

**Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Markus Böck

**Adenosindiphosphat-vermittelte Funktion und Expression von
purinergen Rezeptoren in gewaschenen humanen Thrombozyten**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Stephanie Hermann
aus Esslingen am Neckar**

Würzburg, 2019



Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Böck
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. Matthias Kroiß
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2019

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie gewidmet

**Wenn auch nichts Epochenmachendes
bei dieser Arbeit herauskam,
so hat sie doch wohl ein Steinchen
eingefügt in den Weg der Erkenntnis.**

Hermine Heusler-Edenhuizen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Morphologie und Funktion von Thrombozyten	2
1.2. Aktivierung von Thrombozyten	7
1.2.1. Adhäsion, shape change und Aggregation	7
1.2.2. Regulation der Thrombozytenaktivierung	9
1.3. Bedeutung der purinergen Rezeptoren	10
1.3.1. P2Y1	11
1.3.2. P2Y12	11
1.3.3. P2X1	11
1.3.4. Zusammenspiel der purinergen Rezeptoren.....	12
1.4. Bedeutung gewaschener Thrombozyten	13
1.5. Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material.....	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Lösungen und Puffer	17
2.1.3. Thrombozytenaktivatoren	17
2.1.4. Antikörper	18
2.1.5. Kits.....	18
2.1.6. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.7. Geräte und Software.....	19
2.2. Methoden	21
2.2.1. Thrombozytenpräparation aus Vollblut	21
2.2.2. Aggregometrie nach Born	23
2.2.2.1. Grundlagen der Aggregometrie.....	23
2.2.2.2. Aggregationsversuche mit gewaschenen Thrombozyten	25
2.2.3. Durchflusszytometrie	26
2.2.3.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	26

2.2.3.2.	Messung der Expression von purinergen Rezeptoren unter Kurzzeitlagerung.....	27
2.2.3.3.	Messung der Expression von purinergen Rezeptoren nach Stimulation	29
2.2.4.	ELISA.....	32
2.2.4.1.	Grundlagen des ELISA	32
2.2.4.2.	Vorbereitung von ELISA-Proben.....	34
2.2.4.3.	Messung der zytosolischen Konzentration von purinergen Rezeptoren	35
2.2.5.	Statistik.....	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Ergebnisse der Aggregationsversuche.....	38
3.1.1.	Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP	38
3.1.2.	Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP und EPI in Kombination.....	40
3.1.3.	Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP und SER in Kombination.....	41
3.1.4.	Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit EPI und SER in Kombination.....	43
3.1.5.	Vergleich der maximalen Aggregationswerte.....	44
3.2.	Thrombozytäre Verteilung von purinergen Rezeptoren nach Thrombozytenaktivierung	45
3.2.1.	Oberflächenexpression purinerner Rezeptoren nach Stimulation	45
3.2.2.	Zytosolische Konzentration purinerner Rezeptoren nach Stimulation	47
3.2.3.	Vergleich der purinergen Rezeptorverteilung nach Stimulation	49
3.3.	Einfluss der Kurzzeitlagerung auf purinerge Rezeptoren	50
3.3.1.	Oberflächenexpression purinerner Rezeptoren während der Kurzzeitlagerung.....	50

3.3.2. Zytosolische Konzentration purinerger Rezeptoren während der Kurzzeitlagerung.....	52
3.3.3. Vergleich der purinergeren Rezeptorverteilung während der Kurzzeitlagerung.....	54
4. Diskussion	55
5. Zusammenfassung	61
6. Abkürzungen.....	63
7. Literaturverzeichnis.....	69
8. Abbildungsverzeichnis	85
9. Tabellenverzeichnis	87
Danksagung	
Lebenslauf.....	

1. Einleitung

1.1. Morphologie und Funktion von Thrombozyten

Im Blut des Menschen sind Thrombozyten mit einer physiologischen Konzentration von etwa 150.000 bis 400.000 pro μl Blut die zweitgrößte Zellpopulation und mit 0,5 - 3,5 μm Durchmesser die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes [1-3]. Im ruhenden Zustand weisen Thrombozyten eine diskoide Form auf, die sich nach Aktivierung einer Formveränderung, dem so genannten shape change, unterziehen, sodass durch Ausstülpung der Membran Pseudopodien gebildet werden [1-6].

Die Proliferation und Ausreifung von Thrombozyten wird durch den Wachstumsfaktor Thrombopoetin, welcher überwiegend in der Leber gebildet wird, reguliert. Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürung des Zytoplasmas aus Megakaryozyten, weshalb diese keinen Zellkern mehr besitzen, jedoch einen Rest an RNA, mit dem diese eingeschränkt zur Proteinbiosynthese fähig sind. Sie zirkulieren anschließend etwa 7 - 10 Tage im Blutkreislauf, bevor diese im retikuloendothelialen System von Leber und Milz abgebaut werden [1, 3, 7, 8].

Die Aufgabe der Thrombozyten ist - zusammen mit den Gerinnungsfaktoren - in erster Linie die Hämostase durch Bildung von Thromben infolge einer Vernetzung zur Erhaltung der Gefäßintegrität. Weiterhin sind Thrombozyten aber auch an entzündlichen Vorgängen und immunologischen Prozessen beteiligt. Zudem wirken sie neben anderen Faktoren auch an der Thrombo- und Atherogenese mit [4, 5, 8-11].

Die morphologische Struktur von Thrombozyten kann in drei Zonen unterteilt werden (siehe Abbildung 1): Eine periphere Zone, ein offenes kanalikuläres System und eine Zone der Organellen [1-3].

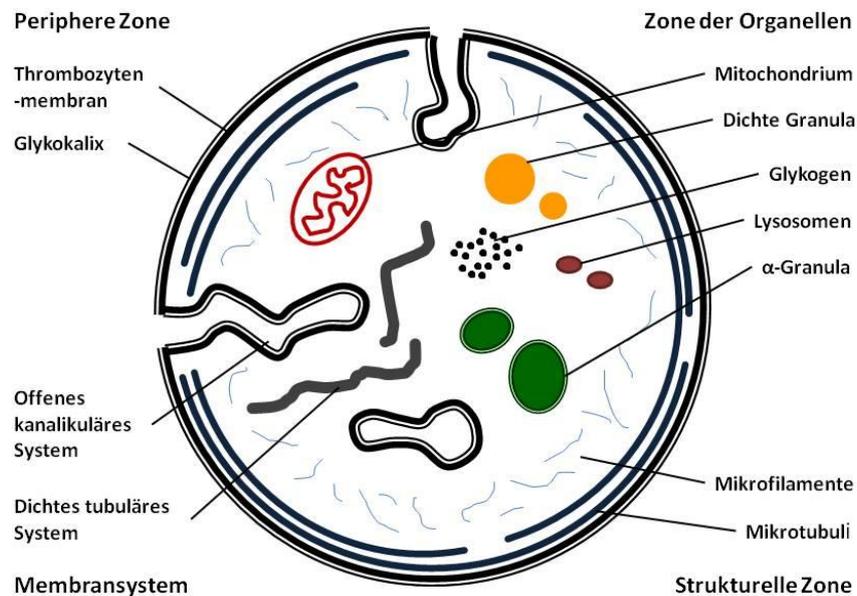


Abbildung 1: Morphologie eines humanen Thrombozyten

Die periphere Zone entspricht wie bei anderen Zellen der Zytoplasmamembran, bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht mit integralen Membranproteinen und einer nach außen hin aufgelagerten Glykokalix aus Mucopolysacchariden [12-15]. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, die in die Membran eingebettet sind und die der Interaktion des Thrombozyten mit der Umgebung und der Steuerung der Thrombozytenfunktion dienen. Eine große Gruppe sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu denen z.B. der Thrombin-Rezeptor sowie die purinergen Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 gehören. Über Bindung von Agonisten und Antagonisten an die spezifischen Rezeptoren werden mittels Signaltransduktion aktivierende und hemmende Mechanismen im Thrombozyten gesteuert [16-20]. Wichtige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten

Agonist / Antagonist	Rezeptor	G-Protein
ADP	P2Y1	G _q
	P2Y12	G _i
Adrenalin	α _{2A}	G _i
	β ₂	G _s
Prostaglandin E2	EP	G _s
Prostaglandin I2 / Prostacyclin	IP	G _s
Serotonin	5-HT _{2A}	G _q
Thrombin	PAR-1	G _q , G ₁₂ /G ₁₃ , (G _i)
	PAR-4	G _q , G ₁₂ /G ₁₃
Thromboxan A ₂	TP	G _q , G ₁₂ /G ₁₃

α_{2A}/ β₂ = Adrenozeptor; EP = Prostaglandin E2-Rezeptor; IP = Prostaglandin I2/ Prostacyclin-Rezeptor; 5-HT_{2A} = 5-Hydroxy-tryptamine-receptor; P2Y1/ P2Y12 = Purinerge Rezeptoren; PAR = Protease activated receptor; TP = Thromboxane receptor

Zum Teil sind verschiedene Rezeptoren an die gleichen G-Proteine gekoppelt und nutzen somit auch dieselben intrazellulären Signalwege. Einen Überblick über die Signalwege der wichtigsten G-Proteine gibt Tabelle 2 wieder [21, 22].

Tabelle 2: Intrazelluläre Effekte der wichtigsten G-Proteine

G-Protein	Gekoppelte Enzyme	Signalweg	Intrazellulärer Effekt
G _q	PLC	PIP ₂ → IP ₃ + DAG → Ca ²⁺ ↑ + PKC ↑	Degranulation, shape change
G _i	AC PI-3-K	cAMP ↓	VASP-Phosphorylierung ↓ Aktivierung von GPIIb/IIIa
G _{12/13}	RhoA	MP ↓ → MLCK ↑	shape change

AC = Adenylcyclase; Ca²⁺ = Calcium; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; DAG = 1,2-Diacylglycerin; GPIIb/IIIa = Glycoproteine IIb/IIIa; IP₃ = Inositol-1,4,5-tris-phosphat; MP = Myosinphosphatase; MLCK = Myosin light chain kinase; PI-3-K = Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC = Proteinkinase C; PLC = Phospholipase C; RhoA = Rhokinase A; VASP = Vasodilatator stimulated phosphoprotein

Die Aktivierung des P2Y1- sowie des Serotonin-Rezeptor führt gleichermaßen über das G_q-Protein zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) bewirkt [23-26]. Infolgedessen kommt es zur Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [16, 20, 27]. Hierdurch wird die Degranulation in Gang gebracht, wodurch eine Reihe aggregationsfördernder, prokoagulatorischer sowie vasoaktiver Substanzen freigesetzt werden, die sich direkt am Aktivierungsvorgang von Thrombozyten beteiligen [17-19, 28]. Bei Überschreiten einer gewissen intrazellulären Kalziumkonzentration wird zudem die Formveränderung über Reorganisation des Zytoskelettes der Thrombozyten ausgelöst [6, 20, 29, 30].

Über das G_i-Protein, an welches der P2Y12- sowie auch der α_{2A}-adrenerge Rezeptor gekoppelt ist, kommt es nach Induktion der Phospho-Inositid-3-Kinase (PI-3-K) zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Komplexes durch Umbildung des Zytoskeletts, sodass die Anlagerung von Fibrinogen ermöglicht wird [31-33].

Darüber hinaus sind Glykoproteine (GP) auf der thrombozytären Oberfläche vertreten, die in die vier große Gruppen Integrine, Selektine, leuzinreiche Glykoproteine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp unterteilt werden [34-39]. Wichtige Glykoproteine zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Glykoproteine von Thrombozyten

Glykoprotein	Synonym	Funktion
Ia/IIa	Integrin α ₂ β ₁	Rezeptor für Kollagen
IIb/IIIa	Integrin α _{2b} β ₃	Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin
Ib-V-IX	Leuzinreiches GP	Rezeptor für von-Willebrand-Faktor

Als strukturelle Zone werden die submembranös gelegenen Mikrotubuli sowie das Netzwerk aus unterschiedlichen Strukturproteinen, hauptsächlich Aktin und Aktin-Bindungsprotein, zusammengefasst. Sie bilden das Zytoskelett, durch welches einerseits die diskoidale Form des ruhenden Thrombozyten aufrechterhalten wird, andererseits die Formveränderung während der Aktivierung durch Bildung von Filamenten aus Aktin und Myosin angetrieben wird [2, 6, 32, 40, 41].

Die Zone der Organellen vereint Mitochondrien, Glykogenspeicher und die für Thrombozyten charakteristischen drei Arten von Speichergranula, die in Tabelle 4 aufgelistet sind. Diese Organellen beinhalten Substanzen, welche für die Thrombozytenfunktion essentiell sind. Die α -Granula sind mengenmäßig vorherrschend und speichern Inhaltsstoffe, die sich an vielen verschiedenen Vorgängen, wie z.B. der Adhäsion, der Aggregation, der Chemotaxis, aber auch an inflammatorischen Prozessen beteiligen. Daneben gibt es dichte Granula (*engl. dense bodies*), in denen aggregationsfördernde Stoffe gespeichert werden, sowie lysosomale Granula, die hydrolytische Enzyme enthalten [2, 40-42].

Tabelle 4: Inhaltsstoffe thrombozytärer Speichergranula

α-Granula	Dichte Granula	Lysosomale Granula
<p>Enzyme</p> <ul style="list-style-type: none"> α_1-Antitrypsin α_2-Makroglobilin α_2-Antiplasmin C1-Esterase-Inhibitor <p>Ädhäsionsproteine</p> <ul style="list-style-type: none"> Fibrinogen Fibronektin von-Willebrand-Faktor Thrombospondin Vitronektin Glykoprotein IIb/IIIa <p>Koagulationsfaktoren</p> <ul style="list-style-type: none"> HMWKG Plasminogen Faktor V, XI Fibrinogen Protein S <p>Wachstumsfaktoren</p> <p>Zytokinähnliche Proteine</p>	<ul style="list-style-type: none"> ADP ATP Ca^{2+} Serotonin Phosphat Guaninnukleotide 	<ul style="list-style-type: none"> α-Arabinside β-Galactosidase β-Glucuronidase N-Acetylglucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin

Weiterhin sind Thrombozyten mit einem Membransystem durchzogen, welches sich aufteilt in ein offenes kanalikuläres System (SCS, *engl. surface connected system*) und ein dichtes tubuläres System (DTS, *engl. dense tubular system*). Das offene kanalikuläre System hat Anschluss an die Zytoplasmamembran und zieht mit gewundenen Kanälen tief ins Innere des Thrombozyten. Das dichte tubuläre System ist ein Residuum des rauen endoplasmatischen Retikulums und einer der Hauptspeicherorte für Kalzium, welches besonders an der Aktivierung und dem shape change von Thrombozyten beteiligt ist [2, 43, 44].

1.2. Aktivierung von Thrombozyten

1.2.1. Adhäsion, shape change und Aggregation

Bei einer Läsion der Gefäßwand kommt es zur Freilegung subendothelialer Matrixproteine, wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor, Fibronectin, Laminin oder Thrombospondin. Die sonst zirkulierenden Thrombozyten können über die Membranglykoproteine an diesen Strukturen adhären. Von Bedeutung für die erste Kontaktphase ist vor allem das GPIb-IX-V auf der Thrombozytenoberfläche, welches mit dem von-Willebrand-Faktor in Verbindung tritt, sodass die Anlagerung auch unter Strömungsbedingungen gelingt [37, 45-47]. Die anschließende Stabilisierung der Anlagerung gelingt über weitere thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren und führt im Bereich der Gefäßläsion zu einer anfänglichen Abdichtung.

Insbesondere die Interaktion von Thrombozyten mit Kollagen über verschiedene Rezeptoren, vor allem dem GPVI, setzt den Aktivierungsprozess fort (*engl. outside-in-signaling*). Intrazellulär kommt es zur Ausbildung eines Komplexes aus Adapterproteinen, der über intrazelluläre Signalprozesse durch Reorganisation des Zytoskeletts zur Aktivierung von Integrinen (*engl. inside-out-signaling*) führt, die für die Stabilisierung der adhärenen Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand sorgen [48-52].

Die Freisetzung löslicher thrombozytärer Aktivatoren, wie Thrombin, Thromboxan A₂ (TxA₂) oder Adenosin-5-diphosphat (ADP), führt zusätzlich zur auto-

und parakrinen Stimulation [53-55]. Bei submaximaler Stimulation kommt es durch Umorganisation des Zytoskeletts zu reversiblen Veränderungen der Form des Thrombozyten, bei weiterer Aktivierung zum vermehrten Einbau und zu Konformationsänderungen des GP IIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogenrezeptor) in der Membran. Auf diese Weise wird die irreversible Aggregation eingeleitet, bei der es zu einer Quervernetzung zwischen Thrombozyten durch Ausbildung von Fibrinogenbrücken kommt [33, 56-58]. Infolge der Kontraktion des thrombozytären Zytoskeletts und der parallel ablaufenden sekundären Hämostase mit Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin erfolgt eine Konsolidierung und Stabilisierung des entstehenden Thrombus [56, 59].

Einer der stärksten direkten Aktivatoren von Thrombozyten und gleichzeitig ein wesentlicher Faktor der plasmatischen Gerinnung ist Thrombin, das über proteaseaktivierte Rezeptoren (PAR-1 und PAR-4) seine Effekte vermittelt. ADP ist ein weiterer wichtiger Aktivator, der an purinerge Rezeptoren (P2Y1, P2Y12, P2X1) bindet. ADP ist in hohen Konzentrationen in den dichten Granula gespeichert und wird nach Aktivierung durch Degranulation freigesetzt, wodurch positive Rückkopplungsmechanismen unterhalten werden [60-62]. Ähnlich verhält es sich mit Thromboxan A2 (TxA2), das aus Arachidonsäure (AA) mittels Cyclooxygenase (COX) sowie Thromboxansynthase gebildet wird, um dann über den G-Protein-gekoppelten TxA2-Rezeptor Thrombozyten weiter zu stimulieren [63].

