

# **Einfluss bakterieller Toxine auf die Aktivierung und *de novo* Proteinsynthese in humanen Thrombozyten**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl. Pharm.

Sebastian Schubert

geboren am 28.01.1981 in Wippra/Harz

Gutachter

1. Prof. Dr. med. M. Buerke
2. Prof. Dr. rer. nat. A. Langner
3. Prof. Dr. rer. nat. G. Blaschke

Halle (Saale), 07.05.2009

Mephisto zu Faust (Faust I, Studierzimmer II)

von J.W. von Goethe

„...Blut ein ganz besonderer Saft...“

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha\beta$	Integrin Klassifizierung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
DIC	dissiminated intravasculare coagulation
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
4 E- BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
eIF-4E	eukaryotic initiation factor 4 E
FACS	fluorescence activated cell sorting= Durchflusszytometrie
FITC	fluoresceine isothiocyanate
GP	Glykoprotein
HAS	humanes Serum Albumin
IC <sub>50</sub>	50%ige Hemmkonzentration
ICAM	intercellular adhesion molecule
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL-	Interleukin
IPG	Immobilized pH Gradient
LRR	Leucinreiche Rezeptoren
LTB <sub>4</sub>	Leuktrien B <sub>4</sub>
M	Molar
MG	Molekulargewicht
MODS	multi organ disfunction syndrom
m-RNA	messenger ribonucleic acid
m-TOR	mamalian target of rapamycin
nanoLC/ESI-MS/MS	nano liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry
PAF	Platelet activating factor
PAR	Protease activated receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PLC <sub><math>\gamma</math></sub>	Phospholipase C gamma
PLEK	Pleckstrin (platelet and leukocyte C kinase substrate)
PKC	Protein kinase C
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SOD	Superoxid Dismutase
TLR	Toll-like Rezeptor
TF	Tissue factor
TNF $\alpha$	Tumor necrose factor alpha
t-RNA	transfer ribonucleic acid
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
vWF	von Willebrand Faktor

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1	Sepsis .....	7
1.2	Thrombozyten.....	9
1.2.1	Morphologie .....	9
1.2.2	Funktion der Thrombozyten.....	11
1.3	Thrombozytäre Rezeptorproteine.....	13
1.3.1	Leuzinreiche Glykoproteine .....	13
1.3.1.1	Toll-Like Rezeptoren .....	13
1.3.1.2	von Willebrand Faktor .....	14
1.3.2	Integrine .....	15
1.3.2.1	Kollagenrezeptor .....	15
1.3.2.2	Fibrinogenrezeptor .....	17
1.3.2.3	Lamininrezeptor .....	21
1.3.3	Thrombinrezeptoren.....	21
1.4	Proteinsynthese in Thrombozyten .....	25
1.5	Möglichkeiten der Inhibition der Proteinsynthese.....	27
1.6	B-cell Lymphoma 3 (Bcl-3).....	31
1.7	Bakterielle Toxine.....	31
1.7.1	Lipopolysaccharid .....	31
1.7.2	Staphylococcus aureus $\alpha$ - Toxin.....	32
1.8	Fragestellung dieser Arbeit.....	35
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
2.1	Material.....	36
2.1.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial .....	36
2.1.1.1	Laborgeräte .....	36
2.1.1.2	Plastikware .....	37
2.1.1.3	Glasware .....	37
2.1.2	Chemikalien .....	37
2.2	Methoden .....	39
2.2.1	Thrombozyten-Isolierung .....	39
2.2.2	Adhäsions Experiment.....	40
2.2.2.1	Adhäsion an Kollagen .....	41
2.2.2.2	Adhäsion an Fibrinogen .....	41
2.2.2.3	Adhäsion an Laminin.....	42
2.2.3	Proteinexpression in Thrombozyten .....	42
2.2.3.1	Proteinextraktion .....	43
2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Popov .....	43
2.2.4	Prinzipien des Western Blot.....	44
2.2.4.1	Prinzipien der Elektrophorese.....	44
2.2.4.2	Transfer aus SDS- Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidendifluorid-Membran...	46
2.2.4.3	Proteinfärbung mit Ponceau S .....	47
2.2.4.4	Immunologischer Nachweis des Bcl-3 Proteins.....	47
2.2.4.5	Prinzipien der 2D-Gel-Elektrophorese .....	48
2.2.4.6	2D Western Blot Analysen mit phosphosensitiven Antikörpern.....	55
2.2.4.7	Identifikation einzelner Proteine mittels Massenspektrometrie .....	55
2.2.5	FACS Analysen.....	58
2.2.6	Thrombozytenaggregationsmessung .....	60
2.2.7	RNA Extraktion .....	61

2.2.8	Reverse Transkription (RT) .....	62
2.2.9	PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	62
2.2.10	Agarosegel-Elektrophorese .....	64
2.2.11	Clot Retraction .....	65
2.2.12	Fluoreszenz Mikroskopie (Immunzytochemie) .....	66
2.2.13	Statistische Auswertung .....	66
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Thrombozytenaktivierung .....</b>	<b>67</b>
3.1.1	Staphylococcus aureus $\alpha$ -Toxin induzierte Aggregation .....	67
3.1.2	Inhibierung, der durch $\alpha$ -Toxin induzierten Aggregation .....	68
<b>3.2</b>	<b>Adhäsionsexperimente.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3</b>	<b>Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors .....</b>	<b>72</b>
<b>3.4</b>	<b>RNA Nachweis .....</b>	<b>75</b>
<b>3.5</b>	<b>Proteinexpression .....</b>	<b>76</b>
3.5.1	Bcl-3 Expression in Thrombozyten stimuliert mit LPS.....	76
3.5.1.1	Effekt der Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen.....	76
3.5.1.2	Proteinexpression in Thrombozytensuspension .....	77
3.5.1.3	Adhäsion humaner Thrombozyten an Kollagen.....	78
3.5.1.4	Adhäsion von Thrombozyten an Laminin.....	80
3.5.2	Bcl-3 Proteinexpression in $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten .....	81
3.5.2.1	Proteinexpression in Thrombozytensuspension .....	81
3.5.2.2	Adhäsion an Fibrinogen .....	82
3.5.2.3	Adhäsion an Kollagen .....	84
3.5.2.4	Adhäsion an Laminin.....	85
3.5.3	Inhibierung der Proteinexpression .....	86
3.5.4	Beeinflussung der <i>Clot-Retraction</i> .....	89
<b>3.6</b>	<b>Mikroskopische Aufnahmen der <math>\alpha</math>- Toxin Wirkung .....</b>	<b>90</b>
<b>3.7</b>	<b>Mikroskopische Aufnahmen von LPS stimulierten Thrombozyten .....</b>	<b>93</b>
<b>3.8</b>	<b>Massenspektrometrische Auswertung der 2D Proteomanalyse.....</b>	<b>96</b>
3.8.1	Effekte der Stimulation mit bakteriellen Toxinen auf die Proteinexpression.....	100
3.8.2	Änderung im Phosphorylierungsmuster Toxin stimulierter Thrombozyten.....	101
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Thrombozytenaktivierung .....</b>	<b>106</b>
<b>4.2</b>	<b>Proteinexpression Toxin stimulierter Thrombozyten am Beispiel des Bcl-3. ....</b>	<b>108</b>
4.2.1	Reduktion durch Translationsinhibitoren .....	109
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung und Regulation thrombozytärer Proteine .....</b>	<b>111</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>135</b>

# 1 Einleitung

Schon seit Jahrtausenden sieht die Menschheit sich Krankheiten ausgesetzt, die durch Mikroorganismen ausgelöst werden. Diese mikrobiellen Infektionen führen häufig zu schweren Krankheitsverläufen und können die Lebenserwartung stark reduzieren. Andererseits besiedeln viele Bakterien den menschlichen Körper wie z.B. die Mundhöhle, den oberen Respirationstrakt und die Haut. Diese kommensalen Bakterien lösen jedoch keine schweren Krankheiten aus. Die Anwesenheit der Bakterien auf oder in diesen Organen stellt für den Körper keine Infektion dar, denn der Nasen- und Mundbereich, der Respirationstrakt und Urogenitaltrakt sind mit der „Außenwelt“ verbunden und somit von der sterilen „Innenwelt“ getrennt. Pathogene als auch kommensale Mikroorganismen können eine Immunantwort auslösen, wenn sie oder ihre Bestandteile die Grenze zwischen der Außen- und Innenwelt überschreiten. Dies wird im Allgemeinen als Sepsis bezeichnet. Bakterielle endovaskuläre Infektionen wie die Endokarditis, die suppurative Thrombophlebitis und andere eitrige Infektionen stellen aufgrund der resultierenden Bakteriämie, Sepsis und metastasierenden Erregerabsiedlung eine schwerwiegende Verlaufsform bakterieller Infektion dar.

Zu Sepsis induzierenden bakteriellen Toxinen zählen neben den Endotoxinen, wie das Lipopolysaccharid (LPS). Auch die Exotoxine zum Beispiel, das Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Toxin. Das von Staphylococcus aureus produzierte Exotoxin  $\alpha$ -Toxin beschreibt sich durch seine hämolytischen, zytotoxischen, dermonekrotischen und letalen Eigenschaften [1].

Als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien ist das Lipopolysaccharid ein sehr verbreitetes Endotoxin weiterhin ist es ein Prototyp in der Aktivierung des Immunsystems, das schon in sehr geringen Konzentrationen von 1nM wirkt. Dem LPS wird eine Schlüsselrolle beim septischen Schock zugesprochen.

Sepsis sowie Endokarditis sind gekennzeichnet durch veränderte Thrombozytenfunktion, welche meist direkt oder indirekt auf Interaktion mit den eingedrungenen Bakterien zurück zu führen sind. Solche Interaktionen beschreiben sich durch Bindung von Bakterien und Thrombozyten. Diese können sowohl direkt über bakterielle Oberflächenproteine als auch indirekt durch Bindung über Plasmaproteine geschehen, doch führen solche Interaktionen meist zu einer Plättchenaktivierung und damit zu einer Thrombusbildung. So kann gleichsam ein Thrombus auf Herzklappen zur Herzinsuffizienz oder zur Ausbildung von septischen Embolien beitragen. Bleibt diese Aktivierung der Thrombozyten durch Bakterien bzw. deren Produkten nicht lokal begrenzt, sondern weitete sich auf den ganzen Körper aus, kann das zu einer Thrombozytopenie [2] und damit zu einer gefährlichen Abnahme der Thrombozytenzahl oder sogar zu einer Disseminated Intravasculare Coagulation (DIC) [3] führen.

