibitor bortezomib in human platelets. Eur J Pharmacol, 2016. **791**: p. 99-104.
- 115. Avcu, F., et al., *Effects of bortezomib on platelet aggregation and ATP release in human platelets, in vitro.* Thromb Res, 2008. **121**(4): p. 567-71.
- Metcalfe, P., et al., Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. Br J Haematol, 1997.
   98(1): p. 86-95.
- Vassallo, R.R. and S. Murphy, A critical comparison of platelet preparation methods. Curr Opin Hematol, 2006. 13(5): p. 323-30.
- 118. Smyth, S.S., et al., G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(4): p. 449-57.
- 119. Winter, M.P., et al., *Advocating cardiovascular* precision medicine with P2Y12 receptor inhibitors. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother, 2017. **3**: p. 221-234.
- 120. Roffman, D.S., Developments in Oral Antiplatelet Agents for the Treatment of Acute Coronary Syndromes: Clopidogrel, Prasugrel, and Ticagrelor. J Pharm Pract, 2016. 29(3): p. 239-49.
- 121. Kunapuli, S.P., *Functional characterization of platelet ADP receptors.* Platelets, 1998. **9**(6): p. 343-51.

- 122. Gachet, C., Regulation of platelet functions by P2 receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. 46: p. 277-300.
- 123. Gachet, C., C. Leon, and B. Hechler, *The platelet P2* receptors in arterial thrombosis. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 223-7.
- 124. Kunapuli, S.P., et al., *Platelet purinergic receptors.* Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(2): p. 175-80.
- 125. Tulapurkar, M.E., et al., Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(12): p. 1388-99.
- 126. Freedman, J.E., *Molecular regulation of plateletdependent thrombosis.* Circulation, 2005. **112**(17): p. 2725-34.
- Mundell, S.J., et al., Distinct clathrin-coated pits sort different G protein-coupled receptor cargo. Traffic, 2006. 7(10): p. 1420-31.
- 128. Liu, E.C. and L.M. Abell, *Development and validation* of a platelet calcium flux assay using a fluorescent imaging plate reader. Anal Biochem, 2006. **357**(2): p. 216-24.
- 129. Lozano, M.L., et al., In vitro analysis of platelet concentrates stored in the presence of modulators of 3',5' adenosine monophosphate, and organic anions. Transfus Sci, 2000. 22(1-2): p. 3-11.
- Menitove, J.E., M. Frenzke, and R.H. Aster, Use of PGE1 for preparation of platelet concentrates. Transfusion, 1986. 26(4): p. 346-50.
- 131. Elias, M., et al., Stabilization of standard platelet concentrates and minimization of the platelet storage lesion by a prostacyclin analogue. Ann Hematol, 1992.
   64(6): p. 292-8.

- 132. Siegl, A.M. and G. Moroff, Effect of forskolin on the maintenance of platelet properties during storage. J Lab Clin Med, 1986. **108**(4): p. 354-9.
- 133. Hawker, R.J., V.S. Turner, and S.G. Mitchell, Use of prostaglandin E1 during preparation of platelet concentrates. Transfus Med, 1996. **6**(3): p. 249-54.
- 134. Becker, G.A., et al., Prostaglandin E 1 in preparation and storage of platelet concentrates. Science, 1972.
  175(4021): p. 538-9.
- 135. Holme, S., et al., *Improved maintenance of platelet in vivo viability during storage when using a synthetic medium with inhibitors.* J Lab Clin Med, 1992. **119**(2): p. 144-50.
- 136. Bode, A.P., et al., Sustained elevation of intracellular cyclic 3'-5' adenosine monophosphate is necessary for preservation of platelet integrity during long-term storage at 22 degrees C. Blood, 1994. 83(5): p. 1235-43.
- 137. Bode, A.P., et al., Extended storage of platelets in an artificial medium with the platelet activation inhibitors prostaglandin E1 and theophylline. Vox Sang, 1991.
  60(2): p. 105-12.
- 138. Schror, K., et al., *The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)-equipotent to PGI2 in vitro.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1981. **316**(3): p. 252-5.
- 139. Belch, J.J., et al., *The effects of intravenous ZK36-374, a stable prostacyclin analogue, on normal volunteers.* Prostaglandins, 1984. **28**(1): p. 67-77.
- 140. Menitove, J.E., L.R. Kagen, and R.H. Aster, *Recovery* and survival in vivo of platelet concentrates prepared with prostaglandin E1. Transfusion, 1988. **28**(1): p. 56-8.
- 141. Sogo, N., et al., Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of cGMP-independent mechanisms.

Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 412-9.

- 142. Stohlawetz, P., et al., Effects of nitric oxide on platelet activation during plateletpheresis and in vivo tracking of biotinylated platelets in humans. Transfusion, 1999.
  39(5): p. 506-14.
- 143. Anfossi, G., et al., Studies on inhibition of human platelet function by sodium nitroprusside. Kinetic evaluation of the effect on aggregation and cyclic nucleotide content. Thromb Res, 2001. 102(4): p. 319-30.
- 144. Radomski, M.W., et al., *S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo.* Br J Pharmacol, 1992. **107**(3): p. 745-9.
- 145. de Belder, A.J., et al., Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. Cardiovasc Res, 1994. 28(5): p. 691-4.