Epinephrin (EPI) und Serotonin (SER) sind selbst nur schwache Aktivatoren, können aber über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Aktivierung der beteiligten Signalwege, z.B. bei der ADP-induzierten Aggregation, verstärken [64, 65].

1.2.2. Regulation der Thrombozytenaktivierung

Unter physiologischen Bedingungen muss eine unerwünschte Thrombozytenaktivierung an der Gefäßwand vermieden werden, sodass der Aktivierungszustand eines Thrombozyten einer stetig regulierten Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Mechanismen unterliegt. Vor allem das intakte Endothel besitzt die Fähigkeit, eine Vielzahl inhibitorischer Substanzen zu bilden, die auf Thrombozyten einwirken [59, 66].

Subendothelial wird eine Ekto-ADPase (Ektonukleotidase) exprimiert, die die Spaltung von ADP fördert, sodass dieses nicht mehr seiner aggregationsfördernden Funktion nachkommen kann. Zusätzlich wird ADP und Thrombin durch Antithrombin inaktiviert. Endothelial gebildete Inhibitoren der Thrombozytenaktivierung sind vor allem Stickstoffmonoxid (NO), welches direkt die lösliche Guanylylzyklase aktiviert, und Prostazyklin (PGI₂), welches mittels des G_s-gekoppelten IP-Rezeptors die Adenylylcyclase (AC) stimuliert. Hierdurch erhöht sich die Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), die ihre antiaggregatorische Wirkung über cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen vermitteln. Diese beeinträchtigen durch Phosphorylierung die Funktion von zahlreichen Effektorproteinen, die an der thrombozytären Aktivierung beteiligt sind [67-69]. Über mehrere Mechanismen - Hemmung des PLC-Signalweges und des IP₃-Rezeptors - werden die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern und somit kalziumabhängige Prozesse blockiert. Zudem wird u.a. über die Hemmung des PLC-Signalweges die Sekretion der intrazellulären Granula verhindert [70-75]. Die zytoskelettale Reorganisation und die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors werden vor allem durch Phosphorylierung von Vasodilatator-stimuliertem Phosphoprotein (VASP) gehemmt [76-79]. Der Abbau von cAMP und cGMP wiederum erfolgt durch Phosphodiesterasen, die ihrerseits durch positive oder negative Rückkopplungsmechanismen gehemmt oder aktiviert werden können [80, 81].

Einen Überblick über die wichtigsten Rezeptoren und die Verschaltung der verschiedenen Signalwege in Thrombozyten gibt Abbildung 2 wieder.

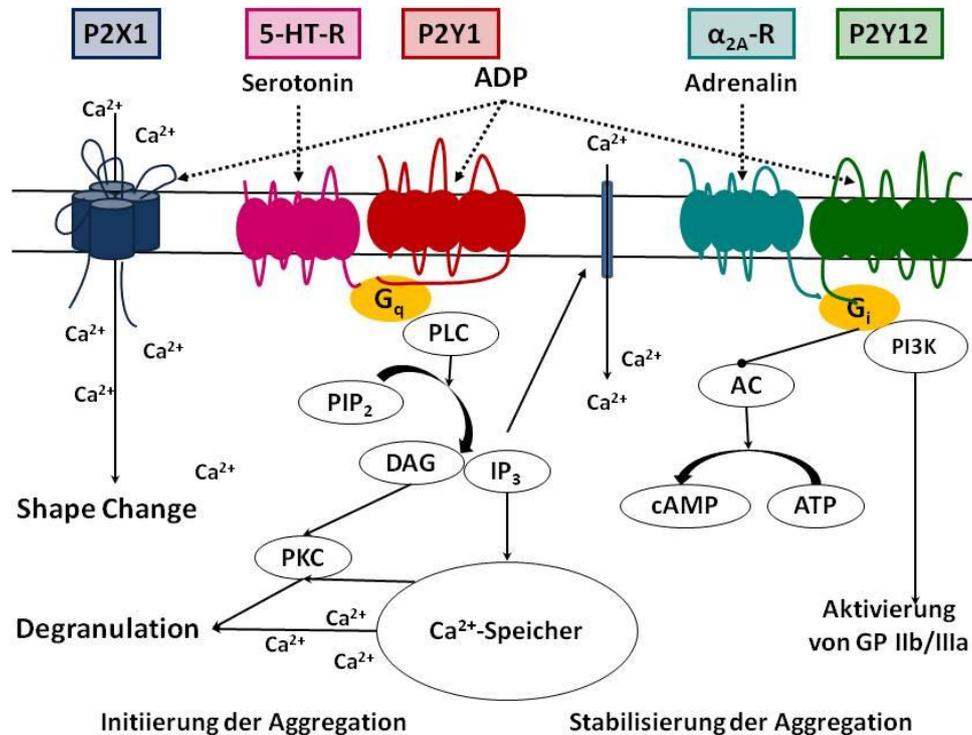


Abbildung 2: Mechanismen der Signaltransduktion in Thrombozyten
 AC = Adenylylcyclase; ATP = Adenosintri-phosphat; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; DAG = 1,2-Diacylglycerin; IP₃ = Inositol-1,4,5-tris-phosphat; PI-3-K = Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₂ = Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat; PKC = Proteinkinase C; PLC = Phospholipase C

1.3. Bedeutung der purinergen Rezeptoren

Es gibt zwei Arten von purinergen Rezeptoren, Adenosin-Rezeptoren (P1) und Nukleotid-Rezeptoren (P2). Die Nukleotid-Rezeptoren werden weiter unterteilt in G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (P2Y) und ligandengesteuerte Ionenkanäle (P2X), von denen es jeweils weitere 11 (P2Y1-11) bzw. 7 (P2X1-7) Subtypen gibt, die unterschiedliche Bindungsdomänen für bestimmte Agonisten aufweisen. Für die ADP-induzierte Aggregation von Thrombozyten sind die Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 relevant [61, 62, 82-88].

1.3.1. P2Y1

Die genomische Sequenz des purinergen Rezeptors P2Y1 wurde 1996 auf Chromosom 3 entschlüsselt und setzt sich aus 373 Aminosäuren zusammen. P2Y1 hat die klassische Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben helikalen Transmembrandomänen [89, 90]. Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch ADP und dessen Derivate, wohingegen ATP als schwacher Antagonist wirkt. Intrazellulär vermittelt das G_q-Protein über eine komplexe Signalkaskade vor allem die Formveränderung von Thrombozyten und Sekretion von Granulainhaltsstoffen [91-93].

1.3.2. P2Y12

Im Jahr 2001 folgte die Beschreibung des P2Y12-Rezeptors auf molekularer Ebene [94]. Die genomische Sequenz ist ebenfalls auf Chromosom 3 lokalisiert und besteht aus 342 Aminosäuren. Wie auch der P2Y1-Rezeptor weist der P2Y12-Rezeptor die Struktur eines heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf und kann durch ADP und dessen Derivate aktiviert werden. Die Signaltransduktion erfolgt über ein G_i-Protein und löst eine Degranulation sowie die Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors aus [95, 96]. Interessanterweise war das pharmakologische Profil dieses Rezeptors lange vor der molekularen Identifikation bekannt. Er dient als Angriffspunkt für einige Thrombozytenaggregationshemmer, die zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden. Hierzu zählen u.a. die Thienopyridine Clopidogrel (Plavix®) und Prasugrel (Efient®), die den P2Y12-Rezeptor irreversibel hemmen [97-102], sowie der reversible Wirkstoff Ticagrelor (Brilique®) [103, 104].

1.3.3. P2X1

Der P2X1-Rezeptor wurde erstmals 1994 beschrieben und ist ein ligandengesteuerter Kationenkanal. Die codierende Sequenz findet sich auf Chromosom 17 und setzt sich aus 399 Aminosäuren zusammen [105-108]. Im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren lässt sich der P2X1 vor allem durch ATP und dessen Derivate aktivieren und nur in geringem Maße durch ADP. Die Struktur des Rezeptors setzt sich aus zwei Transmembrandomänen mit intrazel-

lulärem amino- und carboxy-terminalen Ende sowie einer großen extrazellulären Schleife zusammen. Um den schnellen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum zu ermöglichen, muss sich zunächst ein Kanal durch Zusammenlagerung von mindestens drei P2X1-Untereinheiten bilden. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration reicht nicht aus, eigenständig eine shape change auszulösen, trägt jedoch zur P2Y1-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts bei [109-111].

1.3.4. Zusammenspiel der purinergen Rezeptoren

Den beiden Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 wird eine wesentliche Rolle an der ADP-induzierten Aggregation von Thrombozyten zugeschrieben, wohingegen dem P2X1-Rezeptor eher eine untergeordnete, verstärkende Funktion im Rahmen des Aktivierungsprozesses zugeschrieben wird.

Die Bedeutung der einzelnen purinergen Rezeptoren für Aktivierung und Aggregation wurde mit Hilfe spezifischer Rezeptorantagonisten bzw. mit Knockout-Mäusen evaluiert [21, 112]. Thrombozyten von Mäusen mit deaktiviertem Gen für die Codierung des P2Y1-Rezeptors aggregierten nicht mehr nach Induktion mit ADP [113, 114]. Dieser Effekt kann in gleicher Weise mit Rezeptorinhibitoren erzielt werden [115-118]. Die Aktivierung des ebenfalls G_q-gekoppelten 5-HT_{2A}-Rezeptors durch Serotonin kann in diesem Fall jedoch noch eine vollständige Aggregation auslösen [62, 115, 118]. Wird jedoch das Gen für die Codierung des G_q-Proteins ausgeschaltet, so reagieren diese Thrombozyten nicht mehr auf Stimulation mit ADP, Thrombin, Thromboxan A₂ oder Serotonin, da der für die Aggregation erforderliche Signalweg nicht mehr initiiert werden kann [119]. Die gleichen Beobachtungen lassen sich bei Hemmung oder Fehlen des P2Y12-Rezeptors machen. Auch bei diesen Thrombozyten ist nach Stimulation mit ADP eine vollständige Aggregation nicht mehr möglich. Diese kann aber mittels Aktivierung des α_{2A}-Rezeptors durch Adrenalin wiederhergestellt werden [62, 95, 120, 121]. Die Stimulation des P2X1-Rezeptors ist alleine nicht in der Lage, eine Aggregation auszulösen, trägt aber zur Verstärkung des P2Y1-Rezeptor-vermittelten shape change und zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei [109, 111].

1.4. Bedeutung gewaschener Thrombozyten

Thrombozyten wird neben ihrer Funktion in der Blutgerinnung auch eine Rolle bei pathophysiologischen Vorgängen wie z.B. im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen oder immunologischen Prozessen zugeschrieben [11, 122-126]. Eine zentrale Intention der Thrombozytenforschung ist es daher, molekulare Mechanismen aufzuklären, an denen Thrombozyten beteiligt sind.

Zur Durchführung von Experimenten ist es aber erforderlich, Thrombozyten in einem plasmafreien Medium zu verwenden, da Plasmabestandteile einen unerwünschten Einfluss auf die Versuchsergebnisse aufweisen können. Die Entfernung von Plasma kann z.B. durch Zentrifugation und anschließender Resuspension in einem Puffermedium erfolgen. Dieser Vorgang zur Reduktion der Plasmakontamination wird auch als „Waschen“ der Thrombozyten bezeichnet. Häufig verwendete Medien sind z.B. der CGS-Puffer für das Waschen und der HEPES-Puffer für die Resuspension [127-129]. Das Procedere hat allerdings den Nachteil, dass sich die Reaktivität gegenüber Agonisten in gelagerten gewaschenen Thrombozyten stark vermindert und die ADP-vermittelte Thrombozytenaktivierung und -aggregation beeinträchtigt wird [130-132].

Es gibt zwar andere Methoden der Thrombozytenpräparation mit Plasmaentfernung, wie z.B. Filtrationsmethoden, die mutmaßlich zu geringerer Präaktivierung und weniger ausgeprägten Funktionsdefiziten der gewonnenen Thrombozyten führen, erfahrungsgemäß ist die Ausbeute an Thrombozyten allerdings gering und für umfangreiche Experimente meist unzureichend.

In der Transfusionsmedizin ist die Herstellung plasmafreier oder plasmareduzierter Thrombozytenkonzentrate durch Einsatz von Additivlösungen ein Ansatz, um das Risiko transfusionsassoziiertes Reaktionen zu reduzieren [133-141]. Derzeit bedarf es in Thrombozytenkonzentraten jedoch noch eines Restanteils von etwa 30 % Plasma, um die Lebens- und Funktionsfähigkeit der Thrombozyten für die Dauer der Lagerung über 4-5 Tage aufrechtzuerhalten, weiterhin verbunden mit dem potenziellen Risiko immunologischer und allergischer Reaktionen [135, 142-146].

1.5. Fragestellung

Nach der Präparation von gewaschenen Thrombozyten, einem wichtigen Ausgangsmaterial für die experimentelle Forschung oder für die Transfusionsmedizin, tritt ein zunehmender Verlust der ADP-vermittelten Aggregationsfähigkeit ein, ohne dass die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen aufgeklärt sind. Gegenstand dieser Arbeit war es deshalb, mögliche Ursachen für dieses Phänomen aufzudecken [132, 147].

Dafür wurde ein häufig eingesetztes Präparationsverfahren ausgewählt: Thrombozyten werden dabei aus frischem Vollblut gewonnen, mit CGS-Puffer gewaschen und anschließend in HEPES-Puffer resuspendiert. Die Thrombozyten wurden schließlich bei 22°C ohne Agitation für 2 Stunden gelagert. Zu den definierten Zeitpunkten 0, 30, 60 und 120 Minuten wurde die ADP-induzierte Aggregationsfähigkeit mit 10 µM alleine bzw. unter Ko-Stimulation mit threshold-Konzentrationen von EPI oder SER, zwei Induktoren, die mit analogen Signalwegen wie die ADP-Rezeptoren P2Y1 bzw. P2Y12 verschaltet sind, bestimmt. Zusätzlich wurden die Expression der purinergen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche bzw. die Konzentrationen im Zytosol mittels Durchflusszytometrie oder ELISA gemessen.

Das Ziel war es, auf diese Weise Hinweise zu erhalten, wie die Abnahme der ADP-vermittelten Reaktivität von gewaschenen Thrombozyten mit der purinergen Rezeptorexpression und -distribution sowie mit der nachgeschalteten Signalweiterleitung im Zusammenhang steht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BSA	Sigma Aldrich, München
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
DPBS (CaCl ₂ / MgCl ₂ -free)	Gibco, Darmstadt
EGTA 0,5 M	Sigma Aldrich, München
C ₂ H ₅ OH 100 %	Sigma Aldrich, München
CH ₂ O 10 % (-Methanol)	Polysciences, Eppelheim
D-(+)-Glc	Sigma Aldrich, München
HEPES sodium salt	Sigma Aldrich, München
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Merck, Darmstadt
HCl 0,1 M	Merck, Darmstadt

2.1.2. Lösungen und Puffer

CGS buffer pH 6.5	NaCl 120 mM Trisodium citrate 12,9 mM D-Glucose 30 mM
HEPES buffer pH 7.4	NaCl 150 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM D-Glucose 10 mM HEPES 10 mM
PBS/ BSA/ Glc	DPBS (Ca ²⁺ -/ Mg ²⁺ -frei) BSA 0,5 % (0,1 g/ 20 ml) D-Glucose 5,5 mM (0,5 g/ 500 ml)

2.1.3. Thrombozytenaktivatoren

Thrombozytenaktivator	Hersteller
ADP (Adenosindiphosphate)	HART Biologicals, Essen
EPI (Epinephrin-hydrochloride, soluble in H ₂ O)	Sigma Aldrich, München
SER (Serotonin-hydrochloride, soluble in HCL)	Sigma Aldrich, München
TRAP-6 (Thrombin Receptor Activator for Peptide 6)	HART Biologicals, Essen

2.1.4. Antikörper

Bezeichnung	Typ	Hersteller
APC-conjugated Mouse Anti-Human CD41a IgG1 κ	Monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
FITC-conjugated Anti-Rabbit IgG1, κ	Monoklonal	Sigma Aldrich, München
Rabbit-Anti-P2X1-Receptor	Polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem/ IL
Rabbit-Anti-P2Y1-Receptor	Polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem/ IL
Rabbit-Anti-P2Y12-Receptor	Polyklonal	Alomone Labs, Jerusalem/ IL

2.1.5. Kits

Bezeichnung	Hersteller
ELISA-KIT for Purinergic Receptor P2X, G-Protein-coupled 1 (P2RX1)	Cusabio/ WUHAN HUAME Biotech, Wuhan/ China
ELISA-KIT for Purinergic Receptor P2Y, G-Protein-coupled 1 (P2RY1)	Cloud Clone Corp./ USCN Life Science., Houston/ USA
ELISA-KIT for Purinergic Receptor P2Y, G-Protein-coupled 12 (P2RY12)	Cloud Clone Corp./ USCN Life Science, Houston/ USA

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Combitips plus	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Cups Safe-Lock-Tubes 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Insulinspritze Omnican 100	Braun, Melsungen

Küvette Mikro befüllt mit Mixern 1,0 für Aggregometer	Haemochrom Diagnostica, Essen
Monovette Coagulation 9NC 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tipps	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, farblos	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhrchen für FACS 5,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Hartenstein, Würzburg
Röhrchen Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen PP- Tube 14 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.1.7. Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Aggregometer APACT 4004	LABiTEC, Ahrensburg
APACT LPC-Software AS-IS 1.21c	Thermo Fisher Scientific., Schwerte
Elektronische Präzisionswaagen	Kern, Balingen
FACSCalibur flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
CellQuest- Software 6.0	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Fluoroskan Ascent-Software 2.6	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Laboport Mini-Labor-Pumpe	KNF-LAB, Freiburg
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	neoLab, Heidelberg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg

Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Skan it for Multiskan-Software 3.1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pipette Filler	neoLab, Heidelberg
Pipette Pipetman classic	Gilson, Middleton/ USA
Rotator mit Vortexer	neoLab, Heidelberg
Rüttler Rocking Shaker	neoLab, Heidelberg
Sysmex XP-300 Cellcounter	Sysmex, Norderstedt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Vortex- Genie 2	neoLab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wellwash Versa	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge Mikro 320	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 320R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

2.2. Methoden

2.2.1. Thrombozytenpräparation aus Vollblut

Die Entnahme der Blutproben erfolgte am Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg von gesunden Spendern nach Aufklärung und Einwilligung. Für die Untersuchungen lag ein Votum der Ethikkommission bei der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor (Ethikvotum 47/12, April 2012). Das Blut wurde mittels einer Butterfly-Kanüle der Größe 18G aus einer peripheren Vene in eine Citrat-Monovette mit 3,2 % Citratpuffer (106 mM Trinatriumcitrat; Sarstedt AG, Nuembrecht) entnommen. Für jeden Versuchsansatz wurden von einem Spender zwei bis vier Monovetten mit einem Volumen von jeweils 10 ml gewonnen. Direkt im Anschluss wurde die Präparation der gewaschenen Thrombozyten durchgeführt. Dafür wurde zunächst jeder Monovette (10 ml) 60 µl 0,5 M EGTA zugesetzt, um eine Präaktivierung der Thrombozyten bei der anschließenden Zentrifugation zu verhindern. Durch die Zentrifugation des Vollbluts für 5 Minuten bei 280 g (1720 rpm, Hettich Zentrifuge Universal 320R) trennt sich das Blut aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Gewichte der einzelnen Bestandteile in drei Phasen auf (Abbildung 3). Die unterste Schicht bilden die Erythrozyten, die sich aufgrund der höchsten Dichte am Boden ansammeln. Auf dieser Schicht liegt ein dünner gelblicher Film auf, der vor allem aus den Leukozyten gebildet wird und auch als buffy coat bezeichnet wird. Im Übergang zur obersten Schicht, dem Plasma, befinden sich überwiegend Thrombozyten.