In dieser Arbeit soll der Einfluss, bakterieller Toxine wie LPS und  $\alpha$ -Toxin auf die Blutplättchen analysiert werden. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Toxin induzierte Thrombozyten Aktivierung, Adhäsion und daraus resultierende Proteinsynthese gelegt werden. Zu diesem Zweck werden Western Blot, Proteom Analysen sowie durchflusszytometrische Untersuchungen und fluoreszenz mikroskopische Analysen durchgeführt.

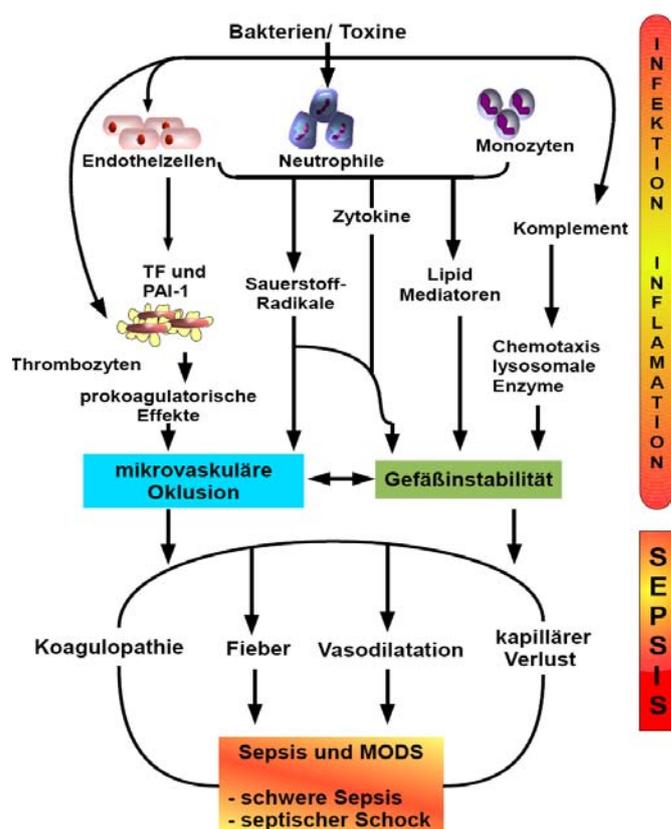
## 1.1 Sepsis

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“; so die Definition von Schottmüller 1914 [4].

Die Begriffsbildung der Sepsis unterliegt jedoch einem ständigen Wandel. Eine weitere Definition besagt: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Erreger und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“ Diese Erklärung stützt sich auf die fünf Grundpfeiler des schweren septischen Krankheitsprozesses: Die *septische Infektionsquelle* als Ausgangspunkt, die *Invasion* von Mikroorganismen, die *Freisetzung* ihrer Bestandteile oder Toxine, die *Ausschüttung von Mediatoren*, *Zellfunktionsstörungen* und morphologische Destruktion von Zellmembranen sowie Zellstrukturen als Grundlage der Organschädigung und die Multiorganinsuffizienz, als deren klinischer Ausdruck das Multiorganversagen [5, 6]. Die oben genannte Aussage bezieht sich auf die von der Consensus Conference des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) 1992 festgelegte Definition der Sepsis.

Heute wird die Sepsis wie folgt definiert: eine Sepsis liegt dann vor, wenn zusätzlich zu einem SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom) ein mikrobiologischer Nachweis der Infektion vorliegt (Bakteriämie). SIRS ist definiert durch Vorliegen mindestens zwei der folgenden Symptome, wie eine nicht regulierte Körpertemperatur, welche sich zum einen in einer Hypothermie (Körpertemperatur  $< 36^{\circ}\text{C}$ ) oder Fieber (Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$ ) äußern kann. Weitere Symptome wären Tachykardie (Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ), Tachypnoe Atemfrequenz  $> 20$  oder Hyperventilation, im Differentialblutbild werden vermehrt unreife neutrophile Granulozyten nachgewiesen sowie Leukozytosen oder Leukopenien beobachtet. Wird zu einer Sepsis noch eine akute Organdysfunktion

nachgewiesen, spricht man von einer schweren Sepsis. Diese Form der Sepsis kann sich zu einem septischen Schock entwickeln und damit zu einem lebensbedrohlichen Kreislauf-, Herz- und Multiorganversagen führen. All diese Definitionen beschreiben die Sepsis als einen Vorgang, bei dem Bakterien, bakterielle Toxine, Pilze oder Protozoen die körpereigenen Schutzmechanismen überwinden und in die Blutbahn gelangen. Die Fremdkörper zirkulieren im Blut und aktivieren Makrophagen. Die aktivierten Makrophagen sezernieren eine Reihe von Mediatoren. Zu ihnen gehören Zytokine, wie die Interleukine IL-1, IL-6, IL-12 oder Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), Chemokine, Plättchen Aktivierender Faktor (PAF) Prostaglandin, Leukotrien, Thromboxan, Tissue Faktor (TF) aber auch Superoxid- und hydroxiradikale sowie Stickstoffmonoxid NO [7, 8]. Viele dieser Substanzen haben mehrere Zielzellen und regulieren unterschiedliche Mechanismen. Die Stickoxide z.B. haben einerseits antimikrobielle Eigenschaften und beeinflussen andererseits die Gefäßspannung und die Makrophagen-Apoptose. Die Zytokine aktivieren Neutrophile, Lymphozyten und die Gefäßendothelzellen, außerdem wird die Präsentation zellulärer Adhäsionsmoleküle durch sie reguliert. Chemokine aktivieren die Immunsystemzellen und das extrinsische Gerinnungssystem wird durch TF, PAF und Thromboxan aktiviert. Die daraus resultierende Thrombozyten-Aktivierung führt zu einer Thrombusbildung, gefolgt von einem Gefäßverschluss. Dies führt dann gepaart mit einer schlechten myokardialen Kontraktion zu einer Hypooxygenierung der betroffenen Gewebe und damit zum Absterben und Organversagen (siehe schematische Darstellung Abbildung 1-1).

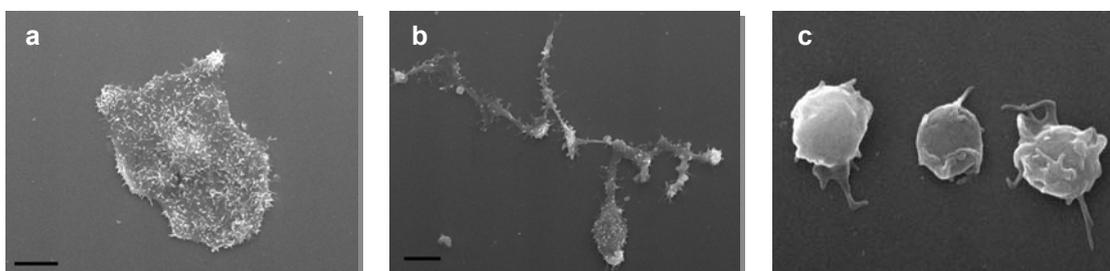


**Abbildung 1-1: Ausbildung einer Sepsis und des MODS [8]:** Bakterien oder Toxine aktivieren unterschiedliche Zelltypen. Über verschiedene Kaskaden bildet sich so eine Sepsis und/oder ein Organversagen (MODS) aus.

## 1.2 Thrombozyten

### 1.2.1 Morphologie

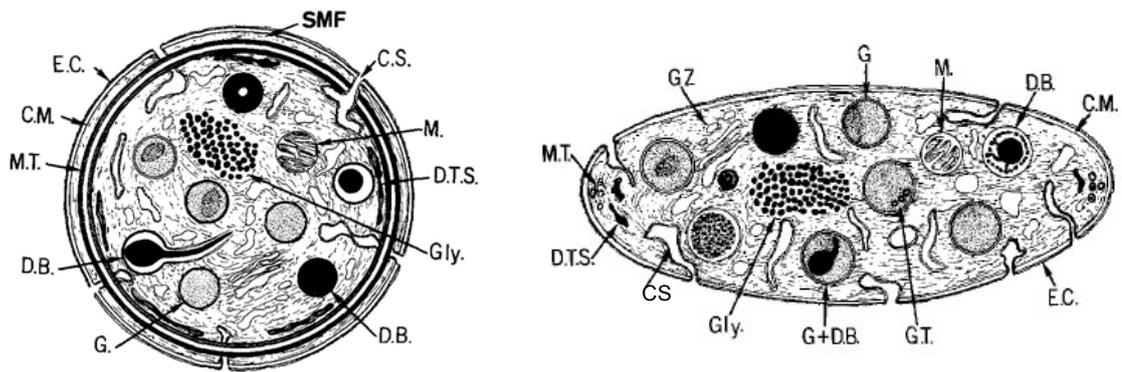
Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kernlose Zellen mit einem Durchmesser von 2-4µm, die aus den Megakaryozyten [9] durch Abschnürung im Knochenmark entstehen (Abbildung 1-2). Ihre Überlebenszeit beträgt ca. zehn Tage, bis sie dann im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut werden. Etwa ein Drittel der Thrombozyten wird in der Milz gespeichert und steht so für den Austausch mit im Blut zirkulierenden Plättchen zur Verfügung [10]. Im ruhenden Zustand zeigen Plättchen eine diskoide Struktur auf, ihre Anzahl im humanen Blut schwankt zwischen 140.000 bis 360.000 Thrombozyten/µl. Man kann die Thrombozyten in vier morphologische Bereiche gliedern:



**Abbildung 1-2: Entstehung der Thrombozyten (c) aus den Megakaryozyten (a) durch Einschnürung des Zelleibes über die Prothrombozyten (b) [11].**

Die *periphere Zone* besteht aus der Zellmembran, die extrazellulär mit einer dünnen Schicht belegt ist der Glykokalyx, in welcher die Glykoproteine (siehe Abschn. 1.3) integriert sind. Der nächste Bereich wird *strukturelle Zone* genannt und besteht aus submembranös gelegenen *Mikrotrubuli* (MT), umgeben von einem Netzwerk anderer Strukturproteine (vergleiche Abbildung 1-3).