# 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Überblick zu Eigenschaften, Verwendung und Funktion von	
	Thrombozyten	1
Abb. 1.2:	Thrombozytenaggregation an einem Endotheldefekt	3
Abb. 1.3:	Überblick zu Signalwegen der purinergen Rezeptoren	6
Abb. 1.4:	Signalweg des P2Y12-Rezeptors	7
Abb. 1.5:	Signalweg des P2Y1-Rezeptors und der P2X1-Rezeptor als Liganden-gesteuerter Kationenkanal	9
Abb. 1.6:	Signaltransduktion der inhibitorischen Signalwege	11
Abb. 1.7:	Chemische Strukturformel von DEA/NO	19
Abb. 2.1:	PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	43
Abb. 2.2:	Schema zur Funktionsweise des Cyclic GMP EIA Kits.	50
Abb. 2.3:	Darstellung eines Scattergramms erstellt mit der BD Cellquest <sup>™</sup> Pro Software	56
Abb. 3.1:	VASP-Phosphorylierung an Ser <sup>157</sup> (A) und Ser <sup>239</sup> (B) während der Lagerung	61
Abb. 3.2:	Zyklische Nukleotidspiegel während der Lagerung	62
Abb. 3.3:	PDE5A-Gehalt während der Lagerung	63
Abb. 3.4:	Expression von CD62P auf der Thrombozyten-Oberfläche	64
Abb. 3.5:	Fibrinogenbindung bei nicht-inkubierten und mit DEA/NO- inkubierten Thrombozyten	66
Abb. 3.6:	Expression von ADP-Rezeptoren auf der Thrombozyten-	
	Oberfläche	68
## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Kriterien für Qualitätssicherung von TKs (abgeändert nach [37])		
Tab. 1.2:	Eigenschaften verschiedener NO-Donoren	21	
Tab. 2.1:	Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cGMP- Standard	51	
Tab. 2.2:	Pipettier-Schema der Mikrotiterplatte für den ELISA	52	
Tab. 2.3:	Pipettier-Schema der Verdünnungsreihe aus dem cAMP- Standard	54	
Tab. 2.4:	Pipettier-Schema für die FACS-Analyse	58	

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei all denjenigen bedanken, welche den Entstehungsprozess dieser Promotionsarbeit begleitet und auf ihre ganz persönliche Weise zu ihrer Fertigstellung beigetragen haben:

Mein ausdrücklicher Dank gilt dem Direktor des Institutes für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg, Herrn Prof. Dr. Markus Böck, für die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit an seinem Institut fertigen zu dürfen.

Ein besonderer Dank geht an meine wissenschaftlichen Ansprechpartner des Institutes:

An meine Betreuerin, Frau Dr. Anna Kobsar, für die Einarbeitung im Labor und für die vielen wertvollen, zielführenden Hinweise zur Gestaltung der Experimente und deren Auswertung. An meinen Betreuer, Herrn Dr. Jürgen Kössler, insbesondere für die stets zeitnah erfolgten Rückmeldungen und die unterstützenden und anregenden Fachgespräche, in denen wir beide mit Begeisterung transfusionsmedizinische Inhalte diskutierten.

Auch an Frau Katja Weber richtet sich mein Dank für die unverzichtbare Unterstützung bei den praktisch-technischen Belangen im Labor.

Nicht nur für die stets freundliche, entgegenkommende Aufnahme, sondern auch für die Unterstützung bei der Bereitstellung von Probenmaterial und für ihre generelle Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern des Instituts.

Mit großer Dankbarkeit erwähne ich letztlich die verlässliche Unterstützung, die ich durch meine Eltern erfahren durfte. Durch ihre verständnisvolle Teilnahme an meinem Werdegang und durch ihr lebhaftes Interesse angeregt, leisteten auch sie ihren ganz eigenen, unverzichtbaren Beitrag zu dieser Promotionsarbeit.

## Lebenslauf

## Ausbildungsdaten

10/2010 – 06/2017	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians- Universität, Würzburg		
08/2012	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung		
04/2016	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung		
06/2017	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung		
10/2012 - 03/2015	Begleitstudiengang "Experimentelle Medizin", Julius- Maximilians-Universität, Würzburg		
10/2017 - 06/2018	Masterstudiengang "Experimentelle Medizin", Julius- Maximilians-Universität, Würzburg		
12/2017 - 05/2018	Masterarbeit zum Thema " <i>The influence of the nitric oxide donor DEA/NONOate on toll-like receptor 2 and 4 mediated integrity of stored platelets</i> ", Prof. Dr. M. Böck, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg		
Promotion			
11/2013 - 11/2018	Einfluss des NO-Donors DEA/NO auf die Integrität der inhibitorischen Signalwege und der Expression purinerger Rezeptoren bei der ex vivo-Lagerung von Thrombozyten, Prof. Dr. M. Böck, Institut für Klini- sche Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg		

Würzburg, den 29.11.2018