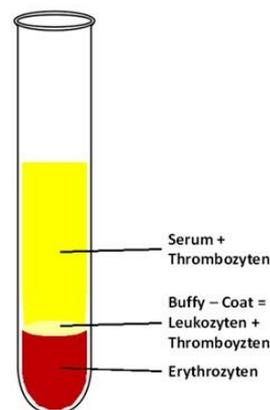


Abbildung 3: Schichtbildung in einer zentrifugierten Blutprobe

Dieses thrombozytenreiche Plasma (PRP, engl. *platelet rich plasma*) wird mit einer Pipette vorsichtig abpipettiert und in ein Reagenzröhrchen überführt. Um eine Trennung der Thrombozyten vom Plasma zu erreichen, zentrifugiert man dieses Reagenzröhrchen für 5 Minuten bei 430 g (2150 rpm, Hettich Zentrifuge Universal 320R). Der nun thrombozytenarme Überstand (PPP, engl. *platelet poor plasma*) wird mit Hilfe einer Pipette entfernt, sodass die Thrombozyten als Pellet am Boden des Röhrchen verbleiben [137, 148].

Anschließend erfolgt der Waschvorgang, wobei im ersten Schritt das Thrombozyten-Pellet in 5 ml vorgewärmten CGS-Puffer resuspendiert und danach erneut für 5 Minuten bei 430 g (2150 rpm, Hettich Zentrifuge Universal 320R) zentrifugiert wird. Danach wird der Überstand abpipettiert und das Thrombozyten-Pellet in 1 ml vorgewärmten HEPES-Puffer aufgeschwemmt [127-129, 132, 146]. Zum Schluss erfolgen die Thrombozytenzählung (Sysmex-XP 300) und die Einstellung der Thrombozytenzahl auf 3×10^8 Thrombozyten/ml durch Verdünnung der Thrombozytenlösung mit HEPES-Puffer [149, 150].

2.2.2. Aggregometrie nach Born

2.2.2.1. Grundlagen der Aggregometrie

Die Aggregometrie nach Born ist eine 1963 entwickelte Methode zur Bestimmung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten, die auf dem Prinzip der Lichttransmission beruht [151].

Das Grundprinzip der Aggregometrie folgt der Absorptionsphotometrie: Licht einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt eine Küvette mit einer Lösung, in der sich ein absorbierender Stoff befindet. Die Lichtintensität, die auf den Detektor trifft, ist abhängig von den Absorptionseigenschaften und der Konzentration des Stoffes in der Lösung und der Länge des Lichtweges, also der Dicke der Küvette. Beschrieben wird diese Gesetzmäßigkeit durch das Lambert-Beer'sche Gesetz [152]:

$$E_{\lambda} = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

- I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes (W/m^2)
- I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes (W/m^2)
- ϵ_{λ} : Extinktionskoeffizient der Wellenlänge λ (m^2/mol)
→ Spezifische Größe für die absorbierende Substanz
- c : Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz in der Lösung (mol/l)
- d : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (m)

Das Intensitätssignal, welches am Detektor gemessen wird, wird logarithmisch gegen die Konzentration c aufgetragen. Auf diese Weise kann bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten die unbekannte Konzentration ermittelt werden [153]. Die Aggregometrie ist im Vergleich hierzu ein turbidimetrisches Messverfahren, bei dem nicht die Absorption, sondern die Änderung der Lichttransmission in einer bestimmten Zeit gemessen wird. Eine Küvette mit PPP oder mit gewaschenen Thrombozyten wird dabei in die Messstation des Aggregometers gestellt. Zum Start der Reaktion wird eine aggregationsinduzierende Substanz dazu gegeben. Durch Bildung von Thrombozytenaggregaten wird die Suspen-

sion lichtdurchlässiger und die Intensität des gemessenen Signals am Detektor nimmt zu (Abbildung 4). Die Lichttransmission vor Start der Reaktion entspricht dabei dem Nullwert (0 %) und die Lichttransmission von PPP nach kompletter Aggregation einem Wert von 100 %. Die Zunahme der Transmission im zeitlichen Verlauf ist ein Maß für die ablaufende Aggregation und wird als Reaktionskurve dargestellt. In der Regel wird die maximale Transmission während der ersten 5 Min. nach Induktion für die Auswertung herangezogen.

Für die Versuche wurde das Aggregometer AFACT 4004 mit vier Messstationen eingesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 740 nm unter ständigem Rühren durch einen Magnetstift. Mit der zugehörigen LPC-Software wurden die Reaktionskurven aufgezeichnet und in Excel zur weiteren Auswertung exportiert.

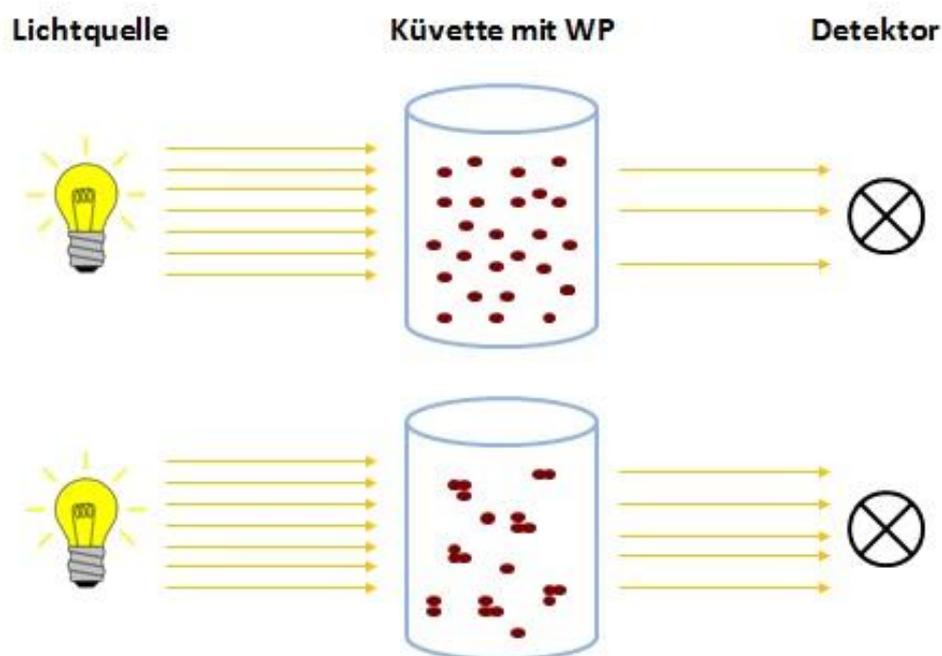


Abbildung 4: Lichttransmission im Aggregometer vor und nach Zugabe von Thrombozytenaktivatoren

2.2.2.2. Aggregationsversuche mit gewaschenen Thrombozyten

Um zu ermitteln, wie sich die aggregationsinduzierenden Stoffe ADP, EPI und SER auf die Aggregationsfähigkeit von gewaschenen Thrombozyten im Zeitverlauf auswirken, wurden diese einzeln oder kombiniert in verschiedenen Probenansätzen getestet. Dazu wurden jeweils 200 µl WP in eine Küvette pipettiert und für 60 - 90 Sekunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 2 µl Ca^{2+} - um eine Endkonzentration von letztlich 1 mM Ca^{2+} in der Lösung zu erzielen - und einem Induktor bzw. einer Kombination zweier Induktoren die Messung der Aggregation über 300 Sekunden unter kontinuierlicher Durchmischung mit einem kleinen Magnetrührer in der Küvette. Die geeigneten Konzentrationen der Induktoren, unter der noch ein aggregationsinduzierender Effekt auftritt, wurden in Vorversuchen ermittelt. Die Induktorkonzentrationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Aggregationsversuche wurden mit frisch präparierten gewaschenen Thrombozyten (0 Minuten) sowie mit 30, 60 und 120 Minuten in einem Reagenzröhrchen bei Raumtemperatur ohne Agitation gelagerten WP durchgeführt.

Tabelle 5: Konzentration der verwendeten Induktoren

Induktor	Konzentration nach Auflösung der Trockensubstanz	Endkonzentration in der Messküvette
ADP	1 mM	10 µM
EPI	50 µM	0,25 µM
SER	250 µM	1,25 µM

2.2.3. Durchflusszytometrie

2.2.3.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass sich Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und ihren intrazellulären Bestandteilen (Granularität) unterscheiden lassen [154-156]. Das Verfahren kann somit zur Bestimmung der Zellzahl und für zelluläre Funktionsuntersuchungen eingesetzt werden. Dafür werden Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, die gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet sind, markiert. Die Zellen werden dann in einem laminaren Strom durch einen Probenkanal geleitet, in dem sie von einem Laserstrahl mit monochromatischem Licht erfasst werden. Dadurch kommt es zum einen zur Streuung des Lichts an den Zellen und zum anderen zur Anregung der an die Zellen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das Streulicht und das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht werden durch ein komplexes optisches System aus Linsen, Spiegeln und Filtern im Innern des Durchflusszytometers in die unterschiedlichen Wellenlängenbereiche aufgesplittet und als spezifische Signale von den verschiedenen Detektoren erfasst. Verdeutlicht wird dieser komplexe Strahlengang in Abbildung 5. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC, *engl. Forwardscatter*) ein Maß für die Beugung des Lichts und hängt von der relativen Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *engl. Sidescatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts und kann eine Aussage über die Granularität der Zelle liefern [157].

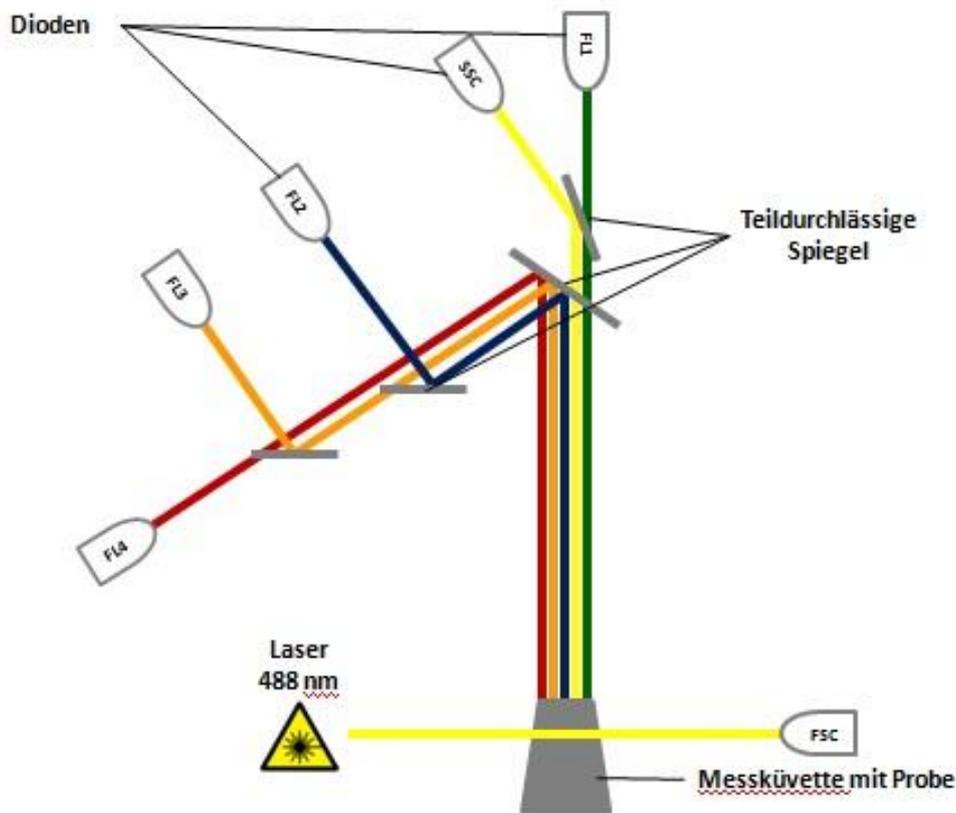


Abbildung 5: Detektionsprinzip im Durchflusszytometer
 FSC = Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)
 SSC = Side Scatter (Seitwärtsstreuung)
 FL = Fluoreszenzkanäle 1-4

2.2.3.2. Messung der Expression von purinergen Rezeptoren unter Kurzzeitlagerung

Die Expression der purinergen Rezeptoren P2X1, P2Y1 und P2Y12 auf der Oberfläche von gewaschenen Thrombozyten wurde zu den definierten Zeitpunkten 0, 30, 60 und 120 Minuten nach Herstellung gemessen.

Für die Präparation der einzelnen Proben werden zu 24 µl WP in Eppendorf Cups 6 µl CD41a-Antikörperlösung und zusätzlich jeweils 2,7 µl P2X1-, P2Y1- oder P2Y12-Antikörperlösung pipettiert. Außerdem wird eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt, in der sich nur WP und Antikörper gegen CD41a befinden. Die so präparierten Proben werden zunächst bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln und anschließend für weitere 15 Minuten bei 37°C

im Thermoblock inkubiert. Danach wird die Reaktion in den Proben mit 3 µl 10 % Formaldehyd (FA) abgestoppt und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Proben für 2 Minuten bei 21380 g (15000 rpm, Hettich Zentrifuge Mikro 200) zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet mit den markierten Thrombozyten mit 30 µl PBS/BSA/Glc versetzt, um die Zellen zu stabilisieren und das Ausmaß an unspezifischen Bindungen zu reduzieren, da durch den Albuminzusatz (BSA, *engl. bovine serum albumin*) ein Teil der Bindungsstellen blockiert wird. Zuletzt folgt die Zugabe von 30 µl FITC-konjugierten Antikörpern (Anti-Rabbit IgG1κ) und nochmals eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Vor der durchflusszytometrischen Bestimmung werden die Proben mit 500 µl PBS/BSA/Glc verdünnt. Die Messung erfolgt am FACSCalibur mit der Software CellQuest von BD Biosciences. Um die Population der Thrombozyten genauer zu analysieren, wird das Scatterdiagramm FL4 - unter den vorgegebenen Grundeinstellungen zur Thrombozytenanalytik - ausgewählt. Die Proben sind bei 4°C bis zu vier Stunden stabil. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe müssen die Proben während der Inkubationsschritte im Dunkeln aufbewahrt werden. Das Pipettierschema findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Pipettierschema - Expression von purinergen Rezeptoren unter Kurzzeitlagerung

24 µl WP	24 µl WP	24 µl WP	24 µl WP
+			
6 µl anti-CD41a	6 µl anti-CD41a	6 µl anti-CD41a	6 µl anti-CD41a
+			
	2,7 µl anti-P2X1	2,7 µl anti-P2Y1	2,7 µl anti-P2Y12
Inkubieren für 15 Minuten bei RT			
Inkubieren für 10 Minuten bei 37°C			
3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA
Zentrifugieren bei 21380 g (15000 rpm) für 2 Minuten bei RT → Überstand verwerfen → Pellet resuspendieren			
30 µl FITC	30 µl FITC	30 µl FITC	30 µl FITC
Inkubieren für 30 Minuten bei RT im Dunkeln			
500 µl PBS/BSA/Glc	500 µl PBS/BSA/Glc	500 µl PBS/BSA/Glc	500 µl PBS/BSA/Glc
FACS-Analyse			

2.2.3.3. Messung der Expression von purinergen Rezeptoren nach Stimulation

Zusätzlich wurde die Expressionsänderung der purinergen Rezeptoren P2X1, P2Y1 und P2Y12 nach Stimulation der gewaschenen Thrombozyten mit verschiedenen Aktivatoren überprüft.