Im Zytoplasma befindet sich die *Zone der Organellen*, bestehend aus *Mitochondrien* (M), *Glykogenspeichern* (Gly) und den Granula (G). Die Granula sind charakteristisch für Plättchen und dienen als Speicherort für Proteine sowie essentielle Substanzen für die Plättchenfunktion. Es werden drei Formen der Granula unterschieden: die *dichten Granula* (DB) (*dense bodies*), diese werden aufgrund ihrer hohen optischen Dichte so bezeichnet. Sie enthalten niedermolekulare Substanzen und Botenstoffe, wie ADP, ATP,  $Ca^{2+}$  und Serotonin, die den Aggregationsprozess fördern. Die am häufigsten vorhandenen Granula sind die *α-Granula* (40-80 Stück pro Thrombozyt). Sie beinhalten zahlreiche Proteine, die verschiedenste biologische Funktionen beeinflussen. In ihnen befinden sich Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, von Willebrand Faktor, P-Selektine und Thrombospondin, des Weiteren Zytokine und Wachstumsfaktoren. *Lysosomen* (*λ-Granula*) [12] stellen die letzte Gruppe an Granula dar. (siehe auch Tabelle 1)



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung eines Thrombozyten [13]:** EC= äußere Hülle, CM= Zellmembran, SMF= Membranfilamente, CS= kanikuläres System, MT= Mikrotubuli, Gly= Glykogen, M= Mitochondrien, G= Granula, DB= *dense bodies*, DTS= *dense tubuläre System*, GZ= Golgi Apparat

Die vierte morphologische Zone ist das *Membransystem*. Einstülpungen der Plasmamembran in das Plättcheninnere bilden das offene Kanalsystem (CS), welches bei Aktivierung der Plättchen zur Pseudopodienbildung nach außen gestülpt wird (*shape change*). Das dichte tubuläre System ist einer der Hauptspeicherorte für freie  $Ca^{2+}$ -Ionen, welche die zentrale Rolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der Thrombozyten-Aktivierung spielen. Überschreitet die zyttoplasmatische freie  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration einen Schwellenwert, erfährt der Thrombozyt eine Formveränderung mit der Ausbildung von Pseudopodien.

Plättchen gehören zu den kernlosen Zellen. Genetische Informationen können daher nicht in Form von DNA gespeichert werden. Vielmehr zeigte sich in den letzten Jahren, dass die Thrombozyten m-RNA und ein vollständiges Spliceosom [11, 14] enthalten, welches ihnen ermöglicht, die genetische Information, die in der RNA gespeichert ist, zu verarbeiten und in entsprechende Proteine zu translatieren. Plättchen enthalten 12500mal weniger m-RNA als die Leukozyten. Die Plättchen RNA stammt aus den Megakaryozyten und wird während der Thrombopoese auf die Thrombozyten verteilt. Umso erstaunlicher scheint es, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung diese m-RNA in Proteine umschreiben [15]. Sie können damit auf Umwelteinflüsse reagieren und aktiv in Prozesse eingreifen.

Dichte Granula ( $\delta$ -Granula)	$\alpha$ -Granula	Lysosom ( $\lambda$ -Granula)
ADP	Enzyme	Kathepsin
ATP	$\alpha_1$ -Antitrypsin	Kollagenase
Serotonin	$\alpha_2$ - Makroglobulin	Elastase
Phosphat	$\alpha_2$ - Antiplasmin	N-Acetylglukosamidase
Guaninnukleotid	C <sub>1</sub> -Esterase Inhibitor	$\alpha$ - Arabinoside

	β- Galaktosidase
<b>adhäsive Proteine</b>	β- Glukuronisidase
Fibrinogen	
Fibronektin	
von- Willebrand-Faktor	
Thrombospondin	
Vitronektin	
Glykoprotein IIb/IIIa	
<b>Wachstumsfaktoren</b>	
Platelet-derived growth factor	
Transforming growth factor β	
Epidermal growth factor	
Endothelial cell growth factor	
zytokinähnliche Proteine	
Interleukin 1 (?)	
CD40- Ligand (?)	
Plättchenfaktor 4	
β- Globulin	
<b>Koagulationsfaktor</b>	
Plasminogen	
PAI-1	
Faktor V	
Faktor XI	
Protein S	
HMWK	

**Tabelle 1** Inhaltstoffe der thrombozytären Speichergranula: ?= noch nicht eindeutig nachgewiesen [16].

### 1.2.2 Funktion der Thrombozyten

Die Funktion der Thrombozyten besteht darin, sich an der freigelegten subendothelialer Matrix anzulagern, dadurch die Gefäßwandläsion zu verschließen und den Blutverlust zu stoppen. Dieser Vorgang, der auch als Hämostase bezeichnet wird, verläuft in drei Phasen: der Plättchenadhäsion, -aktivierung, und -aggregation.

Die *Adhäsion*, der noch ruhenden Thrombozyten, an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt in der Primärhämostase. In Folge der Anlagerung kommt es zum *shape change* und zur Sekretion der Granulainhalte, dies führt zur Aktivierung weiterer im Blut zirkulierender Thrombozyten und endet in der Aggregation der Thrombozyten. Durch die Bildung eines Verschlusspfropfens kommt es zum Gefäßwandverschluss.

Gerät dieser Prozess außer Kontrolle bilden sich Verschlußthromben in Gefäßen und können eine Minderversorgung der nachgeschalteten Gewebe nach sich ziehen. Als Folge daraus können sich Krankheitsbilder wie Schlaganfall und Herzinfarkt entwickeln.

Die Adhäsion an die Gefäßwand wird über die Interaktion spezifischer Plättchenglykoproteine mit der subendothelialen Matrix vermittelt. Die Blutplättchen binden dabei an Proteine, wie dem Glykoprotein Ib-V-IX (von Willebrand Faktor), Kollagen, Fibronectin oder Laminin sowie auf dem freigelegten Subendothel immobilisierten Fibrinogen über das Glykoprotein IIb/IIIa (siehe 1.3.2.2). Bei einer ersten Kontaktphase binden die Thrombozyten an den von Willebrand Faktor (vWF), gefolgt von einer Stabilisierung über weitere Adhäsionsrezeptoren, die der Gruppe der Integrine zugeordnet werden können. Die Anbindung der Thrombozyten an diese Proteine über spezielle Plättchenrezeptoren führt zur Aktivierung der Thrombozyten (*outside in signaling*).

Doch können Plättchen auch ohne Gefäßwandverletzung durch physiologische Agonisten wie z.B. Thrombin eine Serinprotease, ADP und Serotonin oder durch hohen mechanischen Scherstress aktiviert werden. Binden die Agonisten an den jeweiligen Rezeptor, so lösen sie eine Reaktionskette aus, die zu einer Formveränderung *shape change* führt. Diese Strukturveränderung äußert sich im Übergang der diskoiden Form in eine sphärische Form. Dabei breiten sich die Plättchen aus und gleichzeitig werden durch Membranausstülpungen des offenen kanikulären Systems Pseudopodien gebildet. Durch Veränderung der Zytoskelettproteine werden die  $\alpha$ -Granula und densebodies zentralisiert; im Rahmen von Exozytosevorgängen verschmelzen die Granulamembran und die Zellmembran. Als Folge kommt es zur Sekretion der Granulainhaltstoffe, die ihrerseits wieder als Agonisten für die Plättchenaktivierung und – aggregation dienen (*inside-out signaling*), was einen sich selbst verstärkenden Prozess darstellt.

Bei diesem Vorgang der Membranverschmelzung werden Glykoproteine, wie das P-Selektin (CD-62), der  $\alpha$ - Granulamembran und das Granulophysin (CD-63) der *dense-bodies*, an die Thrombozytenoberfläche gebracht. In Folge der Aktivierung werden nicht nur Glykoproteine auf der Zellmembran präsentiert, sondern auch vorhandene Glykoproteine funktionalisiert. So kommt es zur Konformitätsänderung des für die Aggregation essentiellen Glykoproteines IIb/IIIa. Dieses ist dann in der Lage lösliches Fibrinogen zu binden, welches als Brückenmolekül mehrere Plättchen mit einander verbinden kann. Die lokale Anhäufung mehrerer GP IIb/IIIa- Komplexe führt des Weiteren zu einer Plättchenbindung untereinander und damit zur Aggregatbildung.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Plättchen nicht nur auf chemische Signale antworten und als Folge der Aktivierung aggregieren. Sie können

vielmehr durch *de novo* Synthese von Proteinen aktiv in Prozesse der Hämostase und Inflammation eingreifen. Die genetische Information zur Synthese der Proteine stammt aus der m-RNA, die die Zelle auf ihrem Entwicklungsprozess aus den Megakaryozyten erhalten (siehe 1.2.1). Mit Hilfe der m-RNA und des voll funktionsfähigen Translationapparates können Thrombozyten auf chemische Reize reagieren. Dabei können nicht nur die in ihren Granula gespeicherten Proteine sezerniert, sondern können vielmehr auch spezifische Proteine neu synthetisiert, sezerniert bzw. exprimiert werden [14, 17, 18].

### **1.3 Thrombozytäre Rezeptorproteine**

#### **1.3.1 Leuzinreiche Glykoproteine**

Unter Glycoproteinen versteht man Membranproteine, die zusätzlich verzweigte Heteroglykanreste tragen. Thrombozyten besitzen zwei Membranglykoproteinkomplexe, welche sich durch ihren Reichtum an Leucin auszeichnen (LRR).

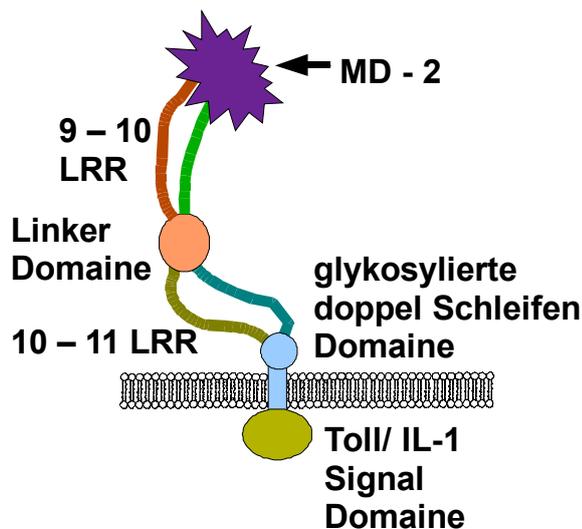
Das Glykoprotein-Ib-V-IX bildet den Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor und spielt eine zentrale Rolle in der Primärhämostase. Die Hauptaufgabe des GPIb-V-IX ist die Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an den in Kollagenfibrillen immobilisierten von Willebrand Faktor (vWF) auch entgegen hoher Scherkräfte.

##### **1.3.1.1 Toll-Like Rezeptoren**

Toll-like Rezeptoren (TLRs) bilden eine Klasse von LRR Proteinen, die auf allen Zellen exprimiert werden. Von den auf Thrombozyten exprimierten Toll-like Rezeptoren TLR 1, TLR 4, TLR 6 [19, 20] und TLR 9 ist der TLR 4 der wichtigste Typ I transmembranäre Rezeptor.

Der TLR 4 besteht aus 9 und 11 leuzinreichen Regionen, die durch eine Linker Domäne verbunden sind. Die zytoplasmatische Region besteht aus einer Toll/Interleukin 1 Domäne. Durch Bindungen von Liganden an den TLRs werden Signalkaskaden aktiviert, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Immunantworten führen.

Das Endotoxin LPS (siehe 1.4.1) bindet an TLR 4 der Thrombozyten und erhöht die Adhäsion der Plättchen an Fibrinogen. Für diese Reaktion wird noch ein weiteres Molekül: das MD-2 benötigt. MD-2 ist ein 20-30 kDa großes Glykoprotein, welches an der extrazellulären Domäne des TLR 4 bindet und dessen Signalaktivierung verstärkt (siehe Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4: Modell des Toll-like Rezeptor 4/MD-2 Komplexes:** Der TLR 4 besteht aus zwei leucinreichen Ketten (LRR) mit neun bis elf leucinreichen Wiederholungen, die über eine Linkerdomäne verbunden sind. Die zytoplasmatische Region besteht aus einer Toll/ Interleukin 1 Signal Domäne. Das MD-2 Protein ist am N-terminalen Ende des TL-Rezeptors gebunden.

### 1.3.1.2 von Willebrand Faktor

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein in den Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisiertes Glykoprotein, welches Multimere mit 50-100 Untereinheiten ausbilden kann. Nach Aktivierung der Thrombozyten, wird es dort aus den  $\alpha$ -Granula während der Thrombogenese sezerniert [21]. Im Endothel existieren zwei unterschiedliche Quellen der Freisetzung. Im akuten Entzündungsgeschehen kann sowohl freier vWF nach der Spaltung des großen Multimeres in den Blutstrom sezerniert werden, oder auch in der subendothelialen Matrix exprimiert vorliegen. Die Freisetzung und Expression auf der Zelloberfläche von vWF erfolgt innerhalb weniger Minuten durch Exozytose aus den Weibel- Palade- Körpern nach Kontakt mit Entzündungsmediatoren wie z.B. Thrombin, Histamin, Leukotrien, sowie nach Auftreten von spezifischen hydrodynamischen Scherkräften. Als multifunktionaler Adhäsionsligand ist der vWF in der Lage verschiedene Proteinsorten zu binden.

Der vWF vermittelt zum einen die Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an geschädigten Gefäßwänden durch spezielle Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran.

Zum anderen hat er als Trägerprotein für den Faktor VIII eine Funktion in der plasmatischen Gerinnung. Im Falle der Gewebstraumatisierung und Schädigung des Endothels durch prothrombotische oder proinflammatorische Stimuli, was auch auf die Sepsis zutrifft, ist vWF nach seiner Expressierung auf Thrombozyten und Endothel in der Lage, mit verschiedenen Liganden eine Bindung einzugehen.

Hierbei sind unter anderem drei unterschiedliche Liganden von Bedeutung, die in einem Zwei-Schritt-Modell die Thrombozytenadhäsion an vWF vermitteln. Dies wäre auf der einen Seite der Komplex aus Glykoprotein Ib-IX-V auf Thrombozyten, der für die Adhäsion der Thrombozyten an vWF des Endothels hauptverantwortlich ist. Das Glykoprotein Ib-IX-V ist der einzige Ligand, der auch auf unaktivierten Thrombozyten eine Affinität zu vWF aufweist. Auf der anderen Seite wird der Komplex aus Glykoprotein IIb-IIIa, auch als Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Komplex (siehe 1.3.2.2) bezeichnet, der bei unaktivierten Thrombozyten nicht in der Lage ist, eine Bindung mit vWF einzugehen und erst in eine aktivierte Form übergehen muss. Ist dies der Fall, wird die Bindung durch GP Ib-IX-V verstärkt. Als weitere Liganden könnten ebenso verschieden Kollagentypen der extrazellulären Matrix dienen.

In aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vWF neben der Thrombozytenadhäsion, aufgrund einer spezifischen Tripeptid- Sequenz aus Leucin- Leucin- Glycin, eine Rolle in der durch  $\beta_2$ - Integrine vermittelten Leukozytenadhäsion übernimmt. Dieselbe Sequenz wird von ICAM-1, dem interzellulären Adhäsionsmolekül für Leukozyten exprimiert. Es scheint demnach, dass der vWF auch eine aktive Rolle in der Initialen Phase des akuten Entzündungsgeschehens trägt.

### 1.3.2 Integrine

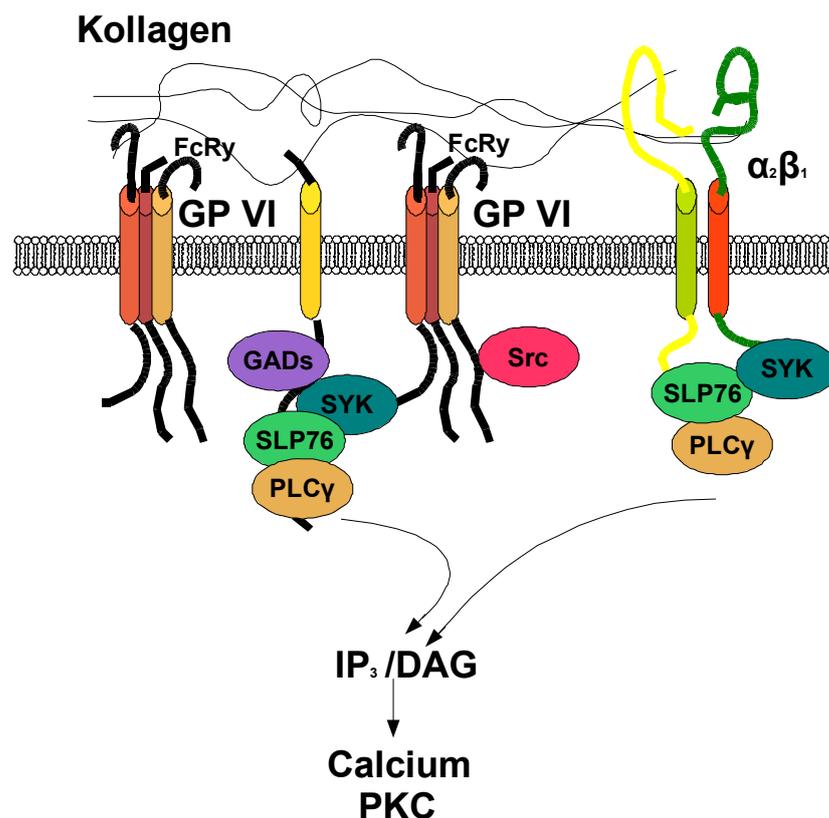
Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskelettes mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, diese Heterodimeren werden über ihre  $\beta$ -Kette in Subklassen eingeteilt. Auf Thrombozyten wurden fünf verschiedene Integrine beschrieben: drei der  $\beta_1$  Klasse, wie der Kollagenrezeptor ( $\alpha_2\beta_1$ ), der Fibronektinrezeptor ( $\alpha_5\beta_1$ ), Lamininrezeptor ( $\alpha_6\beta_1$ ) und zwei der  $\beta_3$ - Klasse, wobei hier der Fibrinogenrezeptor ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) besonders zu erwähnen wäre.

#### 1.3.2.1 Kollagenrezeptor

Der erste Kontakt mit dem geschädigten Endothel findet über den vWF statt, jedoch ist diese Bindung nicht sehr stabil. Zur Stabilisierung binden die Thrombozyten an die freigelegte Kollagenfibrillen über Glykoprotein VI (p 62) und IV (CD 36) und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  [22]. Die Adhäsion von ruhenden Thrombozyten an Kollagen führt zu deren Aktivierung mit nachfolgender Sekretion der Granulainhalte und Aggregation [22, 23]. Kollagen, welches zu den Skleroproteinen gehört, verfügt über eine Faserstruktur. Zurzeit sind 28 Subtypen des Kollagens bekannt wie z.B. Fibrilläre (Typ I) oder Netzbildende (Typ IV) Kollagene. Alle Kollagene sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut (Kollagen-

Helices), die als Tripelhelix umeinander gewunden sind. Jede Helix kann je nach Kollagentyp aus 600 bis 3000 Aminosäuren aufgebaut sein

Das Kollagen des Typ I wird aufgrund seiner langen seilartigen Tripelhelix zu den fibrillären Kollagenen gerechnet [24]. Es ist eines der Hauptkomponenten in artherosklerotischen Plaques sowie in der Gefäßwand [25]. Die Bindung von Kollagen an seinen Rezeptor ist  $Mg^{2+}$ - Ionen abhängig. Doch kommt es durch die Bindung an  $\alpha_2\beta_1$  nicht zur Thrombozytenaktivierung. Es wird dafür vielmehr ein *two-step-two-site* Modell diskutiert [26], in dem der erste Kontakt der Thrombozyten an das Kollagen über das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  stattfindet und in einem zweiten nachfolgenden Schritt bindet ein zweiter Kollagenrezeptor (GP VI) der Thrombozyten, was dann zu einer Aktivierung der Thrombozyten über den Tyrosin-Kinase Mechanismus führt (siehe Abbildung 1-5). Der Bindung des Kollagens an das Glykoprotein VI (GP VI) folgt die Clusterung des GP VI, dies führt zur Phosphorylierung der Fc Rezeptor  $\gamma$ -Kette durch Lyn und Fyn, Kinasen der Src- Familie. Über mehrere Zwischenschritte werden intrazelluläre Calciumspeicher mobilisiert und Isoformen der Protein Kinase C (PKC) ausgeschüttet, was über die Aktivierung letztendlich die Aggregation der Thrombozyten auslöst [22].



**Abbildung 1-5 Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen über eine direkte Interaktion zwischen Kollagen und dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  sowie der GP VI/ $\gamma$ -Kette:** Die Clusterung des GP VI führt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung in der  $\gamma$ -Kette gefolgt von einer Aktivierung der Tyrosin Kinase Syk. Syk aktiviert die Phospholipase  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), welche über Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) Diacylglycerol (DAG), die Protein Kinase C (PKC) Aktivität sowie die Calcium Konzentration erhöht.

### 1.3.2.2 Fibrinogenrezeptor

Das Glykoprotein IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) gehört zu den  $\beta_3$ -Integrinen und ist das am häufigsten vorkommende thrombozytäre Plasmamembranprotein, des offenen kanikulären Systems und der  $\alpha$ -Granula. Die Hauptaufgabe des Rezeptors, dessen  $\alpha_{IIb}$ -Kette aus einer schweren und einer leichten Untereinheit aufgebaut ist, ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierten Thrombozyten. Die Bindung stellt den ersten Schritt der Aggregation dar, denn über ein Fibrinogenmolekül werden zwei Thrombozyten verbunden (*bridging*). Fibrinogen wird in den Hepatozyten gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert. Von dort kann es in Megakaryozyten und Plättchen aufgenommen werden.