Im ersten Schritt wird zu 200 µl WP in Eppendorf Cups jeweils 18 µl P2X1, P2Y1 oder P2Y12-Antikörperlösung hinzugegeben. Zusätzlich wird eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt, in der sich jedoch im Gegensatz zum Versuch mit Kurzzeitlagerung (vergleiche 2.2.3.2) nur WP befindet. Die präparierten Proben werden zunächst bei Raumtemperatur für 15 Minuten und danach für weitere 10 Minuten bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend werden die 200 µl

WP mit Ansätzen auf 6 Eppendorf-Cups mit jeweils 30 µl aufgeteilt. Diese 6 Proben werden nacheinander mit EPI, SER, EPI und SER in Kombination sowie ADP stimuliert und für jeweils 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Einer Probe wird als Negativkontrolle PBS und einer weiteren Probe als Positivkontrolle TRAP-6 zugegeben, die ebenfalls für 2 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Die Reaktionen werden schließlich mit 3 µl 10 % Formaldehyd abgestoppt. Danach wird mit den Proben wie in Absatz 2.2.3.2 beschrieben weiter verfahren. Das Pipettierschema ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Pipettierschema – Expression von purinergen Rezeptoren nach Stimulation

30 µl WP	200 µl WP		200 µl WP		200 µl WP	
	+					
	18 µl anti-P2X1		18 µl anti-P2Y1		18 µl anti-P2Y12	
Inkubieren für 15 Minuten bei RT						
Inkubieren für 10 Minuten bei 37°C						
Aufteilen der Proben in Eppendorf-Cups						
	30 µl WP					
	+					
	1 µl PBS	1 µl EPI	1 µl SER	1 µl Epi + 1 µl Ser	1 µl ADP	1 µl TRAP-6
Inkubieren für 2 Minuten bei 37°C						
3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA	3 µl FA
Inkubieren für 10 Minuten bei RT						
Zentrifugieren bei 21380 g (15000 rpm) für 2 Minuten bei RT → Überstand verwerfen → Pellet resuspendieren						
60 µl FITC	60 µl FITC	60 µl FITC	60 µl FITC	60 µl FITC	60 µl FITC	60 µl FITC
Inkubieren für 30 Minuten bei RT im Dunkeln						
500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc	500 µl PBS/BSA/ Glc
FACS-Analyse						

2.2.4. ELISA

2.2.4.1. Grundlagen des ELISA

Der ELISA (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Verfahren, bei dem Substanzen durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden [152, 153, 158]. Beim indirekten ELISA (auch Sandwich-ELISA) kommen zwei verschiedene Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, zum Einsatz, wobei zu berücksichtigen ist, dass beide Antikörper an unterschiedliche Stellen (Epitope) des Antigens binden, um sich nicht gegenseitig zu behindern. Ein Antikörper (*engl. coat antibody*) ist an eine feste Phase gebunden, meist in Vertiefungen (*engl. wells*) einer Mikrotiterplatte. In diese Vertiefungen wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen gegeben und inkubiert, sodass der in den wells gebundene Antikörper das Antigen in der Probe binden kann. Im nächsten Schritt wird der sogenannte Primär-Antikörper (*engl. detection antibody*), der ebenfalls an das Antigen bindet, jedoch an anderer Stelle, hinzugegeben. Während der Inkubation entstehen nun die Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe, worauf der Name Sandwich-ELISA zurückzuführen ist. Zuletzt wird noch ein weiterer Sekundär-Antikörper, der an ein chromogenes Enzym gekoppelt ist, zugegeben. Dargestellt als Schema in Abbildung 6.

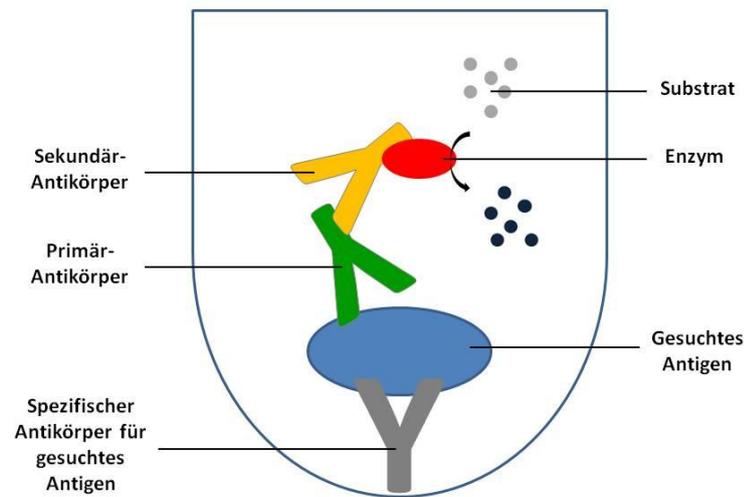


Abbildung 6: Funktionsprinzip eines ELISA

Jeweils im Anschluss an die Inkubationsphase erfolgen Waschschrte, mit denen überschüssige Antigene sowie Antikörper entfernt werden. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Antigens erfolgt nun die Zugabe eines chromogenen Substrates, wodurch die enzymatische Reaktion gestartet und die Umsetzung des Substrates mit Farbumschlag in Gang gesetzt wird. Nach Abstoppen dieser enzymatischen Reaktion mit einer Stopplösung kann die Farbänderung mit einem Photometer spektrometrisch bei einer bestimmten Wellenlänge erfasst werden. Die Konzentrationsänderung ist dabei proportional zur Intensität des durch die enzymatische Reaktion entstandenen Farbstoffs, sodass mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration des Antigens in der Probe berechnet werden kann. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) mitgeführt, um eine Kalibrationskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion/emittierte Intensität) zu erhalten [153, 157].

2.2.4.2. Vorbereitung von ELISA-Proben

Die Konzentration der purinergen Rezeptoren im zytosolischen Kompartiment der gewaschenen Thrombozyten wurde mittels kommerzieller ELISA-Kits durchgeführt. Dazu müssen Thrombozyten einem Aufschlussverfahren zugeführt werden.

Um den Rezeptorgehalt nach Stimulation mit Thrombozytenaktivatoren zu bestimmen, werden die Proben zunächst mit ADP, EPI, SER oder mit einer Kombination aus EPI und SER für 2 Minuten bei 37°C stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wird eine unstimulierte Probe und als Positiv-Kontrolle eine mit TRAP-6 stimulierte Probe mitgeführt. Abgestoppt werden die Reaktionen wiederum mit Formaldehyd (FA).

Im Anschluss werden die Thrombozyten lysiert, um die intrazellulären Rezeptoren freizusetzen. Dazu werden die Proben zunächst zweimal bei -80°C in 100 %igem Ethanol schockgefroren und wieder aufgetaut, damit Scherkräfte der entstehenden Eiskristalle die Zellmembran zerstören. Anschließend wird das Zell-Lysat durch dreimaliges Aufziehen mit einer Insulin-Spritze, deren Kanüle einen engen Durchmesser aufweist, homogenisiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 5000 g (7250 rpm, Hettich Zentrifuge Mikro 200R), sodass sich die Membran-Reste als Pellet absetzen. Der Überstand, in dem sich nun die Proteine bzw. Rezeptoren aus dem Inneren der Thrombozyten befinden, wird in Aliquots bei -80°C bis zur Durchführung des ELISAs gelagert.

Durch Wiederholung der Vorbereitungsschritte mit für 30, 60, 90 oder 120 Minuten gelagerten Thrombozyten können Veränderungen der Rezeptorkonzentration während der Kurzzeitlagerung nachgewiesen werden.

2.2.4.3. Messung der zytosolischen Konzentration von purinergen Rezeptoren

Zur Vorbereitung werden die in dem ELISA-Test-Kit enthaltenen und eingesetzten Puffer (EIA-Puffer/Wasch-Puffer) entsprechend den Vorgaben der Test-Anleitung angesetzt.

In den Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind Antikörper gebunden, die spezifisch gegen den P2X1-, P2Y1- oder P2Y12-Rezeptor gerichtet sind. In diese Vertiefungen wird dann die Probe der zytosolischen Fraktion gegeben und 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert, sodass das Antigen an den Antikörper binden kann. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Biotin-konjugierter Antikörper, der ebenfalls spezifisch gegen den jeweiligen Rezeptor gerichtet ist, hinzugegeben und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um ungebundene Proteine, die den Test stören könnten, zu entfernen. Zuletzt wird ein HRP-gekoppelter Antikörper zugesetzt, gefolgt von einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C und mehreren Waschschritten. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Antigens erfolgt die Zugabe des chromogenen TMB-Substrates, wodurch ein gelber Farbumschlag initiiert wird. Gestoppt wird die Reaktion durch Schwefelsäure, wodurch es wieder zu einem blauen Farbumschlag kommt. Diese Farbänderung wird in einem Photometer spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst. Die Auswertung erfolgt mit dem Multiskan FC der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Daten werden an den PC übermittelt und mit der zugehörigen Skan it for Multiskan-Software 3.1 aufgezeichnet. Anschließend können diese Daten nach Excel exportiert und dort statistisch bearbeitet werden.

2.2.5. Statistik

Die Bearbeitung und die statistische Auswertung der Daten aller Versuche, sowie die Erstellung der Grafiken, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, erfolgten mit Excel von Microsoft. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler (SEM, *engl. Standard error of the mean*) dargestellt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Werten nachzuweisen, wurde der gepaarte und ungepaarte t-Test angewendet. Dabei gilt $p < 0,5$ als statistisch signifikant, n gibt die Anzahl der durchgeführten Experimente an.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Aggregationsversuche

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Aggregationsfähigkeit von gewaschenen Thrombozyten bei Kurzzeitlagerung über einen Zeitraum von 2 Stunden entwickelt. Dazu wurden Thrombozyten verwendet, die mit CGS-Puffer gewaschen und in HEPES-Puffer bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die Bestimmung erfolgte mit dem Aggregometer APACT 4004 sofort bzw. 30, 60 und 120 Minuten nach Präparation. Als Induktoren wurden ADP, EPI und SER verwendet. Diese Aktivatoren binden an unterschiedliche Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran, nutzen jedoch gleiche Signalwege für die Signalweiterleitung. Für ADP wurde eine Konzentration von 10 μM gewählt, die in der Regel aggregationsauslösend wirkt. Für EPI mit 0,25 μM und für SER mit 1,25 μM wurden Konzentrationen eingesetzt, die alleine keine Aggregation auslösen, wie sich auch in Vorversuchen bestätigte (Details hierzu werden in dieser Arbeit nicht gezeigt).

3.1.1. Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP

Nach Zugabe von 10 μM ADP zu frisch gewaschenen und für 30, 60 und 120 Min. gelagerten Thrombozyten zeigten sich folgende Aggregationskurven mit entsprechenden maximalen Aggregationswerten (Abbildung 7).

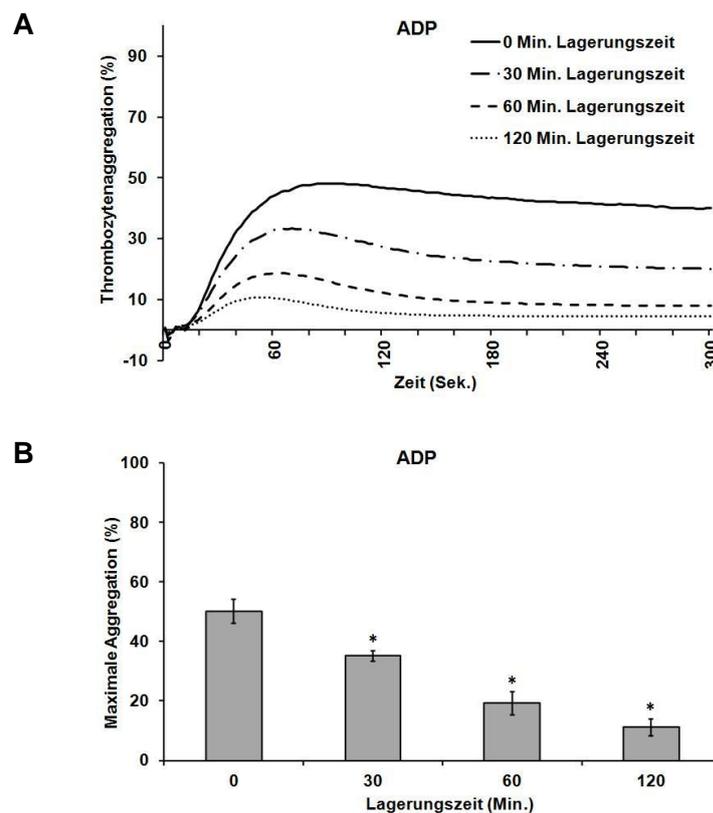


Abbildung 7: ADP-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung

A. Kurven der mittleren Aggregationswerte

B. Maximale Aggregation im Verlauf der Lagerung

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 60 Sek. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10 µM ADP stimuliert. Die Messung erfolgte für 5 Min. im Aggregometer APACT 4004 nach 0, 30, 60 und 120 Min. Lagerung bei RT.

Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; n=9; *p<0,05 (verglichen mit 0 Min.).

Die maximale ADP-induzierte Aggregation von frisch präparierten Thrombozyten erreichte einen Wert von 50,2 % ± 4,0 %. Unter Lagerung zeigte sich eine signifikante Abnahme der maximalen Aggregation auf 35,1 % ± 1,8 % nach 30 Min., auf 19,2 % ± 3,9 % nach 60 Min. und auf 11,1 % ± 2,8 % nach 120 Min.

3.1.2. Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP und EPI in Kombination

Nach Zugabe von 10 μM ADP und 0,25 μM EPI in Kombination zu frisch gewaschenen und für 30, 60 und 120 Min. gelagerten gewaschenen Thrombozyten zeigten sich nachfolgende maximale Aggregationswerte (Abbildung 8).

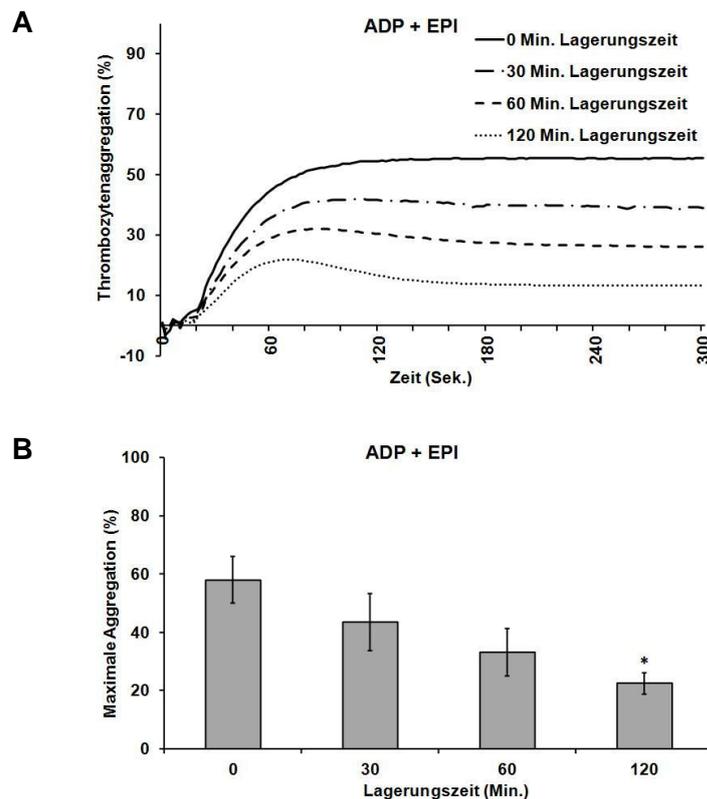


Abbildung 8: ADP mit EPI-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung

A. Kurven der mittleren Aggregationswerte

B. Maximale Aggregation im Verlauf der Lagerung

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 60 Sek. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10 μM ADP und 0,25 μM EPI stimuliert. Die Messung erfolgte für 5 Min. im Aggregometer AACT 4004 nach 0, 30, 60 und 120 Min. Lagerung bei RT. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; n=9; *p<0,05 (verglichen mit 0 Min.).

Bei Stimulation der Thrombozyten mit einer Kombination aus 10 μM ADP und 0,25 μM EPI lag der mittlere Maximalwert der Aggregation bei 58,0 % \pm 8,1 %. Dieser verringerte sich im Verlauf der Lagerung nach 30 Min. auf 43,5 % \pm 9,8 %, nach 60 Min. auf 33,2 % \pm 8,3 % und nach 120 Min. schließlich signifikant auf 22,5 % \pm 3,7 %.

3.1.3. Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit ADP und SER in Kombination

Nach Zugabe von 10 μM ADP und 1,25 μM SER in Kombination zu frisch gewaschenen und für 30, 60 und 120 Min. gelagerten Thrombozyten zeigten sich nachfolgende maximale Aggregationswerte (Abbildung 9).

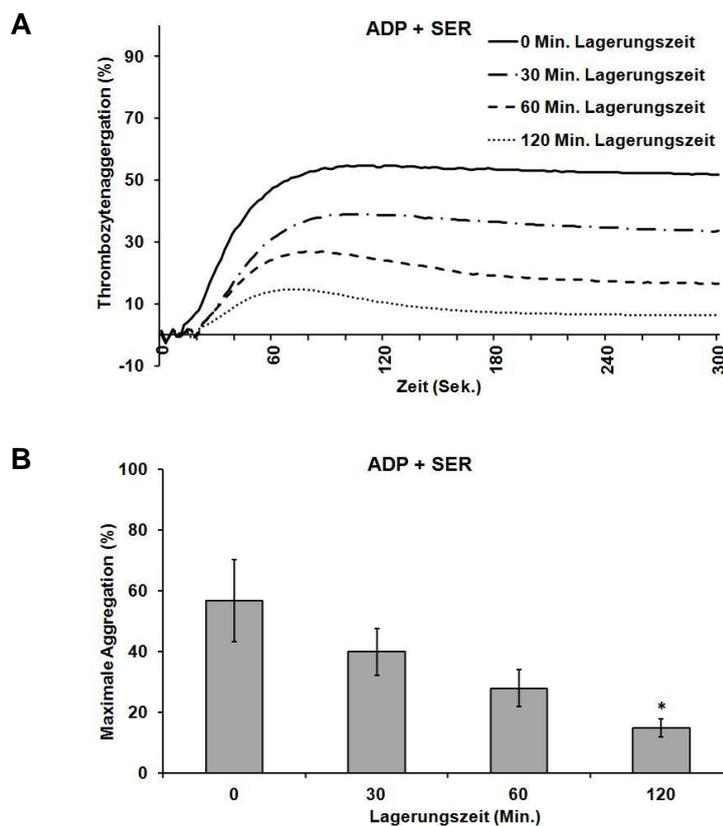


Abbildung 9: ADP mit SER-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung

A. Kurven der mittleren Aggregationswerte

B. Maximale Aggregation im Verlauf der Lagerung

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 60 Sek. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10 µM ADP und 1,25 µM SER stimuliert. Die Messung erfolgte für 5 Min. im Aggregometer APACT 4004 nach 0, 30, 60 und 120 Min. Lagerung bei RT. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; n=9; *p<0,05 (verglichen mit 0 Min.).