Das Fibrinogen stellt ein Dimer dar, welches aus zwei gleichartigen Hälften aufgebaut ist, welche ihrerseits aus drei nicht identischen Polypeptidketten ( $A\alpha$ -,  $B\beta$ - und  $\gamma$ -Kette) bestehen [27]. Durch Thrombin Einwirkung kommt es zur Abspaltung der Fibrinopeptide A und B vom Aminoende der  $A\alpha$ - und  $B\beta$ -Kette. Die entstandenen Fibrinmonomere aktivieren das fibrinolytische System und damit den Abbau von Gerinnseln durch Plasmin.

Unter physiologischen Bedingungen präsentieren Thrombozyten einen nicht aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor auf ihrer Membran. In diesem niedrigaffinen Zustand kann der Rezeptor nur immobilisiertes nicht aber lösliches Fibrinogen binden. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer raschen Konformitätsänderung des GPIIb/IIIa Komplexes, wodurch hochaffine Fibrinogenbindungsstellen freigelegt werden. Die Bindungsstellen sind ein Dodekapeptid (His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val; HHLGGAKQAGDV) am Carboxyterminalen Ende der  $\gamma$ -Kette [28] und zwei Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenzen enthaltenden Regionen der  $A\alpha$ -Kette des Fibrinogens [29].

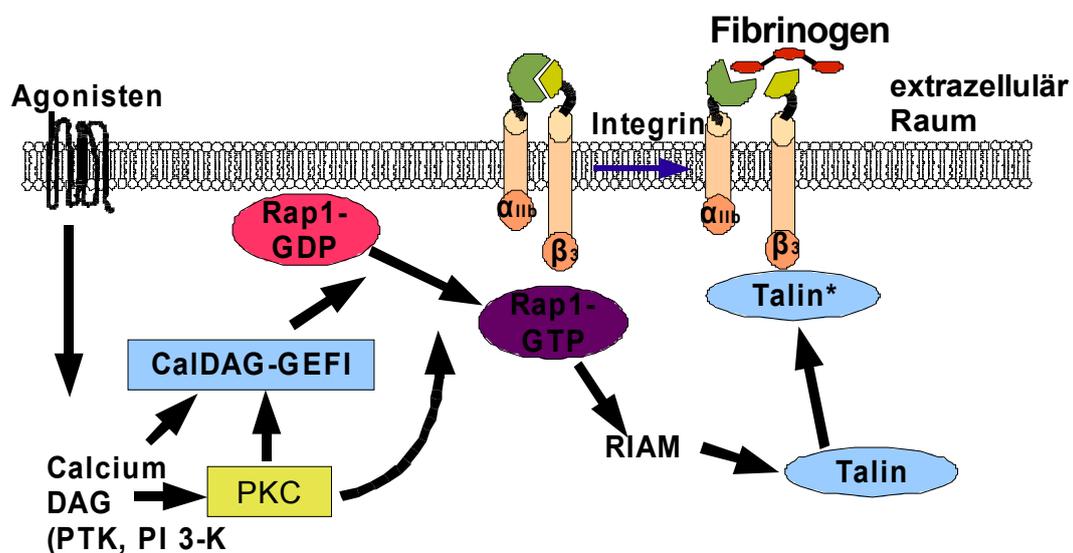
Durch die Bindung des löslichen Fibrinogens an den GP IIb/IIIa Rezeptor an der Oberfläche des Thrombozyten kann es zu einer Verbindung zweier Thrombozyten über ein Fibrinogenmolekül kommen und damit zu einer Plättchenaggregation. Verschiedene Agonisten induzieren das *Inside-out signaling*. Mit *Inside-out signaling* wird die Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrins durch  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren beschrieben. Die  $G_i$ -Rezeptoren aktivieren Phospholipase C (*PLC $\gamma$ 2*) durch *Syk*. Aktivierte PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (*PIP $_2$* ) zu Inositoltriphosphat (*IP $_3$* ) und Diacylglycerol (*DAG*). Das *IP $_3$*  mobilisiert  $Ca^{2+}$ -Ionen, während *DAG* die Protein Kinase C (*PKC*) anregt. Die aktivierte *PKC* reguliert die Serin/Threonin Phosphorylation, wodurch der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor in seine aktive Form übergeht.

Als Antwort auf den erhöhten Calcium- und DAG-Spiegel startet ein Guanin Nukleotid Austausch Faktor (*CalDAG-GEFI*) die *RAP1*, kleine GTPasen der Ras Fami-

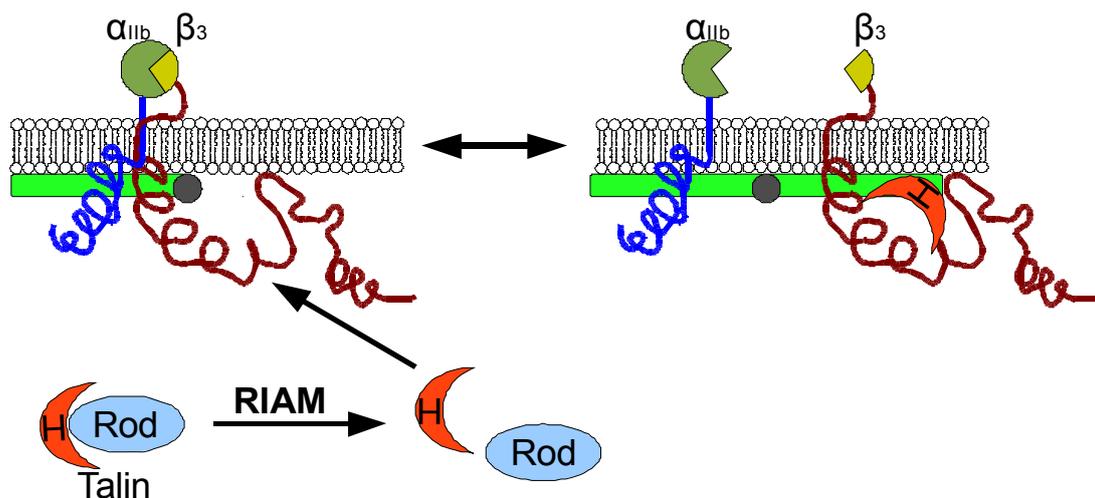
lie. Zusätzlich sind PI 3-Kinasen an der Regulation der Aktivierung beteiligt, sie regen die  $G_i$ -abhängigen Rap1b an [30, 31]. Rap1b greift wiederum an *RIAM* (Rap 1 *interacting adaptor molecule*) an. *RIAM* ist mit Talin verbunden und unterstützt die Bindung von Talin an  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , was eine Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat [32, 33] (siehe Abbildung 1-6).

Dieser Mechanismus ist gemeinhin als *claspung/ unclaspung* bekannt. Unter *claspung* versteht man hierbei die nicht aktivierte Form des Rezeptors. Die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ - Helices umklammern sich dabei bis in transmembranäre Domänen. Bei der *unclaspung*, der aktivierten Form, liegen die Helices frei im Zytosol und können Talin H binden. Dadurch ändert sich die extrazelluläre Domäne und geht in die aktive Form über, die lösliches Fibrinogen binden kann (siehe Abbildung 1-7: ).

Mit der  $\beta_3$  Einheit können weitere Zytoskelett- Proteine wie Myosin, Sklelemin,  $\alpha$ -Aktinin interagieren. Ebenso wirken Proteinkinasen und Phosphatasen wie *Src* und *Syk* auf das  $\beta_3$  Ende des Integrins ein [32].



**Abbildung 1-6:** Durch einen äußeren Agonisten, meist über  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren kommt, es zu einer Erhöhung der Calciumionen Konzentration durch Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ). Das Diacylglycerol (DAG) regt die Protein Kinase C (PKC) an. Als Antwort auf die erhöhten Calcium- DAG- Spiegel startet ein Guanin Nukleotid Austauschfaktor (*Ca/DAG-GEFI*) Rap1. Rap1 greift an *RIAM* an, welches mit Talin verbunden ist. Talin ist für die Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  verantwortlich, welches dann Fibrinogen binden kann (*Inside-out signaling*). [33]



**Abbildung 1-7:** Das *claspung/ unclaspung* Modell des *Inside-out signaling*: Durch die Erhöhung der Calcium- und DAG Konzentration in der Zelle kann Talin an die  $\beta_3$  Untereinheit des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors binden. Der Rezeptor geht dann in die *unclaspung* also die aktive Form über und kann dann Fibrinogen binden [32].

Im Gegensatz zum *inside-out signaling*, bei dem eine Fibrinogenrezeptor- Aktivierung über ein sekundär Rezeptor und intrazellulärem *signaling* erfolgt, versteht man unter *outside-in signaling* die Aktivierung von Signalwegen durch Bindung von Fibrinogen direkt an dessen Rezeptor. Die verschiedenen Signalwege beeinflussen z.B. die Bildung und Stabilisierung großer Plättchenaggregate oder führen zur Sekretion spezieller Substanzen aus den Granula. Weiter können prokoagulatorische Oberflächenstrukturen geschaffen sowie die *Clot Retraction* [34] beeinflusst werden. Die *Clot Retraction* ist die Verkürzung der Fibrinfäden innerhalb eines Plättchenaggregates, sie dient damit der Ausbildung stabiler Thromben im Gefäß.