Die mittlere maximale Aggregation, die durch die Stimulation frisch gewaschener Thrombozyten mit einer Kombination aus 10 µM ADP und 1,25 µM SER erreicht wurde, lag bei 56,8 % ± 13,5 %. Die Aggregationswerte verminderten sich bei Lagerung nach 30 Min. auf 39,9 % ± 7,8 %, nach 60 Min. auf 27,9 % ± 6,0 % und nach 120 Min. signifikant auf 14,8 % ± 2,9 %.

3.1.4. Aggregationsfähigkeit nach Induktion mit EPI und SER in Kombination

Nach Zugabe der beiden niedrigdosierten Induktoren 0,25 μM EPI und 1,25 μM SER zu frisch gewaschenen und für 30, 60 und 120 Min. gelagerten Thrombozyten ergab sich nachfolgendes Bild für die Aggregationswerte (Abbildung 10).

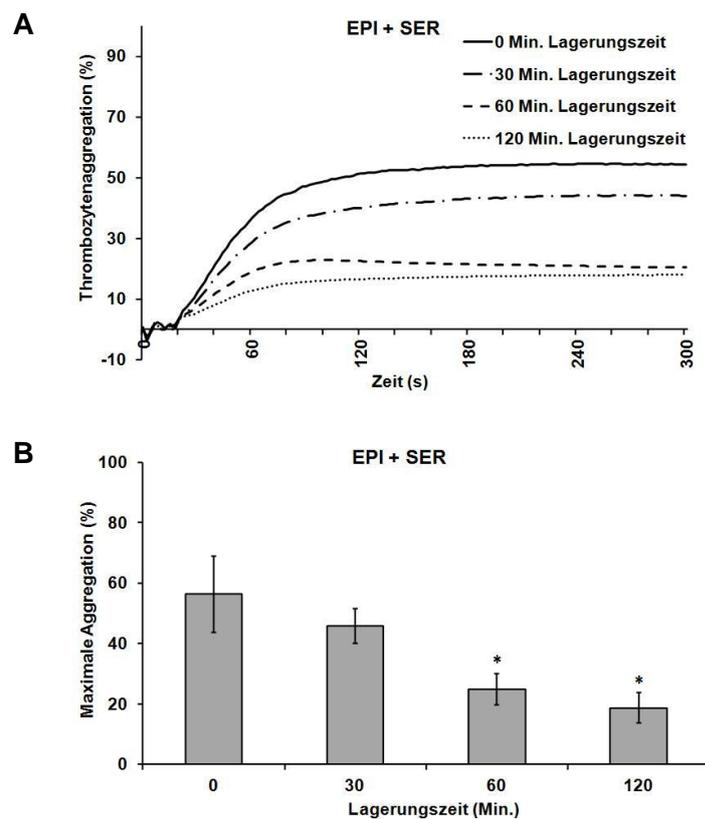


Abbildung 10: EPI mit SER-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlegerung

A. Kurven der mittleren Aggregationswerte

B. Maximale Aggregation im Verlauf der Lagerung

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 60 Sek. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 0,25 μM EPI und 1,25 μM SER stimuliert. Die Messung erfolgte für 5 Min. im Aggregometer AACT 4004 nach 0, 30, 60 und 120 Min. Lagerung bei RT. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; n=8; *p<0,05 (verglichen mit 0 Min.).

Die Kombination aus 0,25 μM EPI und 1,25 μM SER löste im Mittel eine maximale Aggregation von 56,3 % \pm 12,7 % aus. Dieser Wert sank im Verlauf der Lagerung bei Raumtemperatur nach 30 Min. auf 45,8 % \pm 5,7 %, nach 60 Min. auf 24,8 % \pm 5,3 % und nach 120 Min. auf 18,7 % \pm 5,0 %. Nach 60 und 120 Min. Lagerung waren die Reduktionen signifikant.

3.1.5. Vergleich der maximalen Aggregationswerte

Die maximalen Aggregationswerte zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten sind in Tabelle 8 zum Vergleich aufgeführt.

Während der Kurzzeitlagerung zeigte sich unter Induktion mit 10 μM ADP eine zunehmende und deutliche Verminderung der Aggregationsfähigkeit von gewaschenen Thrombozyten. Die gleichzeitige Stimulation mit den wirkungsäquivalenten niedrigdosierten Induktoren EPI oder SER in Ergänzung zu 10 μM ADP oder mit deren Kombination ergab jeweils eine, zwar nicht signifikante, aber dennoch tendenzielle Verbesserung der Aggregation bis zu 10 - 15 % an den verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 8: Vergleich der maximalen Aggregation (in %) nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren zu bestimmten Zeitpunkten der Kurzzeitlagerung (* $p < 0,05$: verglichen mit 0 Min.)

	0 Min.	30 Min.	60 Min.	120 Min.
ADP	50,16	35,11*	19,22*	11,12*
ADP + EPI	57,99	43,51	33,18	22,46*
ADP + SER	56,82	39,87	27,88	14,83*
EPI + SER	56,34	45,76	24,82*	18,65*

3.2. Thrombozytäre Verteilung von purinergen Rezeptoren nach Thrombozytenaktivierung

In den weiteren Untersuchungen wurde die Expression der purinergen Rezeptoren auf der thrombozytären Oberfläche und die Menge der purinergen Rezeptoren im Zytosol nach Stimulation mit unterschiedlichen Thrombozytenaktivatoren bestimmt. Die Oberflächenexpression purinergener Rezeptoren wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflusszytometrisch ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration purinergener Rezeptoren in der zytosolischen Fraktion erfolgte nach Lysierung der Thrombozyten mittels ELISA.

3.2.1. Oberflächenexpression purinergener Rezeptoren nach Stimulation

Die Oberflächenexpression der purinergen Rezeptoren P2Y₁, P2Y₁₂ und P2X₁ wurde zunächst in frisch präparierten gewaschenen Thrombozyten nach Stimulation mit 0,25 µM EPI, 1,25 µM SER, der Kombination aus EPI und SER, 10 µM ADP bzw. 10 µM TRAP-6 durchgeführt (Abbildung 11).

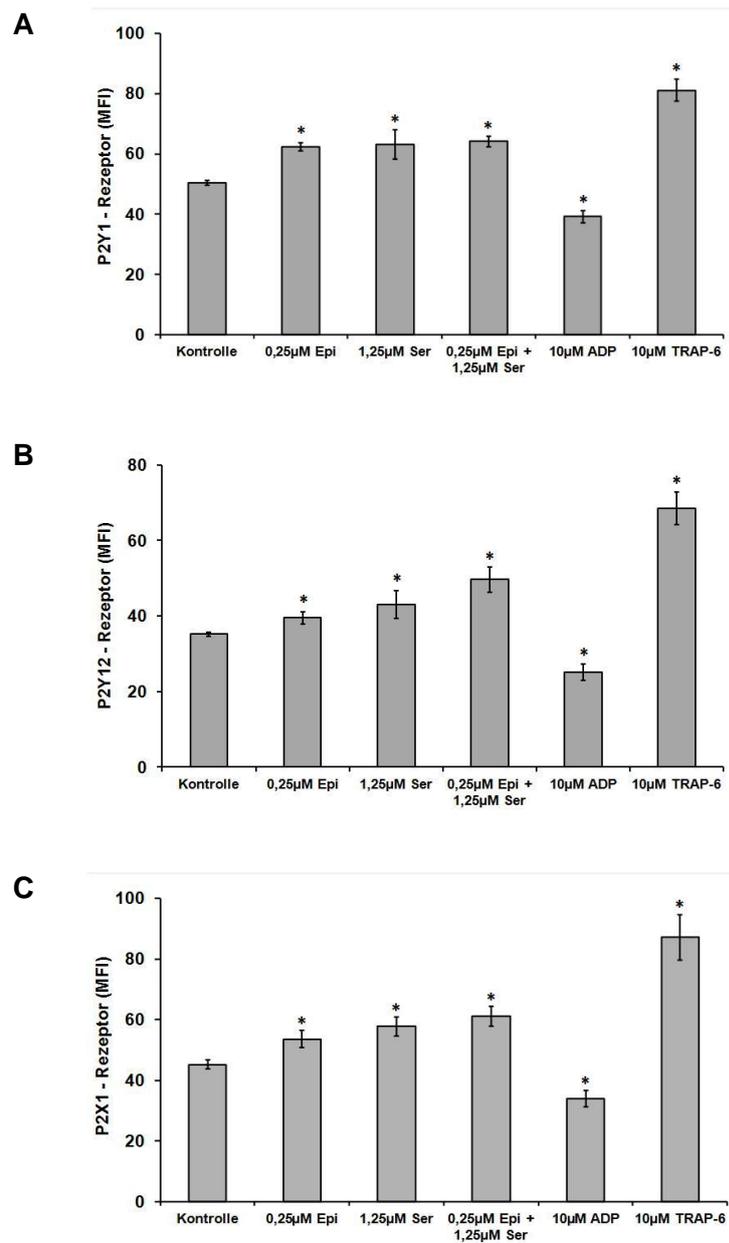


Abbildung 11: Purinerge Rezeptorexpression auf der Oberfläche nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren

A. P2Y1; B. P2Y12; C. P2X1

Gewaschene Thrombozyten wurden mit den angegebenen Aktivatoren stimuliert. Anschließend wurde die Rezeptordichte mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität, arbiträre Einheit); $n = 9$; $*p < 0,05$ (verglichen mit der unstimulierten Kontrolle).

Nach Stimulation mit den Aktivatoren EPI, SER und der Kombination aus beiden ergab sich in Bezug zur basalen Expression eine signifikante Erhöhung der Expression purinergere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Beim P2Y1-Rezeptor zeigte sich ausgehend vom basalen Wert von $50,5 \pm 0,8$ MFI eine Zunahme auf $62,3 \pm 1,3$ MFI bzw. auf $63,1 \pm 4,9$ MFI nach Stimulation mit $0,25 \mu\text{M}$ EPI bzw. $1,25 \mu\text{M}$ SER sowie auf $64,2 \pm 1,8$ MFI unter Kombination beider Aktivatoren. Für den P2Y12-Rezeptor ergaben sich für diese Induktoren analoge Anstiege von initial $35,2 \pm 0,6$ MFI auf $39,5 \pm 1,7$ MFI, auf $43,0 \pm 3,6$ MFI bzw. auf $49,7 \pm 3,3$ MFI. In gleicher Weise verhielt sich unter entsprechender Stimulation die P2X1-Rezeptorexpression mit einer Zunahme von basal $45,2 \pm 1,5$ % auf $53,7 \pm 2,8$ MFI, auf $57,8 \pm 3,1$ MFI bzw. auf $61,1 \pm 3,3$ MFI. Im Gegensatz hierzu löste die Stimulation mit ADP bei allen purinergen Rezeptoren eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression aus. Es ergaben sich für den P2Y1-, den P2Y12- und den P2X1-Rezeptor eine Abnahme auf $39,2 \pm 2,1$ MFI, auf $25,1 \pm 2,2$ MFI und auf $33,9 \pm 2,7$ MFI. Die Stimulation mit TRAP-6 wurde als „Positiv-Kontrolle“ mitgeführt, da dieser Induktor bekanntermaßen eine Erhöhung der purinergen Rezeptorexpression bewirkt. Es zeigten sich deutlich höhere Werte von $81,1 \pm 3,7$ MFI beim P2Y1-Rezeptor, von $68,5 \pm 4,4$ MFI beim P2Y12-Rezeptor und von $87,1 \pm 7,5$ MFI beim P2X1-Rezeptor.

3.2.2. Zytosolische Konzentration purinergere Rezeptoren nach Stimulation

Neben der Oberflächenexpression wurde auch der zytosolische Gehalt der purinergen Rezeptoren in gewaschenen Thrombozyten nach Stimulation mit $0,25 \mu\text{M}$ EPI, $1,25 \mu\text{M}$ SER, der Kombination aus EPI und SER, $10 \mu\text{M}$ ADP bzw. $10 \mu\text{M}$ TRAP-6 untersucht (Abbildung 12).

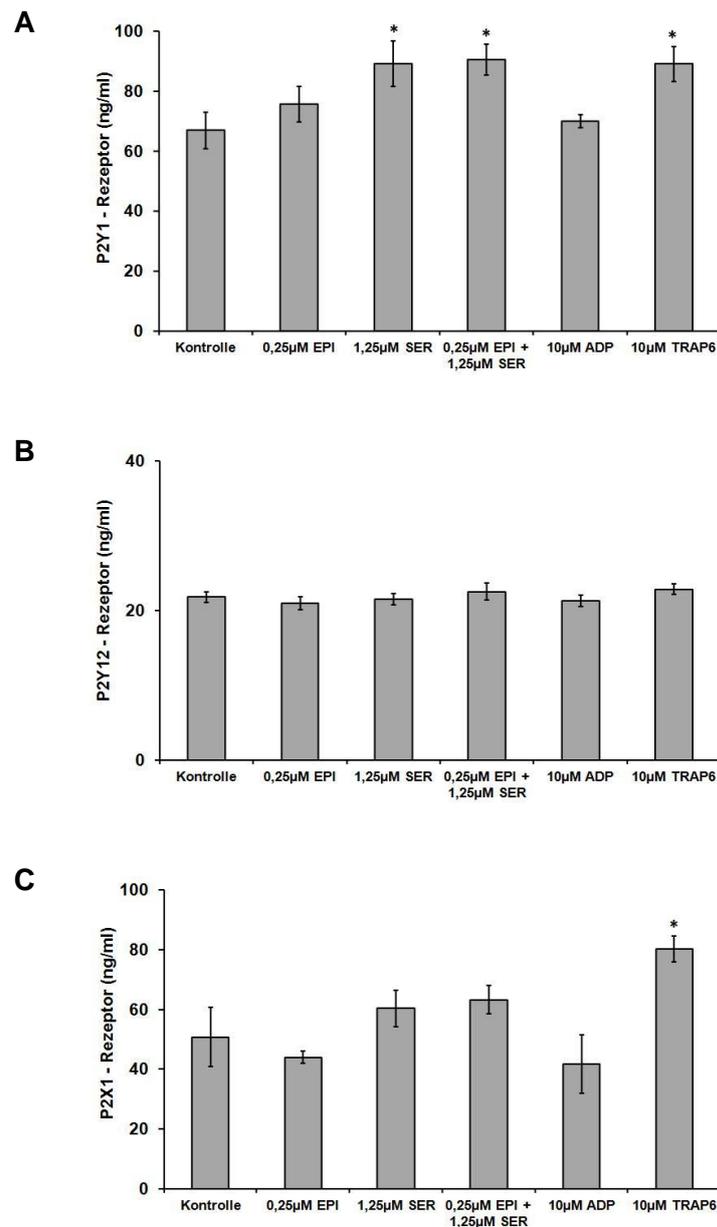


Abbildung 12: Purinerge Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren A. P2Y1; B. P2Y12; C. P2X1

Gewaschene Thrombozyten wurden mit 0,25 µM EPI, 1,25 µM SER, EPI und SER in Kombination, 10 µM ADP bzw. 10 µM TRAP-6 stimuliert. Anschließend wurden die Thrombozyten lysiert und die Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion mittels ELISA bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (in ng/ml Rezeptorprotein); n = 9; *p<0,05 (verglichen mit der unstimulierten Kontrolle).

Für den P2Y1 Rezeptor ergab sich ausgehend von basal $67,0 \pm 6,1$ ng/ml jeweils eine signifikante Zunahme der Konzentration auf $89,7 \pm 7,5$ ng/ml bzw. auf $90,7 \pm 5,2$ ng/ml nach Stimulation mit $1,25 \mu\text{M}$ SER und der Kombination aus EPI und SER. Dementgegen bewirkte EPI bzw. ADP nur eine geringe, aber nicht signifikante Erhöhung. Der basale Wert von $21,8 \pm 0,7$ ng/ml für den P2Y12-Rezeptor blieb unabhängig von der Art der Stimulation nahezu unverändert. Ausgehend von basal $50,7 \pm 9,9$ ng/ml beim P2X1-Rezeptor zeigte sich nach Stimulation mit SER bzw. der Kombination aus EPI und SER eine Tendenz zur Erhöhung. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Zugabe von EPI und ADP eher ein Abfall, wobei diese Schwankungen nicht signifikant waren. TRAP-6 bewirkte eine Zunahme der zytosolischen Konzentration beim P2Y1-Rezeptor auf $89,1 \pm 5,8$ ng/ml bzw. beim P2X1-Rezeptor auf $80,2 \pm 4,3$ ng/ml.

3.2.3. Vergleich der purinergen Rezeptorverteilung nach Stimulation

Zur Übersicht sind in Tabelle 9 die tendenziellen Veränderungen der Oberflächenexpression bzw. der zytosolischen Konzentrationen der purinergen Rezeptoren von frisch gewaschenen Thrombozyten schematisch wiedergegeben.

Tabelle 9: Vergleich der Rezeptorverteilung nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren (* $p < 0,05$: im Vergleich zum basalen Ausgangswert)

A. Oberflächenexpression

	P2Y1	P2Y12	P2X1
EPI	↑*	↑*	↑*
SER	↑*	↑*	↑*
EPI + SER	↑*	↑*	↑*
ADP	↓*	↓*	↓*

B. Zytosolische Konzentration

	P2Y1	P2Y12	P2X1
EPI	↑*	↔	↓
SER	↑*	↔	↑
EPI + SER	↑	↔	↑
ADP	↑*	↔	↓

3.3. Einfluss der Kurzzeitlagerung auf purinerge Rezeptoren

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Kurzzeitlagerung für 2 Stunden auf gewaschene Thrombozyten, die in CGS-Puffer und ohne Agitation aufbewahrt wurden, untersucht. Zu den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Präparation wurde die Oberflächenexpression und die zytosolische Konzentration purinerner Rezeptoren untersucht.