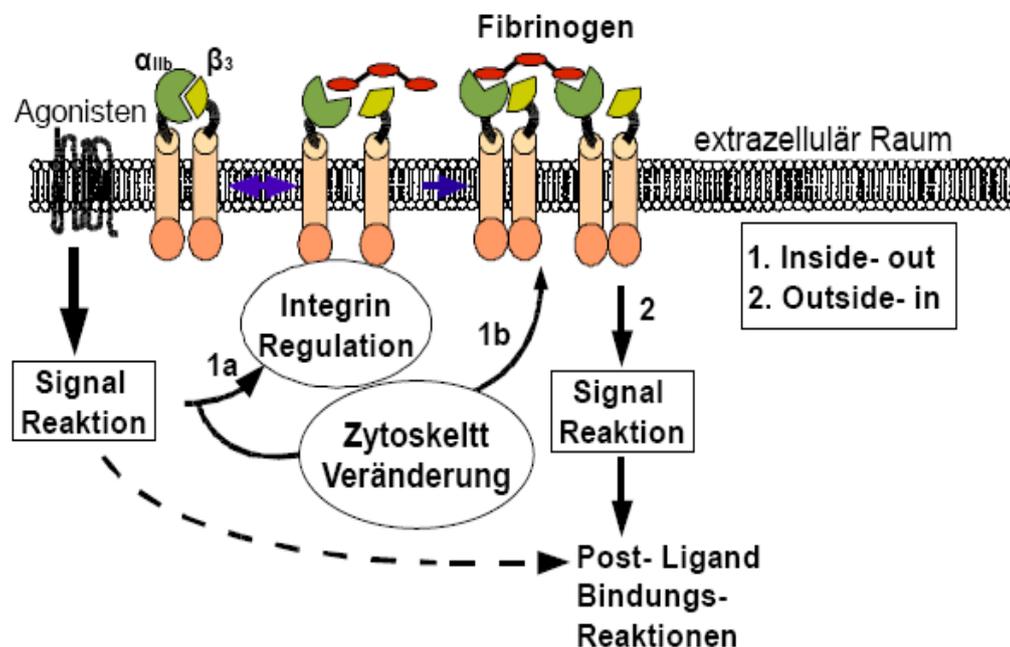
Im ersten Schritt des *outside-in signaling* findet eine Clusterung der  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Rezeptoren statt. Nach erfolgter Clusterung der Integrin Rezeptoren werden Protein Tyrosin Kinasen und Phosphatasen wie *Src* und *Syk* aktiviert. Diesem Initiationsschritt folgen komplexe Signalwege über verschiedene Enzyme, Schaltmoleküle und Substrate, die auf das Aktinzytoskelett Einfluss nehmen. Zu diesen Verbindungen gehören *Rac* (GTPase), *Nck* (eine Schaltsubstanz), *PAK* (p21 aktivierte Kinase sie gehören zur Serin/Threonin Kinasen), PI 3-Kinasen (Phosphoinositol 3 Kinasen sind Lipidkinasen) und VASP (Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein, ein Aktin bindendes Protein).

Drei weitere Proteine, die für das Verständnis des *outside-in signaling* wichtig sind, sind zum einen das  $\beta_3$  Protein selbst, die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) und das  $\alpha$ -Aktinin. Allen Dreien ist gemein, dass sie während der Aggregation oder dem Spreizen (Spread) von *Src* und oder *Syk* Tyrosin phosphoryliert werden. Sie greifen des Weiteren in die Strukturveränderung der Thrombozyten über Aktin basierende Komplexe ein. An dem  $\beta_3$  Protein können Schaltmoleküle binden oder auch Myosin, welches zur

*Clot Retraction* benötigt wird. PLC $\gamma$  ist das Substrat von *Src* und Bruton Tyrosin Kinase (*Btk*) Kinasen, und seine Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung leitet eine vermehrte Produktion von Diacylglycerol und Inositol Phosphat (IP3) ein, welche für eine maximale Aggregation und Ausspreitung benötigt wird [35]. Das  $\alpha$ -Aktinin ist ein homodimeres Aktin- bindendes Protein, was erst durch Phosphorylierung des Tyr<sup>12</sup> an die Aktin Filamente des Zytoskelltes binden kann [36].

Die Integrine sind heterodimer integrale Membranproteine, welche aus einer extrazellulären, einer transmembranäre und einer zytoplasmatischen Domäne bestehen. Diese hochsensitiven Rezeptoren tragen nicht nur zur Zelladhäsion und Migration bei, vielmehr leiten sie Informationen bidirektional durch die Plasmamembran. Die zytoplasmatischen Domänen sind für die Signalleitung der Informationen notwendig und haben gezeigt, dass sie mit zytoplasmatischen Proteinen interagieren. Neuere Erkenntnisse konnten belegen, dass durch diese Interaktionen mit bestimmten Adhäsions- Kinasen die Integrine in der Lage sind mit Hilfe des Aktins die Zytoskellstruktur zu verändern. Diese Strukturveränderung ist für den Translations Prozess in den Thrombozyten entscheidend (Abschnitt 1.5).

Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist ein bidirektionaler Signalrezeptor, der sowohl ein *inside- out signaling* als auch ein *outside- in signaling* steuern kann.



**Abbildung 1-8:** *Inside out signaling* erhöht die Affinität (1a) und die Bindungsneigung (1b) von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  für Liganden wie das Fibrinogen. *Outside in signaling* verstärkt eine Vielzahl von Ereignissen nach Ligandenbindung (2). Doch benötigen einige Signalwege auch das Zusammenwirken von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  abhängige Signale und Agonist-Rezeptorsignalen [31].

### 1.3.2.3 Lamininrezeptor

Unterschiedlichste Formen von Laminin werden in der subendothelialen extrazellulären Matrix exprimiert und schließlich präsentiert. Sie bilden damit ein potentielles Substrat für die Bindung von Thrombozyten während einer Gefäßverletzung. Die subendothelialen Formen bilden Laminin 8 ( $\alpha_4\beta_1\gamma_1$ ) und Laminin 10 ( $\alpha_5\beta_1\gamma_1$ ). Thrombozyten enthalten und sekretieren nach Aktivierung diese beiden Laminin (8 und 10) als auch das Laminin 11 ( $\alpha_5\beta_2\gamma_1$ ) [37].

In der Literatur findet man widersprüchliche Angabe über die durch Aktivierung resultierende Formveränderung der Thrombozyten. So wird einerseits beschrieben, dass die Plättchen über das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  an Laminin binden und später diese Bindung durch GP VI verstärkt wird, was wiederum in einer filopodalen und lamellipodalen Strukturänderung der Plättchen endet. Von einigen Wissenschaftlern wird hingegen ein Mechanismus beschrieben, in dem die Thrombozyten an Laminin nur über  $\alpha_6\beta_1$  binden. Sie konnten keine Strukturveränderung feststellen und unter Einfluss von GP VI wurden nur filopodiale Veränderungen beobachtet, was darauf schließen lässt, dass der Strukturwandel von der Beteiligung des GPVI abhängig ist.

Das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  wird in allen Betrachtungen aber als Laminin Rezeptor charakterisiert. Über eine zusätzliche Bindung der Thrombozyten an GP VI wird eine strukturelle Veränderung möglich [38].

### 1.3.3 Thrombinrezeptoren

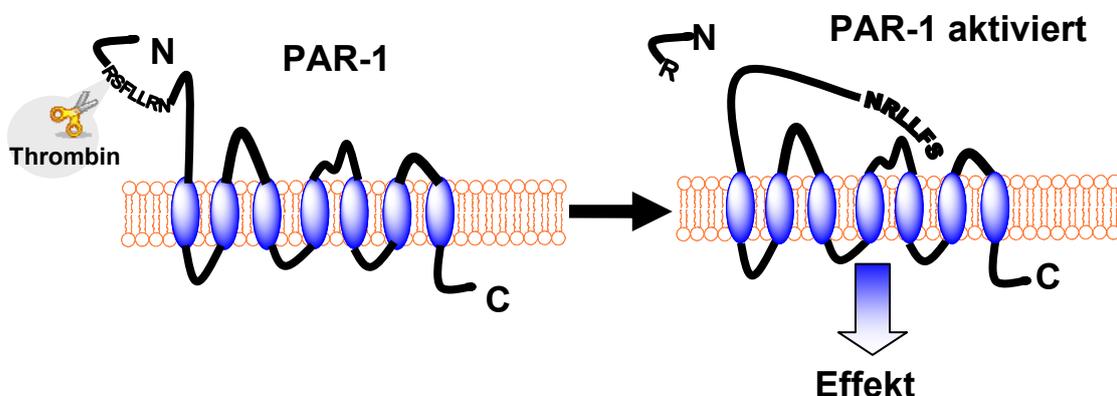
Thrombin ist einer der stärksten Aktivatoren der Thrombozyten [39]. Die bis heute identifizierten Thrombinrezeptoren gehören zur Gruppe der Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), welche Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie (GPCR) sind [40]. Zurzeit sind 4 Subtypen des PAR Rezeptors bekannt. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 werden direkt durch Thrombin aktiviert. Der PAR-2 dient als Rezeptor für weitere Proteasen, wie Trypsin oder FXa [41].

Rezeptoren	Aktivierende Protease	Protease EC <sub>50</sub>	Zelltyp	physiologische Aufgabe
<b>PAR-1</b>	<b>Thrombin</b> Trypsin FXa	Thrombin 50 pM	Thrombozyten Endothel Glatte Muskelzellen Leukozyten	Plättchenaktivierung und Thrombose, embryonale Entwicklung, Vasoregulation, Gewebe Remodelling
<b>PAR-2</b>	Tryptase Trypsin FXa	Tryptase 1nM Trypsin 1nM	Endothel Glatte Muskelzellen Leukozyten	Entzündung Vasoregulation
<b>PAR-3</b>	<b>Thrombin</b>	Thrombin 0,2 nM	Thrombozyten (Maus) Endothel	Plättchenaktivierung und Thrombose in Mäusen
<b>PAR-4</b>	<b>Thrombin</b> Trypsin Cathepsin G	Thrombin 5nM Trypsin 5nM	Endothel Glatte Muskelzellen Leukozyten	Plättchenaktivierung und Thrombose Entzündung

**Tabelle 2:** Übersicht der Protease-aktivierten-Rezeptoren (modifiziert nach [41, 42])

Aus der Übersicht in Tabelle 2 sind die einzelnen PAR Rezeptoren und deren Vorkommen sowie ihre physiologische Aufgabe zu erkennen. Humane Thrombozyten exprimieren PAR-1 und PAR-4, diese können beide - die Plättchen Sekretion und die Aggregation - beeinflussen [43].

Bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin, wirkt die Serinprotease indem sie den N-Terminus des PAR-1 Rezeptors verkürzt. Der dabei neu entstehende N-Terminus, wird als *tethered ligand* (angebundener Ligand) bezeichnet. Nach intramolekularer Bindung führt der verkürzte Ligand zur Aktivierung des Rezeptors (Abbildung 1-9). Daraus lässt sich schließen, dass die proteolytische Aktivierung der einzelnen PAR-Subtypen durch kurze Peptide, deren Sequenzen der des angebundenen Liganden am N-Terminus entspricht, initiiert werden kann. Demnach können PARs auch als Peptid-Rezeptoren bezeichnet werden, die ihren eigenen Liganden tragen.