3.3.1. Oberflächenexpression purinerner Rezeptoren während der Kurzzeitlagerung

Für die Oberflächenexpression der purinergen Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 zeigten sich im Laufe der Kurzzeitlagerung über 30, 60, 90 und 120 Min. die nachfolgenden Ergebnisse (Abbildung 13).

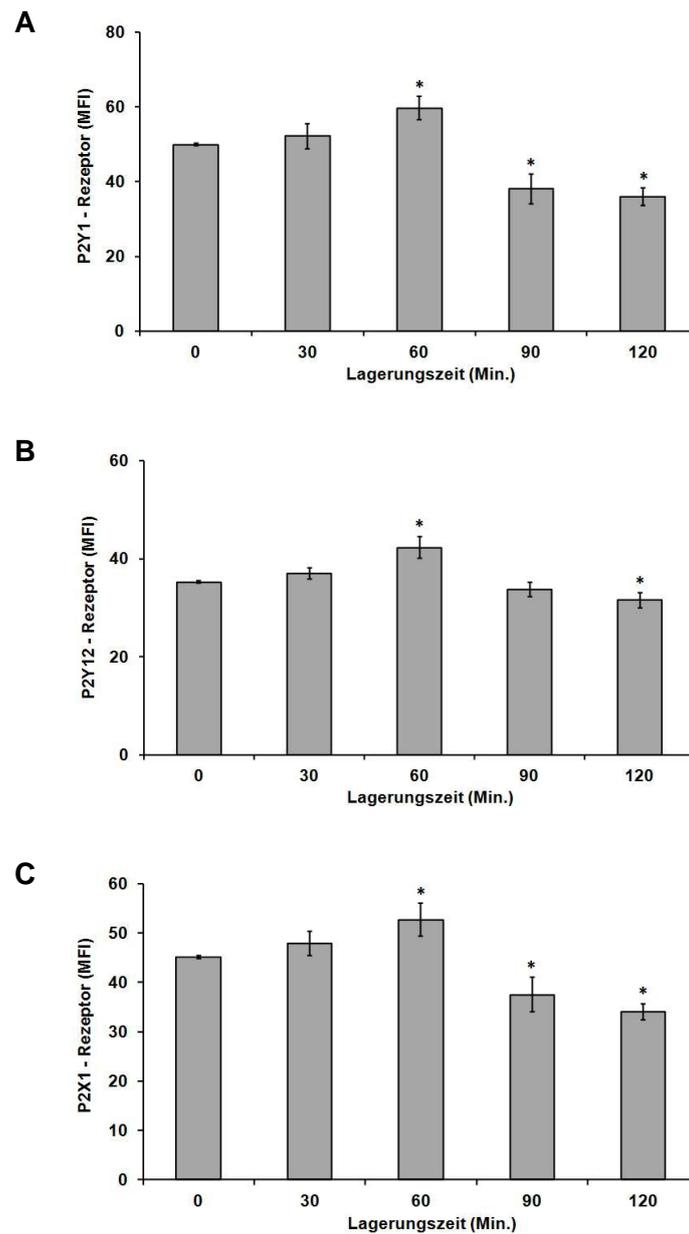


Abbildung 13: Purinerge Rezeptorexpression auf der Oberfläche während der Kurzzeitlagerung

A. P2Y1; B. P2Y12; C. P2X1

Gewaschene Thrombozyten wurden bei Raumtemperatur in CGS- Puffer und ohne Agitation unterschiedlich lange (0, 30, 60, 90, 120 Min.) gelagert. Anschließend wurde die Rezeptordichte mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität, arbiträre Einheit); $n = 9$; * $p < 0,05$ (verglichen mit 0 Min.).

Im Vergleich zur basalen Expression zeigte sich jeweils ähnlich für alle drei Rezeptoren innerhalb der ersten 60 Min. ein signifikanter Anstieg, gefolgt von einer Abnahme bis 120 Min. Lagerung. Die Expression betrug beim P2Y1-Rezeptor initial $49,9 \pm 0,3$ MFI, nach 60 Min. $59,7 \pm 3,1$ MFI und nach 120 Min. $36,0 \pm 2,4$ MFI. Beim P2Y12-Rezeptor lagen die Werte bei $35,3 \pm 0,2$ MFI, bei $42,3 \pm 2,2$ MFI nach 60 Min. und bei $31,6 \pm 1,6$ MFI nach 120 Min. Lagerung. Für den P2X1-Rezeptor waren Werte von initial $45,1 \pm 0,3$ MFI, von $52,7 \pm 3,3$ MFI nach 60 Min. und von $34,0 \pm 1,7$ MFI nach 120 Min. Lagerung nachweisbar.

3.3.2. Zytosolische Konzentration purinerger Rezeptoren während der Kurzzeitlagerung

Im Laufe der Kurzzeitlagerung über 30, 60, 90 und 120 Min. zeigten sich für die Konzentration der purinergeren Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 in der zytosolischen Fraktion nachfolgende Ergebnisse (Abbildung 14).

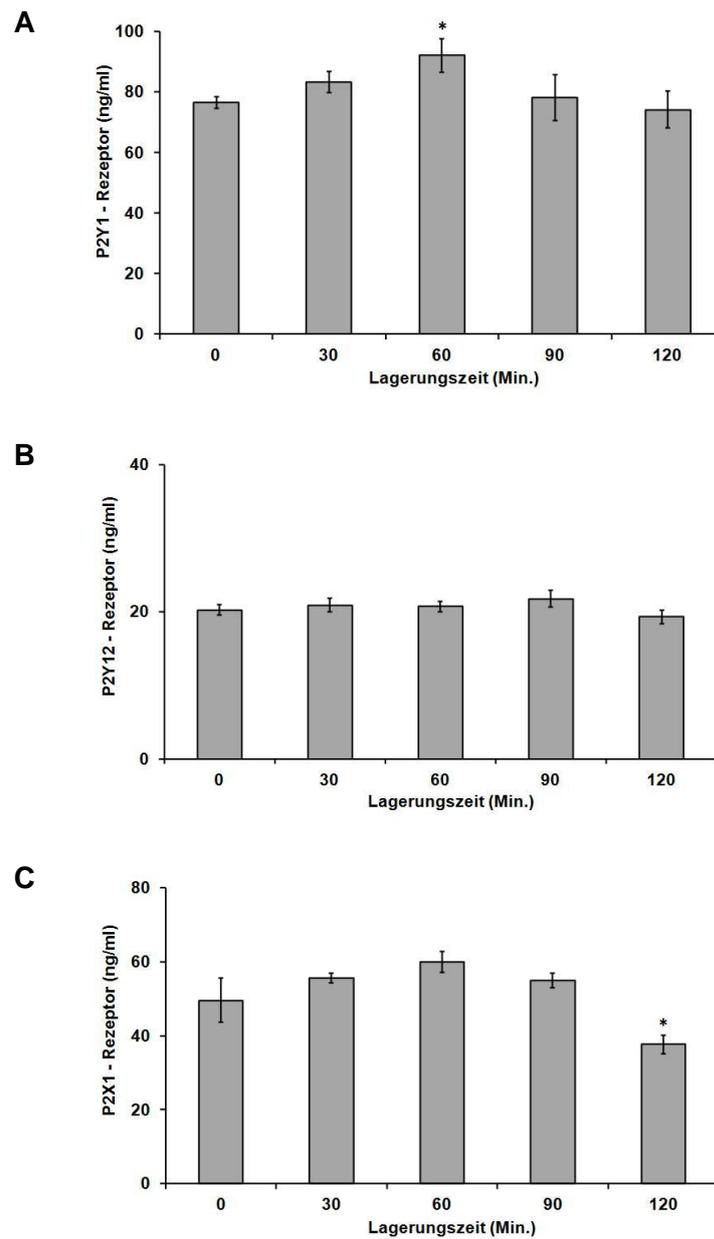


Abbildung 14: Purinerge Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion während der Kurzzeitlagerung
A. P2Y1; B. P2Y12; C. P2X1

Gewaschene Thrombozyten wurden bei Raumtemperatur in CGS-Puffer und ohne Agitation unterschiedlich lange (0, 30, 60, 90, 120 Min.) gelagert. Anschließend wurden die Thrombozyten lysiert und die Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion mittels ELISA-Methode bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (in ng/ml Rezeptorprotein); n = 9; *p < 0,05 (verglichen mit 0 Min.).

Die zytosolische Konzentration des P2Y1-Rezeptors stieg von initial $76,5 \pm 1,9$ ng/ml auf $92,0 \pm 5,5$ ng/ml nach 60 Min. an und sank wieder annähernd auf den Ausgangswert nach 120 Min. Lagerung ab. In ähnlicher Weise ergab sich beim P2X1-Rezeptor ausgehend von $49,6 \pm 6,0$ ng/ml ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Anstieg bis 60 Min., gefolgt von einem Absinken auf $37,7 \pm 2,5$ ng/ml nach 120 Min. Lagerung. Beim P2Y12-Rezeptor stellten sich im zeitlichen Verlauf dagegen keine wesentlichen Änderungen ein.

3.3.3. Vergleich der purinergen Rezeptorverteilung während der Kurzzeitlagerung

Ein Überblick über die Veränderungen der Oberflächenexpression und der zytosolischen Konzentration der purinergen Rezeptoren während der Lagerung von gewaschenen Thrombozyten über 120 Min. ist in der folgenden Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: Vergleich der Rezeptorverteilung während der Kurzzeitlagerung (* $p < 0,05$: im Vergleich zu 0 Min.)

A. Oberflächenexpression

	P2Y1	P2Y12	P2X1
30 Min.	↑	↑	↑
60 Min.	↑*	↑*	↑*
90 Min.	↓*	↓	↓*
120 Min.	↓*	↓*	↓*

B. Zytosolische Konzentration

	P2Y1	P2Y12	P2X1
30 Min.	↑	↔	↑
60 Min.	↑*	↔	↑
90 Min.	↑	↔	↑
120 Min.	↓	↔	↓*

4. Diskussion

Gewaschene Thrombozyten stellen ein bedeutendes Ausgangsmaterial in der Grundlagenforschung dar und werden z.B. in der kardiovaskulären oder pharmakologischen Forschung verwendet. Auch in der Transfusionsmedizin werden bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten Verfahren zur Plasmaentfernung bzw. -reduktion, z.B. als Voraussetzung von Pathogeninaktivierungsverfahren, eingesetzt [135, 143-146, 159]. Nach der Präparation gewaschener Thrombozyten tritt allerdings ein rascher Verlust der ADP-vermittelten Aggregationsfähigkeit auf, wie bereits in vielen Publikationen beschrieben sowie auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte [130, 132, 159-162]. Die Thrombozyten wurden dabei mit CGS-Puffer gewaschen und im Anschluss in HEPES-Puffer gelagert, eine Präparationsmethode, die häufig bei der Herstellung gewaschener Thrombozyten in der experimentellen Forschung Anwendung findet [127-129].

In den Versuchen zur Aggregationsfähigkeit von gewaschenen Thrombozyten unter Lagerung zeigte sich, dass sich nach initial gut erhaltener Aggregationsfähigkeit unter Induktion mit 10 μ M ADP bereits nach 30 Minuten Lagerung ein signifikanter Rückgang entwickelte, um nach 60 Minuten nochmals deutlich abzusinken. Zur Unterscheidung zwischen einem primären Funktionsverlust der ADP-Rezeptoren und einer Beeinträchtigung der Signalweiterleitung wurden Aggregationsversuche mit zusätzlicher Stimulation der entsprechenden Signalwege durch gleichzeitige Gabe weiterer Induktoren durchgeführt [57, 64, 112, 117, 163]. Hierzu wurden die Induktoren EPI und SER verwendet, die analog zu den beiden purinergen Rezeptoren P2Y₁₂ (wie G_i-gekoppelter α_{2A} -Rezeptor für EPI) und P2Y₁ (wie G_q-gekoppelter 5-HT_{2A}-Rezeptor für SER) über ihre jeweiligen Rezeptoren zur G-Protein-gekoppelten Aktivierung von Signalwegen führen. Die Induktoren wurden jeweils in Konzentrationen eingesetzt, die für sich alleine nicht in der Lage sind, eine Aggregation auszulösen.

Die Kostimulation führte im Verlauf zu allen Messzeitpunkten zu einer leichten, tendenziellen Verstärkung der ADP-vermittelten Aggregationsantwort gewaschener Thrombozyten. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die

den G_q-Protein bzw. G_i-Protein nachgeschaltete Signalweiterleitung zumindest noch teilweise funktionsfähig bleibt. Die Kombination aus den Induktoren EPI und SER - ohne gleichzeitige ADP-Induktion - bewirkte eine ähnliche Aggregationsantwort wie unter ADP-Stimulation und bestätigt diese Grundannahme. Im zeitlichen Verlauf kann die Kostimulation sowie auch die kombinierte Stimulation jedoch den progredienten Verlust der Aggregationsfähigkeit nicht vollständig kompensieren, sodass neben einer zunehmenden Störung der Signalweiterleitung auch ein sich ausbildender Defekt auf Ebene der purinergen Rezeptoren zur verminderten ADP-Reaktivität beitragen könnte.

In den weiterführenden Versuchen wurde daher die Expression der purinergen Rezeptoren P2Y₁, P2Y₁₂ und P2X₁ auf der thrombozytären Oberfläche und deren Konzentration im Zytosol gemessen. Die Bestimmungen können dabei Rückschlüsse zu Abbau beziehungsweise Internalisation der Rezeptoren oder aber auch zu möglichen Distributionsprozessen zwischen Thrombozytenmembran und zytosolischen Kompartimenten erlauben.

Die Abnahme der Oberflächenexpression von allen drei purinergen Rezeptoren bei frisch gewaschenen Thrombozyten um ca. 20 % nach Stimulation mit 10 µM ADP lässt sich am ehesten durch Internalisierungsprozesse erklären, die bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurden [164-167]. Dagegen führt die Stimulation mit EPI, SER und TRAP-6 zu einem Anstieg der Oberflächenexpression. Diese gegensätzliche Wirkung der Aktivatoren lässt vermuten, dass nach Kontakt des jeweiligen Induktors am Rezeptor im Inneren des Thrombozyten unterschiedliche Rückkopplungsmechanismen in Bezug zur Verteilung der purinergen Rezeptoren auf der thrombozytären Oberfläche ablaufen.

Die Erhöhung der Expression aller drei purinergen Rezeptoren durch Stimulation mit EPI, SER bzw. deren Kombination könnte auch ein Grund für den verstärkenden Effekt auf die ADP-induzierte Aggregation unter Kostimulation sein. Dabei könnte es eine Rolle spielen, dass EPI und SER schwache Induktoren sind und die Erhöhung der Dichte an Rezeptoren einem Versuch zur Signalverstärkung gleichkommt. Die Verminderung der Oberflächenexpression durch

ADP könnte demgegenüber einen Schutzmechanismus im Sinne einer Desensibilisierung darstellen, um durch Abschwächung autokriner, ADP-vermittelter Signale eine überschießende Stimulation und frühzeitige Sekretionsvorgänge zu verhindern [168, 169].

Eine Internalisation purinergere Rezeptoren wurde bereits für den P2Y₁-Rezeptor beschrieben, allerdings unter Stimulation mit höheren ADP-Konzentrationen. Membranständige Ektonukleotidasen können dabei in vivo diesen Prozess durch Elimination von ATP oder ADP verhindern [170]. Eine Internalisation mit anschließender Redistribution zur thrombozytären Oberfläche könnte den biologischen Zweck verfolgen, einen erhöhten Protein-Umsatz zu vermeiden und somit zu einem längeren Funktionserhalt von Thrombozyten beitragen. Die Vorstellung eines Transportes der purinergere Rezeptoren aus dem Zytosol an die Oberfläche der gewaschenen Thrombozyten nach Aktivierung lässt sich aufgrund der gleichgerichteten Bewegungen bei den zytosolischen Konzentrationen nicht ableiten. Eine Erhöhung der Oberflächenexpression purinergere Rezeptoren nach Stimulation über eine Rekrutierung aus den α -Granula und dem kanalikulären System dürfte daher wahrscheinlich sein. Anstelle ineinandergreifender Distributionsprozesse zwischen Oberflächenmembran und Zytosol findet vermutlich eine komplexe Regulation der Rezeptoren zwischen den verschiedenen membrangebundenen Kompartimenten statt, die offensichtlich von der Art des purinergere Rezeptors als auch vom Induktionsweg abhängig ist.

An dieser Stelle ist zu bedenken, dass in dieser Arbeit nur die Gesamtkonzentration der purinergere Rezeptoren in der zytosolischen Fraktion gemessen wurde und somit nicht alle thrombozytären Rezeptoren erfasst wurden, z.B. diejenigen in den kanalikulären Systemen sowie auch die in den Zellorganellen vorhandenen Rezeptoren [171-173]. Für solche weiterführenden Untersuchungen wären spezielle Auftrennungsverfahren mit komplexer Technik (z.B. Dichtegradientenzentrifugation) erforderlich, um einzelne Komponenten und Zellorganellen des Zytosols aufzutrennen und untersuchen zu können. Diese Methodik ist allerdings aufwändig und war für die aktuelle Studie nicht verfügbar.

Während der Lagerungsphase zeigt die Oberflächenexpression von allen drei purinergen Rezeptortypen einen biphasischen Verlauf, mit einem Anstieg in den ersten 60 Minuten und einem nachfolgendem Absinken bis 120 Minuten. Die initiale Erhöhung ähnelt der Reaktion von Thrombozyten auf eine submaximale Stimulation mit EPI und SER, vergleichbar mit einer Präaktivierung, wie sie auch bei Vollblut und PRP beschrieben wurde [64, 163]. Eine verstärkte Aggregationsfähigkeit geht damit allerdings nicht einher, sodass offenbar zusätzliche Phänomene auftreten, die die Rezeptorfunktionalität und Signalweiterleitung herabsetzen. Vermutlich durch im Verlauf einsetzende degenerative Effekte kann die anschließende Abnahme der drei purinergen Rezeptoren an der Membranoberfläche erklärt werden. Die gleichgerichtete Bewegung der Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion - mit Ausnahme des P2Y12-Rezeptors - lässt auch hier auf eine komplexe Regulation der Rezeptorexpression, z.B. durch Rekrutierung der Rezeptoren aus dem kanalikulären System an die Membranoberfläche, annehmen.

Zusammenfassend lassen sich für den zunehmenden Verlust der ADP-induzierten Aggregation in gewaschenen Thrombozyten somit nicht isolierte Veränderungen der Rezeptorexpression oder der Signalweiterleitung verantwortlich machen. Eine wichtige Ergänzung der hier präsentierten Analysen waren daher funktionelle Untersuchungen der purinergen Rezeptoren in gewaschenen Thrombozyten während der Lagerung, um Rückschlüsse von der Konzentration der ADP-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche sowie im Zytosol auf die Höhe der Aktivität ziehen zu können. Als wesentliche Ursache für die abnehmende ADP-Reaktivität konnte bereits in nachfolgenden - auf dieser Arbeit aufbauenden - Untersuchungen eine kontinuierlich sinkende P2Y1-Rezeptorfunktionalität mit beeinträchtigter Regulation der intrathrombozytären Kalziumfreisetzung nachgewiesen werden, während die P2Y12- und P2X1-Rezeptorfunktionen weitgehend erhalten bleiben [174].

Die vorgelegte Arbeit unterstreicht, dass der praktische Umgang mit präparierten gewaschenen Thrombozyten mit einem hohen logistischen Aufwand verbunden ist. Derzeit ist es noch erforderlich, dass eine rasche Weiterverarbeitung der Thrombozyten innerhalb von 30 Minuten für experimentelle Versuche gewährleistet wird, um relevante Funktionseinbußen der Thrombozyten und somit präanalytisch-bedingte Einflüsse zu vermeiden.

Die hier erhobenen Daten beziehen sich auf ein häufig eingesetztes Präparationsverfahren - CGS-Puffer für den Waschvorgang sowie HEPES-Puffer als Lagerungsmedium. Variationen von Pufferzusammensetzungen und des Lagerungsmilieus könnten zu einer besseren Erhaltung der Thrombozytenintegrität führen, sodass weitere Studien, die die Präparationsmethodik untersuchen, erforderlich sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse können dabei eine wichtige Vergleichsgrundlage darstellen. Es ergibt sich daher derzeit noch die Notwendigkeit, Thrombozytenkonzentrate mit einer gewissen Menge an Restplasma – in der Regel mit einem Anteil von 30-35 % - zu versetzen, um die Funktionalität der gelagerten Thrombozyten über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen aufrecht zu erhalten. Für die transfusionsmedizinische Versorgung wäre es allerdings ein großer Fortschritt, wenn Thrombozytenkonzentrate ohne Plasmazusatz hergestellt werden könnten, da Plasmaproteine für das Auftreten von allergischen Transfusionsreaktionen mitverantwortlich gemacht werden [135, 143-146, 159]. Zwar ist bekannt, dass ADP-abbauende Substanzen wie Ektonukleotidasen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Rezeptorfunktionalitäten und bei der Vermeidung der Rezeptordesensibilisierung spielen [162, 170]. Es ist jedoch weiterhin unverständlich, welche im Plasma befindlichen Substanzen unverzichtbar sind und welche gegebenenfalls ersetzt werden könnten, um eine adäquate *ex vivo*-Konservierung von gewaschenen Thrombozyten zu erreichen. Die Beimischung fraktioneller Plasmabestandteile in Lagerungsmedien von Thrombozyten könnte dabei ein Ansatz für weiterführende Studien sein.

5. Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit wurden molekulare sowie auch funktionelle Mechanismen untersucht, die zum bekannten Phänomen des raschen Verlustes der ADP-vermittelten Aggregationsfähigkeit gewaschener Thrombozyten führen. Die Funktion der den purinergen Rezeptoren nachgeschalteten Signalwege wird während der Lagerungszeit zunehmend beeinträchtigt, bleibt aber zumindest teilweise erhalten, wie anhand von Effekten durch Kostimulation mit den Induktoren EPI und SER gezeigt werden konnte. Die Distribution der Rezeptoren zwischen der Thrombozytenoberfläche und den intrazellulären Kompartimenten unterliegt komplexen Prozessen, die induktorabhängig reguliert sind. Eine initiale Zunahme der Expression von ADP-Rezeptoren während der Lagerung von gewaschenen Thrombozyten geht dabei nicht einher mit der Aufrechterhaltung der ADP-induzierten Aggregation. In der Schlussfolgerung ist die fortschreitende Degeneration der ADP-vermittelten Aggregation - neben einem Rückgang der Rezeptorexpression nach mehr als einer Stunde Lagerungszeit - vor allem auf einen funktionellen Verlust der purinergen Rezeptoren zurückzuführen. Zwischenzeitlich wurde bereits in nachfolgenden Arbeiten gezeigt, dass insbesondere eine Störung der P2Y1-Rezeptorfunktion und der assoziierten Kalziumregulation wesentlich zum Verlust der ADP-induzierten Aggregationsfähigkeit beiträgt.

6. Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriophosphat
AU	arbitrary unit
BSA	bovine serum albumin
Ca²⁺	Calcium
CaCl₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclic adenosin monophosphate
CD	cluster of differentiation
cGMP	cyclic guanosin monophosphate
CGS	sodium chloride, D-glucose, trisodium citrate
CH₂O	Formaldehyd
CH₃OH	Methanol
C₂H₅OH	Ethanol
C₆H₅Na₃O₇	Natriumcitrat
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerin
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTS	dense tubular system
EGTA	ethylen-glyco-tetraacetic-acid
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EP	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor
EPI	Epinephrin

FA	Formaldehyd
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forwardscatter
g	Erdschwere-/ Zentrifugalbeschleunigung
G	Gauge
GP	Glykoprotein
H₂O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic-acid
HMWKG	high molecular weight kininogen
HRP	horseradish peroxidase
5-HT_{2A}-R	5-Hydroxy-tryptamine-/ Serotonin-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Prostaglandin I ₂ -/Prostacyclin-Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
KCl	Kaliumchlorid
M	Molar
MFI	mean fluorescence intensity
MgCl₂ · 6H₂O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Min.	Minute

MI	Milliliter
MLCK	myosin ligth chain kinase
mM	Millimolar
MP	Myosinphosphatase
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
P1	Adenosin-Rezeptor
P2	Nukleotid-Rezeptor
P2Y1	Purinerge Rezeptor
P2Y12	Purinerge Rezeptor
P2X1	Purinerge Rezeptor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PGI	Prostaglandin
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PI-3-K	Phosphoinositid-3-kinase
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	room temperature
SCS	surface connected system

Sek.	Sekunden
SEM	standard error of the mean
SER	Serotonin
SSC	sidescatter
Std.	Stunden
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TP	Thromboxan-Rezeptor
TRAP-6	thrombine receptor activator for peptide 6
TxA₂	Thromboxan A ₂
VASP	vasodilatator-stimulated phosphoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
WP	washed platelets
α_{2A}	Adrenozeptor
β₂	Adrenozeptor
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

7. Literaturverzeichnis

1. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
2. Morgenstern, E., *Thrombozytenmorphologie*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 15 - 28.
3. Dengler, J.D., P., *Thrombozytäres System*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 30.
4. Greinacher, A., *Physiologie des Hämostasesystems*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 45 - 62.
5. Madlener, K.P., B., *Hämostasesystem*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 7 - 14.
6. Allen, R.D., et al., *Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy*. J Cell Biol, 1979. **83**(1): p. 126-42.
7. Möhle, R.K., H.G.; Kanz, I., *Thrombozytopoese*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 29 - 42.
8. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
9. Reininger, A.J., *Thrombusformation im Blutfluss*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 73 - 80.
10. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
11. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 98.
12. George, J.N., et al., *Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery*. J Clin Invest, 1986. **78**(2): p. 340-8.
13. George, J.N., et al., *Studies on platelet plasma membranes. I. Characterization of surface proteins of human platelets labeled with*

- diazotized (125i)-diiodosulfanilic acid. *J Lab Clin Med*, 1976. **88**(2): p. 232-46.
14. George, J.N., P.C. Lewis, and D.A. Sears, *Studies on platelet plasma membranes. II. Characterization of surface proteins of rabbit platelets in vitro and during circulation in vivo using diazotized (125i)-diiodosulfanilic acid as a label.* *J Lab Clin Med*, 1976. **88**(2): p. 247-60.
 15. George, J.N. and P.C. Lewis, *Studies on platelet plasma membranes. III. Membrane glycoprotein loss from circulating platelets in rabbits: inhibition by aspirin-dipyridamole and acceleration by thrombin.* *J Lab Clin Med*, 1978. **91**(2): p. 301-6.
 16. Offermanns, S., *Thrombozytäre Signaltransduktion*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 81 - 88.
 17. Brass, L.F., et al., *Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation.* *Adv Exp Med Biol*, 1993. **344**: p. 17-36.
 18. Brass, L.F., J.A. Hoxie, and D.R. Manning, *Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation.* *Thromb Haemost*, 1993. **70**(1): p. 217-23.
 19. Brass, L.F., et al., *Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond.* *Thromb Haemost*, 1997. **78**(1): p. 581-9.
 20. Offermanns, S., *The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation.* *Biol Chem*, 2000. **381**(5-6): p. 389-96.
 21. Murugappa, S. and S.P. Kunapuli, *The role of ADP receptors in platelet function.* *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1977-86.
 22. Quinton, T.M., et al., *Different G protein-coupled signaling pathways are involved in alpha granule release from human platelets.* *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(6): p. 978-84.
 23. Martinez-Pinna, J., et al., *Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other G α q-coupled receptors.* *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1490-8.
 24. Yang, X., et al., *Human platelet signaling defect characterized by impaired production of inositol-1,4,5-triphosphate and phosphatidic acid and diminished Pleckstrin phosphorylation: evidence for defective phospholipase C activation.* *Blood*, 1996. **88**(5): p. 1676-83.
 25. Payraastre, B., et al., *Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space.* *Cell Signal*, 2001. **13**(6): p. 377-87.

26. Hardy, A.R., et al., *P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3552-60.
27. Rink, T.J. and S.O. Sage, *Calcium signaling in human platelets*. Annu Rev Physiol, 1990. **52**: p. 431-49.
28. Juric, K.K., B.F., *Thrombozytensekretion*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 67 - 72.
29. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
30. Klages, B., et al., *Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 745-54.
31. Daniel, J.L., et al., *Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation*. Thromb Haemost, 1999. **82**(4): p. 1322-6.
32. Bennett, J.S., et al., *The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin alpha(IIb)beta(3) for fibrinogen*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25301-7.
33. Calderwood, D.A., S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg, *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22607-10.
34. Judge, H.M., et al., *Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 receptor antagonists yield additive inhibition of platelet aggregation, granule secretion, soluble CD40L release and procoagulant responses*. Platelets, 2005. **16**(7): p. 398-407.
35. Berny-Lang, M.A., et al., *P2Y12 receptor blockade augments glycoprotein IIb-IIIa antagonist inhibition of platelet activation, aggregation, and procoagulant activity*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(3): p. e000026.
36. Ozaki, Y., et al., *Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1745-51.
37. Andrews, R.K., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 357-64.
38. Baglia, F.A., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex mediates localization of factor XI to lipid rafts on the platelet membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21744-50.

39. Baglia, F.A., et al., *Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 1662-8.
40. Flaumenhaft, R., et al., *The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3879-87.
41. Ge, S., J.G. White, and C.L. Haynes, *Cytoskeletal F-actin, not the circumferential coil of microtubules, regulates platelet dense-body granule secretion*. Platelets, 2012. **23**(4): p. 259-63.
42. Harper, A.G., M.J. Mason, and S.O. Sage, *A key role for dense granule secretion in potentiation of the Ca²⁺ signal arising from store-operated calcium entry in human platelets*. Cell Calcium, 2009. **45**(5): p. 413-20.
43. Zhao, B., et al., *Influence of low density lipoproteins on cytosolic free Ca²⁺ concentration and dense tubular system in human platelets*. Thromb Res, 1993. **72**(1): p. 33-7.
44. Lages, B. and H.J. Weiss, *Secreted dense granule adenine nucleotides promote calcium influx and the maintenance of elevated cytosolic calcium levels in stimulated human platelets*. Thromb Haemost, 1999. **81**(2): p. 286-92.
45. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): p. 657-66.
46. Lopez, J.A., *The platelet glycoprotein Ib-IX complex*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5**(1): p. 97-119.
47. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
48. Buensuceso, C.S., et al., *Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 644-53.
49. Liao, Z., et al., *Interaction of kindlin-2 with integrin beta3 promotes outside-in signaling responses by the alphaVbeta3 vitronectin receptor*. Blood, 2015. **125**(12): p. 1995-2004.
50. Stalker, T.J., et al., *Platelet signaling*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 59-85.
51. Prevost, N., et al., *Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9820-5.

52. Andrews, N.C., M.D. Fleming, and J.E. Levy, *Molecular insights into mechanisms of iron transport*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(2): p. 61-4.
53. Shattil, S.J., *Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 318-25.
54. Knight, D.E., V. Niggli, and M.C. Scrutton, *Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca²⁺*. Eur J Biochem, 1984. **143**(2): p. 437-46.
55. Zhang, W. and R.W. Colman, *Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1475-82.
56. Langer, M.F.G., M., *Thrombozytenadhäsion und -aggregation*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 61 - 66.
57. Andrews, R.K., J.A. Lopez, and M.C. Berndt, *Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 91-105.
58. Shattil, S.J., M.H. Ginsberg, and J.S. Brugge, *Adhesive signaling in platelets*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 695-704.
59. Shattil, S.J. and J.S. Bennett, *Platelets and their membranes in hemostasis: physiology and pathophysiology*. Ann Intern Med, 1981. **94**(1): p. 108-18.
60. Woulfe, D., J. Yang, and L. Brass, *ADP and platelets: the end of the beginning*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1503-5.
61. 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.
62. 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.
63. Storey, R.F., et al., *The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity*. Br J Haematol, 2000. **110**(4): p. 925-34.
64. Li, N., et al., *Effects of serotonin on platelet activation in whole blood*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1997. **8**(8): p. 517-23.

65. Vanags, D.M., et al., *Potentialiation of ADP-induced aggregation in human platelet-rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(4): p. 917-23.
66. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
67. Geiger, J., et al., *Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(3): p. 1031-5.
68. Wang, G.R., et al., *Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 4888-93.
69. Steffel, J.L., Th.F., *Endothelzellen*, in *Hämostaseologie*, B.M. Pötzsch, K., Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 97 - 104.
70. Cavallini, L., et al., *Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5545-51.
71. Geiger, J., C. Nolte, and U. Walter, *Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors*. Am J Physiol, 1994. **267**(1 Pt 1): p. C236-44.
72. Walsh, M.T., J.F. Foley, and B.T. Kinsella, *The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for prostacyclin-mediated desensitization*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20412-23.
73. Michelson, A.D., et al., *Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1640-8.
74. Rynningen, A., B. Olav Jensen, and H. Holmsen, *Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1394**(2-3): p. 235-48.
75. Waldmann, R., M. Nieberding, and U. Walter, *Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases*. Eur J Biochem, 1987. **167**(3): p. 441-8.
76. 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.

77. Halbrugge, M. and U. Walter, *Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets*. Eur J Biochem, 1989. **185**(1): p. 41-50.
78. Harbeck, B., et al., *Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30817-25.
79. 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.
80. Eigenthaler, M., et al., *Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. **135**: p. 173-209.
81. Schwarz, U.R., U. Walter, and M. Eigenthaler, *Taming platelets with cyclic nucleotides*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(9): p. 1153-61.
82. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
83. Fredholm, B.B., et al., *Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(3): p. 79-82.
84. North, R.A. and E.A. Barnard, *Nucleotide receptors*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(3): p. 346-57.
85. Mills, D.C., *ADP receptors on platelets*. Thromb Haemost, 1996. **76**(6): p. 835-56.
86. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
87. Kunapuli, S.P., et al., *Platelet purinergic receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(2): p. 175-80.
88. Kunapuli, S.P., *Functional characterization of platelet ADP receptors*. Platelets, 1998. **9**(6): p. 343-51.
89. Ayyanathan, K., S.L. Naylor, and S.P. Kunapuli, *Structural characterization and fine chromosomal mapping of the human P2Y1 purinergic receptor gene (P2RY1)*. Somat Cell Mol Genet, 1996. **22**(5): p. 419-24.
90. Leon, C., et al., *The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells*. FEBS Lett, 1997. **403**(1): p. 26-30.

91. Mangin, P., et al., *The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented.* J Thromb Haemost, 2004. **2**(6): p. 969-77.
92. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 277-300.
93. Palmer, R.K., et al., *Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor.* Mol Pharmacol, 1998. **54**(6): p. 1118-23.
94. Hollopeter, G., et al., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs.* Nature, 2001. **409**(6817): p. 202-7.
95. Cattaneo, M., et al., *Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1978-83.
96. Herbert, J.M. and P. Savi, *P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel.* Semin Vasc Med, 2003. **3**(2): p. 113-22.
97. Bennett, J.S., *Novel platelet inhibitors.* Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 161-84.
98. Savi, P. and J.M. Herbert, *Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis.* Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(2): p. 174-83.
99. Coukell, A.J. and A. Markham, *Clopidogrel.* Drugs, 1997. **54**(5): p. 745-50; discussion 751.
100. Savi, P., et al., *Clopidogrel: a review of its mechanism of action.* Platelets, 1998. **9**(3-4): p. 251-5.
101. Mills, D.C., et al., *Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase.* Arterioscler Thromb, 1992. **12**(4): p. 430-6.
102. McTavish, D., D. Faulds, and K.L. Goa, *Ticlopidine. An updated review of its pharmacology and therapeutic use in platelet-dependent disorders.* Drugs, 1990. **40**(2): p. 238-59.
103. JJ, V.A.N.G., et al., *Ticagrelor binds to human P2Y(12) independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(9): p. 1556-65.
104. Hoffmann, K., et al., *Competitive mode and site of interaction of ticagrelor at the human platelet P2Y12 -receptor.* J Thromb Haemost, 2014. **12**(11): p. 1898-905.