**Abbildung 1-9:** N= N Terminus, C= C Terminus, RSFLLRN= Thrombin Bindungssequenz [44].

Auf Thrombozyten werden sowohl PAR-1 als auch PAR-4 Rezeptoren exprimiert, doch scheint der PAR-1 Rezeptor der wichtigere zu sein. Auf diese Weise konnte durch An-

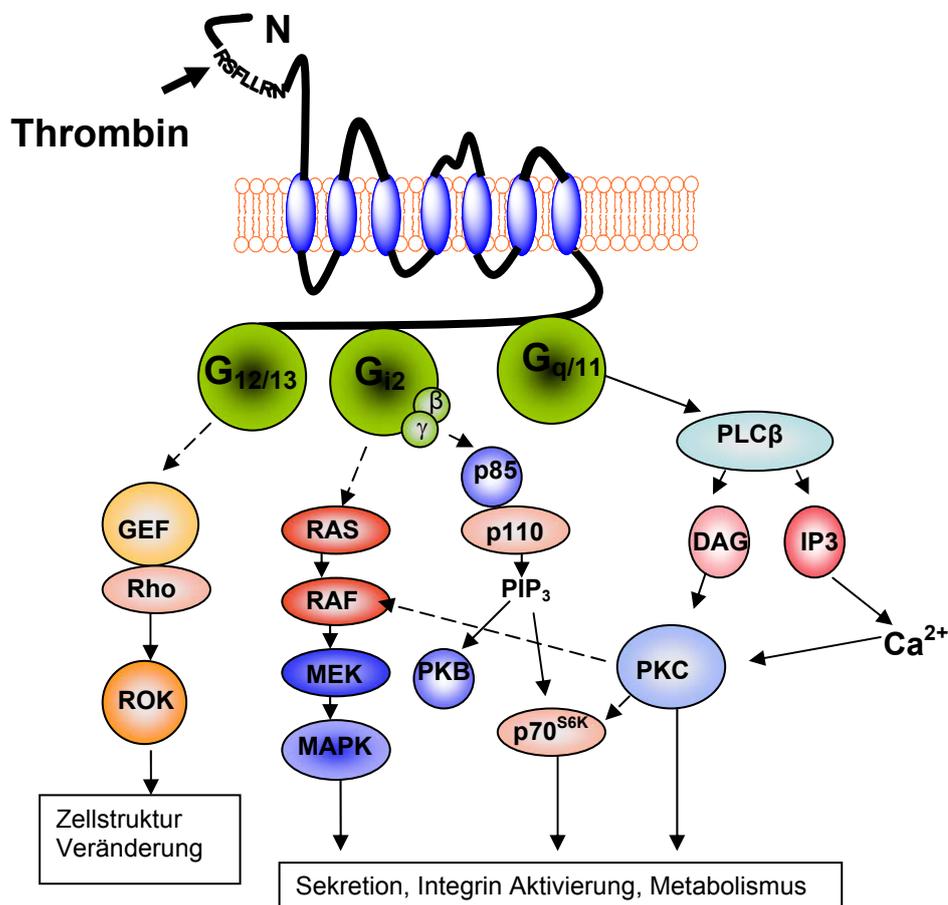
tikörper, die gegen die Thrombinbindungsstelle an PAR-1 gerichtet sind, eine mit niedriger Konzentration von Thrombin ausgelöste Plättchenaktivierung blockiert werden [45-47]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man mit PAR-1 Antagonisten [47, 48]. Im Gegensatz dazu zeigten Antikörper gegen die Thrombinbindungsstelle auf PAR-4 keinen Effekt auf die Inhibierung der Thrombozytenaktivierung. Erst durch Kombination mit PAR-1 Rezeptorblockern konnte die durch hohe Konzentrationen von Thrombin ausgelöste Plättchenaktivierung inhibiert werden [47]. Das lässt darauf schließen, dass bei geringen Konzentrationen von Thrombin die Aktivierung über PAR-1 gesteuert wird und bei einem Fehlen von PAR-1 die Aktivierung über PAR-4, der eine geringere Affinität zum Thrombin hat, geregelt wird. Aufgrund der geringen Affinität des PAR-4 Rezeptors zum Thrombin wird bei der Aktivierung von Thrombozyten über PAR-4 eine höhere Konzentrationen von Thrombin notwendig [49] (siehe Tabelle 2). PAR-4 benötigt nicht nur höhere Konzentrationen an Thrombin, vielmehr spricht er auch länger darauf an. Die PAR Aktivierung ist irreversibel, denn die Protease spaltet einen Teil des Rezeptors. Der PAR- Rezeptor muss erst „recycelt“ werden bevor er wieder aktiviert werden kann [50]. Eine längere *shut off* Zeit würde ein verlängertes Ansprechen des Rezeptors und somit eine Aktivierung nach sich ziehen. In Folge dessen konnte von Shapiro et al. gezeigt werden, dass der PAR-4 Rezeptor eine verlängerte *shut off* Zeit besitzt [51].

Unterschiede zwischen den beiden auf humanen Thrombozyten exprimierten PAR Rezeptoren bestehen auch in ihrer Bindung an G-Proteine. Der PAR-1 Rezeptor ist intrazellulär an  $G_{12/13}$  [52],  $G_{q/11}$  [53] und an  $G_i$  [54] gekoppelt. An die intrazelluläre Domäne des PAR-4 Rezeptors können  $G_{q/11}$  [53] sowie an  $G_{12/13}$  [52] Proteine gebunden sein. Demnach kann die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion durch Thrombin  $G_q$ -,  $G_i$ -, und/ oder  $G_{12/13}$  vermittelt sein. Durch die  $G_{12/13}$ - abhängige Aktivierung kommt es im Verlauf des Rho Signalweges zur Phosphorylierung von Zytoskelettproteinen und somit zur Formveränderung [55]. Der  $G_i$ - abhängigen Aktivierung folgt eine Regulierung verschiedener Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) bzw. Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3-Kinase). Dabei kommt die  $G_i$ - vermittelte Aktivierung sowohl über die  $\alpha$ - als auch über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit zustande.  $G_{i\beta\gamma}$  bewirkt in Folge der Aktivierung der PI3-Kinase die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB) und der p70S6-Kinase.  $G_{i\alpha}$ - führt hingegen über eine RAS-RAF Aktivierung zur Phosphorylierung der MAPK.

Die  $G_q$ - Protein vermittelte Signaltransduktion führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) [56]. PLC  $\beta$  ihrerseits katalysiert die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5 -triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol, welchem eine Calcium Ionen Mobilisierung und Protein Kinase C Aktivierung (PKC) folgt. Eine indirekte Aktivierung der MAPK-Kaskade kann auch über den PKC-Weg erfolgen, wobei es zur

Aktivierung der RAS-RAF Kaskade und zur Phosphorylierung der MAPK (siehe Abbildung 1-10) kommt.

Abschließend stellt sich die Frage, weshalb auf Thrombozyten zwei verschiedene PAR-Rezeptoren exprimiert werden, von denen der PAR-4 höhere Konzentrationen an Thrombin benötigt und dessen Ansprechen auf die Thrombinaktivierung verlängert ist. Man könnte in der verlängerten *shut off* Zeit eine Anpassung sehen, die eine Aktivierung auch dann noch erlaubt, wenn sehr viele Rezeptoren durch Thrombin oder andere Protease aktiviert sind. Weiterhin zeigt der PAR-4 Rezeptor im Gegensatz zum PAR-1 Rezeptor ein Ansprechen auf Cathepsin G eine andere Protease [57]. Die Existenz von zwei verschiedenen Rezeptoren, die in unterschiedlicher Geschwindigkeit auf Thrombin ansprechen, erlaubt eine deutliche Reaktion, die auf ein und derselben Zelle auch noch von der Konzentration an Thrombin abhängen kann.



**Abbildung 1-10: Thrombin induzierte Signaltransduktion durch Aktivierung des PAR-1:**

PAR-1 kann an Mitglieder der G<sub>12/13</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>i2</sub>, Familie von G-Proteinen binden. Darauf bindet das G<sub>12/13</sub> an RhoGEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors), welche letztendlich Rho-abhängige Kinasen aktivieren (ROK). Diese ROK wiederum beeinflussen Zytoskelett Proteine und führen zum *shape change* der Thrombozyten. G<sub>iβγ</sub> aktivieren Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>), Protein Kinase B sowie MAP Kinasen (MAPK). G<sub>q</sub> regt die Phospholipase C β (PLC β), an diese hydrolysiert Phosphatidylinositolbisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3), dadurch kommt es zur intrazellulären Calcium Mobilisierung und zur Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) [49, 53].

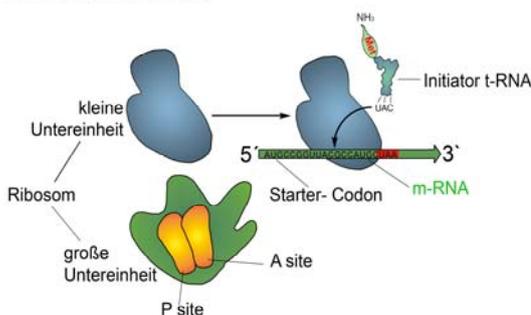
## 1.4 Proteinsynthese in Thrombozyten

Die Vorstellung, dass Thrombozyten als Spaltprodukte der Megakaryozyten nur zur Blutungsstillung dienen, musste in den letzten Jahren neu überdacht werden. Obwohl seit 1968 bekannt ist, dass die kernlosen Plättchen m-RNA enthalten und somit die Möglichkeit besteht Proteine zu synthetisieren [58] konnte erst 1998 das Bcl-3 als Erstes von den Thrombozyten synthetisiertes Protein charakterisiert werden [17]. Bcl-3 wurde in Thrombin stimulierten Plättchen synthetisiert. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die m-RNA von den Megakaryozyten stammt [11], und falls notwendig, selbst in Thrombozyten durch *splicen* zurecht geschnitten werden kann. Bcl-3 wird jedoch nicht gespliced. Dieser signalabhängige Weg der Translation in Thrombozyten ist an verschiedenen Bedingungen geknüpft.

Die Translation erfolgt in drei Schritten: Erstens der *Initiation*: das Anlagern der m-RNA an die Ribosomen sowie die Bindung der t-RNA an das Startcodon der m-RNA. Der nächste Schritt ist die *Elongation* (Verlängerung). Sie verläuft über drei Zwischenschritte: der Bindung von t-RNA an die komplementäre m-RNA, der Ausbildung von Peptidbindungen und das Ablösen der t-RNA vom m-RNA Strang (siehe Abbildung 1-11). Als letzter Schritt, der Translation, wird die *Termination* betrachtet, dabei wird ein Stoppcodon erreicht zu dem es keine passende t-RNA Sequenz gibt (Abbildung 1-12).

### 1) Initiation

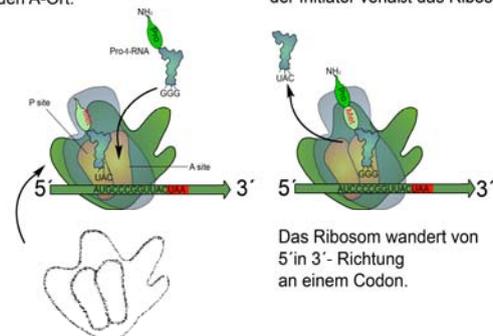
Die kleine Ribosomen- Untereinheit bindet an die mRNA. Die Initiator t-RNA (F-Met) bindet ebenfalls an dieser Stelle.