105. Valera, S., et al., *A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP*. Nature, 1994. **371**(6497): p. 516-9.
106. Valera, S., et al., *Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder*. Receptors Channels, 1995. **3**(4): p. 283-9.
107. Scase, T.J., et al., *Identification of a P2X1 purinoceptor expressed on human platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **242**(3): p. 525-8.
108. Clifford, E.E., et al., *The P2X1 receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3172-81.
109. Sun, B., et al., *P2X1 purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11544-7.
110. Vial, C., et al., *A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(2): p. 363-72.
111. Vial, C., et al., *Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X1 receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3646-51.
112. Kunapuli, S.P., *P2 receptors and platelet activation*. ScientificWorldJournal, 2002. **2**: p. 424-33.
113. Fabre, J.E., et al., *Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1199-202.
114. Leon, C., et al., *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1731-7.
115. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel*. Br J Haematol, 1998. **103**(3): p. 858-66.
116. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation*. Blood, 1998. **92**(1): p. 152-9.
117. 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.

118. Savi, P., et al., *Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation*. FEBS Lett, 1998. **422**(3): p. 291-5.
119. Offermanns, S., et al., *Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 183-6.
120. Foster, C.J., et al., *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1591-8.
121. Fox, S.C., M.W. Behan, and S. Heptinstall, *Inhibition of ADP-induced intracellular Ca²⁺ responses and platelet aggregation by the P2Y12 receptor antagonists AR-C69931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E1*. Cell Calcium, 2004. **35**(1): p. 39-46.
122. de Stoppelaar, S.F., C. van 't Veer, and T. van der Poll, *The role of platelets in sepsis*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 666-77.
123. Duerschmied, D., C. Bode, and I. Ahrens, *Immune functions of platelets*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 678-91.
124. Li, Z., et al., *Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis*. Thromb Res, 2011. **127**(3): p. 184-8.
125. Linden, M.D. and D.E. Jackson, *Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(11): p. 1762-6.
126. Semple, J.W., *Platelets play a direct role in sepsis-associated endothelial cell death*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 249.
127. McCabe, W.M.J., L.K., *Platelet protocols: Research and clinical laboratory procedures*. San Diego California: Academic press a division of Harcourt Brace and company, 1999: p. 92101-4495.
128. Dong, J.F.M., J.L.; Nolasco, L.; Bernardo, A.; Arceneaux, W.; Shrimpton, C.N.; Shade, A.J.; McIntire, L.V.; Fujikawa, K.; Lopez, J.A., *Adamts-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions*. Blood, 2002. **100**: p. 4033-4039.
129. Shou, L.M.Z., Q.Y.; Li, W.; Xie, X.; Chen, K.; Lian, L.; Li, Z.Y.; Gong, F.R.; Dai, K.S.; Mao, Y.X.; Tao, M., *Cantharidin and norcantharidin inhibit the ability of mcf-7 cells to adhere to platelets via protein kinase c pathway-dependent downregulation of alpha2 integrin*. Oncology reports, 2013. **30**: p. 1059-1066.

130. Walsh, P.N., D.C. Mills, and J.G. White, *Metabolism and function of human platelets washed by albumin density gradient separation*. Br J Haematol, 1977. **36**(2): p. 287-96.
131. Gresele, P.P.F., C.P.; Vermeylen, V., *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Pathophysiology, pharmacology and therapeutics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2002.
132. Pineda, A.A., et al., *Viability and functional integrity of washed platelets*. Transfusion, 1989. **29**(6): p. 524-7.
133. Andreu, G., et al., *[Introduction of platelet additive solutions in transfusion practice. Advantages, disadvantages and benefit for patients]*. Transfus Clin Biol, 2007. **14**(1): p. 100-6.
134. Alhumaidan, H. and J. Sweeney, *Current status of additive solutions for platelets*. J Clin Apher, 2012. **27**(2): p. 93-8.
135. Radwanski, K., et al., *In vitro variables of apheresis platelets are stably maintained for 7 days with 5% residual plasma in a glucose and bicarbonate salt solution, PAS-5*. Transfusion, 2012. **52**(1): p. 188-94.
136. Yanagisawa, R., et al., *Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients*. Transfusion, 2013. **53**(9): p. 2053-60.
137. Gravemann, U., et al., *In vitro variables of buffy coat-derived platelet concentrates with residual plasma of down to 10% are stably maintained in new-generation platelet additive solutions*. Transfusion, 2015. **55**(7): p. 1700-9.
138. Caspari, G.G., W.H., *Durch Blut übertragbare Infektionskrankheiten*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 529 - 574.
139. Kiefel, V., *Immunreaktionen gegen Thrombozyten*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 91 - 98.
140. Kiefel, V., *Nichtinfektiöse unerwünschte Wirkungen*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 511 - 528.
141. Kiefel, V.S., S., *Alloantigene von Thrombozyten*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 177 - 188.

142. Sachs, J.H.B., J., *Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 223 - 244.
143. Heddle, N.M., et al., *A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions*. *Transfusion*, 1993. **33**(10): p. 794-7.
144. Vo, T.D., et al., *Platelet washing to prevent recurrent febrile reactions to leucocyte-reduced transfusions*. *Transfus Med*, 2001. **11**(1): p. 45-7.
145. Geiger, T.L. and S.C. Howard, *Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: good prophylaxis or bad practice?* *Transfus Med Rev*, 2007. **21**(1): p. 1-12.
146. Azuma, H., et al., *Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol)*. *Transfusion*, 2009. **49**(2): p. 214-8.
147. Koerner, K., et al., *In vitro platelet function during storage in three different additive solutions*. *Vox Sang*, 1994. **67**(2): p. 154-9.
148. Seheult, J.N., D.J. Triulzi, and M.H. Yazer, *I am the 9%: Making the case for whole-blood platelets*. *Transfus Med*, 2016. **26**(3): p. 177-85.
149. Abe, Y., et al., *Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2005. **11**(3): p. 263-70.
150. Rapi, S., et al., *Reticulocytes and reticulated platelets: simultaneous measurement in whole blood by flow cytometry*. *Clin Chem Lab Med*, 1998. **36**(4): p. 211-4.
151. Born, G.V. and M.J. Cross, *Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood*. *Nature*, 1963. **197**: p. 974-6.
152. Fritsche, O., *Licht misst Konzentrationen*, in *Physik für Biologen und Mediziner*, O. Fritsche, Editor. 2013, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 100.
153. Hallbach, J., *Klinische Chemie für den Einstieg*. Vol. 1. 2001, Stuttgart, New York: Thieme.
154. W, D. and G. W, *Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium*. 1973, Google Patents.

155. Fox, C.H., et al., *A method for measuring intracellular free magnesium concentration in platelets using flow cytometry*. *Magnes Res*, 2007. **20**(3): p. 200-7.
156. Ramstrom, A.S., I.H. Fagerberg, and T.L. Lindahl, *A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets*. *Platelets*, 1999. **10**(2-3): p. 153-8.
157. Schütt, C.B., B., *Grundwissen Immunologie*. Vol. 2. 2009, Heidelberg: Spektrum.
158. Kiefel, V.S., S., *Nachweis von thrombozytären Antigenen und Antikörpern*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, V. Kiefel, Editor. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 591 - 596.
159. Keuren, J.F., et al., *Platelet ADP response deteriorates in synthetic storage media*. *Transfusion*, 2006. **46**(2): p. 204-12.
160. McShine, R.L., et al., *The Use of Fresh Plasma and a Plasma-free Medium to Enhance the Aggregation Response of Stored Platelets*. *Platelets*, 1993. **4**(6): p. 338-40.
161. Shapira, S., et al., *The effect of storage on the expression of platelet membrane phosphatidylserine and the subsequent impact on the coagulant function of stored platelets*. *Transfusion*, 2000. **40**(10): p. 1257-63.
162. van der Meer, P.F., *Platelet additive solutions: a future perspective*. *Transfus Clin Biol*, 2007. **14**(6): p. 522-5.
163. Vanags, D.M., et al., *ADP, adrenaline and serotonin stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate production in human platelets*. *Eur J Pharmacol*, 1998. **358**(1): p. 93-100.
164. Baurand, A., et al., *Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties?* *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(3): p. 721-33.
165. Dutton, J.L., et al., *P2X(1) receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras*. *Neuropharmacology*, 2000. **39**(11): p. 2054-66.
166. Mundell, S.J., et al., *Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(8): p. 1393-404.
167. Ennion, S.J. and R.J. Evans, *Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens*. *FEBS Lett*, 2001. **489**(2-3): p. 154-8.

168. Hallam, T.J., et al., *Control and interrelation of aggregation and secretion; the roles of Ca²⁺, diacylglycerol and thromboxane with particular reference to ADP stimulation*. Adv Exp Med Biol, 1985. **192**: p. 145-62.
169. Ziu, E., et al., *Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(5): p. 1112-21.
170. 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.
171. Nurden, P., et al., *Immunolocalization of P2Y1 and TPalpha receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of alpha - granules and the open canalicular system*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1400-8.
172. Haberstock-Debic, H., et al., *A clopidogrel-insensitive inducible pool of P2Y12 receptors contributes to thrombus formation: inhibition by elinogrel, a direct-acting, reversible P2Y12 antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **339**(1): p. 54-61.
173. Pulcinelli, F.M., et al., *Fibrinogen binding is independent of an increase in intracellular calcium concentration in thrombin degranulated platelets*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 304-8.
174. Koessler, J., et al., *Role of Purinergic Receptor Expression and Function for Reduced Responsiveness to Adenosine Diphosphate in Washed Human Platelets*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147370.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Morphologie eines humanen Thrombozyten.....	3
Abbildung 2:	Mechanismen der Signaltransduktion in Thrombozyten	10
Abbildung 3:	Schichtbildung in einer zentrifugierten Blutprobe.....	22
Abbildung 4:	Lichttransmission im Aggregometer vor und nach Zugabe von Thrombozytenaktivatoren.....	24
Abbildung 5:	Detektionsprinzip im Durchflusszytometer	27
Abbildung 6:	Funktionsprinzip eines ELISA	33
Abbildung 7:	ADP-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung.....	39
Abbildung 8:	ADP mit EPI-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung	40
Abbildung 9:	ADP mit SER-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung	42
Abbildung 10:	EPI mit SER-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten unter Kurzzeitlagerung	43
Abbildung 11:	Purinerge Rezeptorexpression auf der Oberfläche nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren.	46
Abbildung 12:	Purinerge Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren... ..	48
Abbildung 13:	Purinerge Rezeptorexpression auf der Oberfläche während der Kurzzeitlagerung.....	51
Abbildung 14:	Purinerge Rezeptorkonzentration in der zytosolischen Fraktion während der Kurzzeitlagerung.	53

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten	4
Tabelle 2:	Intrazelluläre Effekte der wichtigsten G-Proteine	4
Tabelle 3:	Glykoproteine von Thrombozyten	5
Tabelle 4:	Inhaltsstoffe thrombozytärer Speichergranula	6
Tabelle 5:	Konzentration der verwendeten Induktoren	25
Tabelle 6:	Pipettierschema - Expression von purinergen Rezeptoren unter Kurzzeitlagerung.....	29
Tabelle 7:	Pipettierschema – Expression von purinergen Rezeptoren nach Stimulation	31
Tabelle 8:	Vergleich der maximalen Aggregation (in %) nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren zu bestimmten Zeitpunkten der Kurzzeitlagerung	44
Tabelle 9:	Vergleich der Rezeptorverteilung nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren.....	49
Tabelle 10:	Vergleich der Rezeptorverteilung während der Kurzzeitlagerung.....	54

Danksagung

"Du mußt es wagen!" ist der Titel eines Buches, welches mir meine Mutter in meiner Jugendzeit zum Geburtstag schenkte, nachdem ich damals den Wunsch äußerte, einmal Ärztin werden zu wollen. Dieses Buch erzählt die Lebensgeschichte von Hermine Heusler-Edenhuizen, eine der ersten Frauenärztinnen in Deutschland, die ihren Weg trotz schwieriger Umstände ging und ihr Ziel dabei nie aus den Augen verlor. Diese Biographie beeindruckte mich damals sehr, denn auf meinem Weg zur Ärztin, der ebenfalls nicht immer geradlinig war, rief ich mir das Zitat auf dem Buchdeckel immer wieder in Erinnerung. Gerade auch bei der Entscheidung, eine Doktorarbeit zu beginnen, war mir dieses als Anstoß hilfreich.

Eine Doktorarbeit schreibt sich jedoch nicht von alleine und viele Leute haben auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen beigetragen. Ihnen möchte ich hier nun danken:

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Transfusionsmedizin und Klinische Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Böck. Die Begeisterung, mit der er sein Fachgebiet in den Vorlesungen präsentierte, vereinfachte mir die Entscheidung, in der Transfusionsmedizin zu promovieren. Ihm gehört der Dank für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie der finanziellen Mittel, mit denen der experimentelle Teil dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

Frau Dr. Anna Kobsar möchte ich danken für ihre geduldige und freundliche Art, mit der sie mir die Grundlagen vermittelte und mich in das Thema der Doktorarbeit einführte. Zudem brachte sie mir die notwendigen Labortechniken bei und war bei der anschließenden statistischen Auswertung behilflich. Darüber hinaus bestärkte sie mich immer wieder, wenn Versuche gelegentlich nicht wie erwartet liefen.

Bei Dr. Jürgen Kößler möchte ich mich für die hervorragende Betreuung vor allem während des Schreibprozesses bedanken. Seine thematischen und wis-

senschaftlichen Hinweise in persönlichen Gesprächen und in regem E-Mail-Verkehr brachten die Doktorarbeit schließlich in ihre endgültige Form.

Für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Transfusionsmedizin und Klinische Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg, insbesondere den Mitarbeitern des Blutspende-Bereiches, die oft die Blutabnahmen übernahmen, und den Mitarbeitern des HLA-Labors, die mir die Benutzung des FACS-Gerätes ermöglichten.

Ein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums begleiteten. Sie unterstützten mich auf jede nur erdenkliche Art und Weise und haben damit sicher einen großen Anteil daran, dass ich in meinem Leben so weit gekommen bin. Herzlichen Dank auch an Burkard, der mich stets motivierte durchzuhalten und mir so durch die mühsamsten Zeiten half.

Zuletzt auch ein Dank an Rosa Theresia Knoll für meine medizinischen Wurzeln!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Stephanie Hermann

Geburtsdatum 19.03.1985
Geburtsort Esslingen am Neckar

Berufserfahrung

10/2008 Medizinisch- Technische Laboratoriumsassistentin
im Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
02/2011 - 10/2015 Medizinisch- Technische Laboratoriumsassistentin
beim Blutspendedienst des Bayerischen Roten
Kreuzes, Würzburg
04/2016 - 03/2019 Assistenzärztin in der Inneren Medizin der Klinik
Kitzinger Land, Kitzingen

Fortbildungen

12/2016 ACLS-Provider-Kurs, Würzburg
03/2017 Grundkurs Ultraschall nach DEGUM, Erlangen
09/2017 ICU-Beginner-Kurs/ Internistische Intensivmedizin,
Tübingen
06/2018 Psychosomatische Grundversorgung, Bad Wöris-
hofen

Veröffentlichungen

01/2016 Koessler, J. et al.; Role of purinergic receptor ex-
pression and function for reduced responsiveness to
adenosine diphosphate in washed human platelet;
PLOS ONE, 2016, 11(1): p. e0147370

Studium

11/2008 - 12/2015 Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
1. Staatsexamen 03/2011
2. Staatsexamen 10/2014
3. Staatsexamen 12/2015

10/2013 - 03/2019 Doktorarbeit am Institut für klinische Transfusions-
medizin und Hämotherapie der Universität Würzburg
- "Adenosindiphosphat-vermittelte Funktion und Ex-
pression von purinergen Rezeptoren in gewasche-
nen humanen Thrombozyten"

Praktisches Jahr

11/2014 - 03/2015 Innere Medizin in der Missionsärztlichen Klinik,
Würzburg
03/2015 - 06/2015 Chirurgie in der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
06/2015 - 10/2015 Pädiatrie im Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt

Famulaturen

09 - 10/2011 Orthopädie im König-Ludwig-Haus, Würzburg
02 - 03/2012 Innere Medizin in der Missionsärztlichen Klinik,
Würzburg
08 - 09/2012 Allgemeinmedizin in der Hausarztpraxis Dr.Schauber
und Dr.Hirtl, Veitshöchheim
02 - 03/2013 Pädiatrie in der Kinderarztpraxis Dr.Lieb, Würzburg

Berufliche Ausbildung

10/2005 - 09/2008 Medizinisch Technische Akademie Esslingen
Abschluss:
Medizinisch- Technische Laboratoriumsassistentin
06/2007 - 02/2008 Praktika im Rahmen der Ausbildung im Bereich Mik-
robiologie und Serologie (Labor Enders, Stuttgart
und Esslingen), im Bereich Histologie (Karl-Olga-
Krankenhaus, Stuttgart) und in den Bereichen Häma-
tologie und Klinische Chemie (Robert-Bosch-
Krankenhaus, Stuttgart)

Schulische Ausbildung

09/1996 - 07/2005 Schelztor- Gymnasium Esslingen

Kürnach, den 19.03.2019