### 2) Elongation

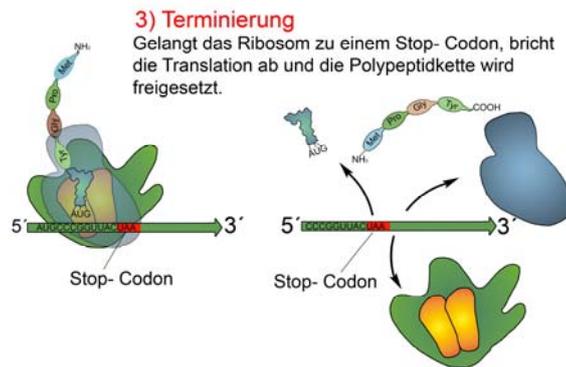
Die Initiator-t-RNA wandert in den P-Ort. Neue t-RNA bindet an den A-Ort.

Eine Peptidbindung wird gebildet; der Komplex wandert zum P-Ort, der Initiator verlässt das Ribosom.



**Abbildung 1-11: Ablauf der Translationsstufen:** 1 Initiation; 2 Elongation,

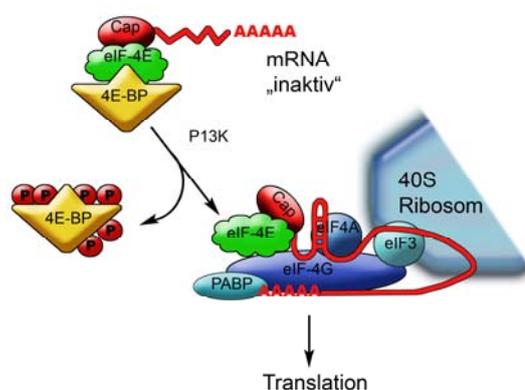
A-site =Eingang; P-site = Ausgang der m-RNA



**Abbildung 1-12:** Ablauf der Translationsstufe 3 Termination

Der für die Initiation der Translation wichtige Faktor 4E, auch eukaryotischer Initiationsfaktor 4E (*eIF4E*) genannt, wurde in Thrombozyten nachgewiesen [15]. Er befindet sich im Membrangerüst der Thrombozyten, zusammen mit den  $\beta 3$ -Integrinen und ist an das Repressorprotein *eIF4E* binding protein-1 (*4E-BP-1*) gebunden [15]. Die m-RNA ist im Inneren des Zytoskelettes der Thrombozyten lokalisiert. In nichtaktivierten Thrombozyten liegen beide demnach in getrennten Zellkompartimenten vor. Diese räumliche Trennung und die Bindung an das Repressorprotein bedingen Regulationsmöglichkeiten der Translation in Thrombozyten.

Werden die Plättchen durch einen äußeren Reiz aktiviert, unterziehen sie sich einem Formenwandel, dieser *shape change* führt zu einer Verlagerung der Zellkompartimente. Der *eIF4E* wird umverteilt und gelangt nun in direkten Kontakt mit der m-RNA. Durch Phosphorylierung des *4E-BP-1* wird dieses Repressormolekül inaktiviert, *eIF4E* kann nun an das Cap-Ende der m-RNA binden und die Translation initiieren (Abbildung 1-13) [59, 60].



**Abbildung 1-13:** Bildung des freien *eIF-4E* welcher als Folge die Translation initiiert

In der letzten Dekade wurden neben Bcl-3 noch weitere Proteine charakterisiert, die durch eine signalabhängige Translation in Thrombozyten synthetisiert wurden. So konnte Lindemann et al. die Expression von IL-1 $\beta$  [18], einem inflammatorischen Zytokin, in Thrombozyten nachweisen. Wie von Denis et al. [11] gezeigt wurde, muss die

IL-1 $\beta$  m-RNA in den Thrombozyten erst gespliced werden, d.h. es werden die nicht kodierenden Introns entfernt. Dies gilt auch als weiterer Beleg dafür, dass die Thrombozyten einen vollständigen Translationsapparat enthalten. Schwertz et al. [14] hat beschrieben, dass Thrombozyten in der Lage sind, TF (*tissue factor*) signalabhängig zu splicen und zu exprimieren. Es konnte damit zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Thrombozyten nicht nur Speicher für thrombogene Substanzen und Verschlussmaterial sind, sondern Thrombozyten vielmehr ihre vorhandene m-RNA nutzen, um aktiv Proteinen zu synthetisieren, die inflammatorischen und thrombogene Prozesse unterhalten können. Die Signalabhängigkeit dieser Proteinsynthese besteht im Zusammenwirken von Stimulation über G-Protein Rezeptoren und dem damit gekoppelten *inside-out signaling*. Die direkte Zellstrukturveränderung durch *outside-in signaling*, über die Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (siehe auch Abschnitt 1.3.2.2) führt auch zu einer signalabhängigen Proteinsynthese. Erst durch das Zusammenwirken dieser Komponenten kommt es zur Anlagerung des *eIF-4E* an die m-RNA und damit der Initiation der Proteinsynthese [15, 59].

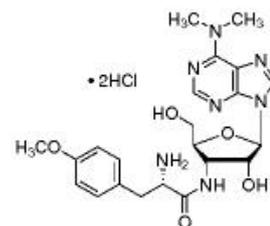
Pabala et al. [61] untersuchte den Einfluss der Integrine auf die Proteinsynthese in Thrombozyten am Beispiel von Bcl-3. Es konnte in den Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen über Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die Expression von Bcl-3 steuert. Schließlich konnte auch der Einfluss der Kollagen vermittelten Proteinexpression geklärt werden. Die Bindung der Thrombozyten an Kollagen über  $\alpha_2\beta_1$  Integrine führt zu einer Bcl-3 Expression auch ohne zusätzliche Stimulation.

## 1.5 Möglichkeiten der Inhibition der Proteinsynthese

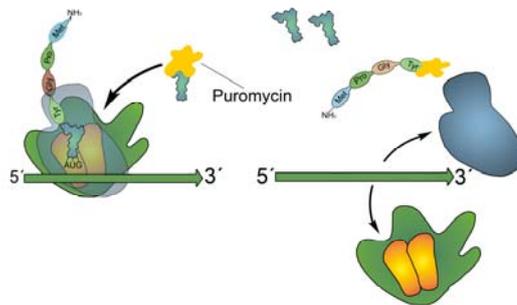
Durch die Wahl geeigneter Inhibitoren kann die Translation unterbunden werden. Wie unter 1.4 beschrieben verläuft die Translation in drei Stufen: der *Initiation*, der *Elongation* und der *Termination*. So kann die Proteinsynthese unterbunden werden durch:

### Puromycin

3'-( $\alpha$ -Amino-*p*-methoxyhydrocinnamamido)-3'-deoxy-N,N-dimethyladenosine, 2HCl  
 MG: 544,4 g/mol



Puromycin, ein Nucleosid- Antibiotikum aus *Streptomyces alboniger*, hemmt die Protein-Biosynthese, indem es eine verfrühte Termination einleitet. Dabei bindet das Puromycin als Aminoacyl-tRNA Analogon an die Polypeptidkette, was dann zum vorzeitigen Kettenabbruch führt. Die entstanden Pseudoproteine sind nicht funktionsfähig (siehe Abbildung 1-14).



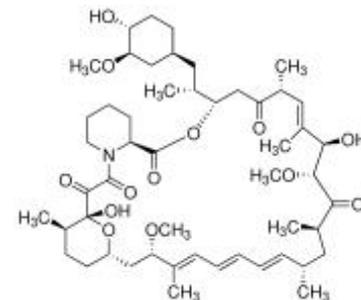
**Abbildung 1-14:** Wirkung des Puromycin als „falscher“ Baustein in der Proteinsynthese führt zum Abbruch der Synthese.

## Rapamycin

23,27-Epoxy-3H-pyrido[2,1c][1,4]

oxaazacyclohentriacontin

MG: 914,17 g/mol



Rapamycin, ein Makrolidantibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, bindet in Säugetierzellen an m-TOR (mammalian Target of Rapamycin) oder besser gesagt an FKBP12 (FK-506 binding protein 12) [62]. Diese Bindung bewirkt eine Hemmung der m-TOR Aktivität. Die Serin/Threonin-Kinase m-TOR gehört in die Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen [63]. Als Bestandteil eines Proteinkomplexes reguliert es unter anderem die Translation.

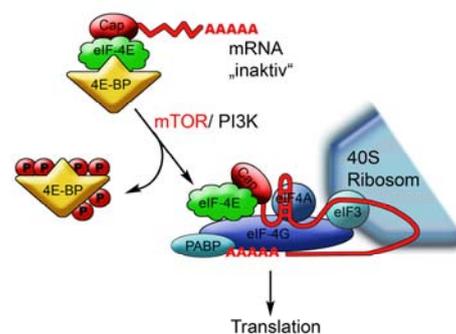
Der durch Rapamycin gehemmte Komplex ist der m-TOR complex 1, bestehend aus m-TOR, Raptor (regulatory associated protein of m-TOR) sowie ein G-Protein  $\beta$ -Untereinheit- Ähnliches Protein (G $\beta$ L), auch als mLST8 bezeichnet [64]. Sowohl Raptor als auch mLST8 regulieren die m-TOR abhängige Phosphorylierung der S6 Kinase1 und des 4E-B Protein 1 (4 eukariotischen Bindungsprotein 1) in vivo und in vitro.

Die Translation ist durch eine Vielzahl von Initiations-Faktoren reguliert. In den eukariotischen Zellen ist die Bildung eines eIF4F (eukaryotische Initiations- Faktor 4F)-Komplexes der entscheidende Schritt der Translations-Initiation. Der eIF4F-Komplex, dirigiert die ribosomalen Untereinheiten an die m-RNA und löst die so genannte cap-abhängige Translation aus. Für einen funktionsfähigen eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4A, eIF4E und eIF4G, muss erst eIF4E mit der 7-Methylguanosisin Triphosphat ( $m^7$

GTP) cap Struktur der mRNA, die sich am 5'Ende befindet, interagieren. eIF4E reagiert weiter mit dem eIF4G, über welches letztendlich die Verbindung zum Ribosom geschaffen wird [60]. Der eIF4F besteht aus drei Komponenten, wobei die Aktivität des eIF4E durch das 4E-BP1 (4E Bindungsprotein 1) reguliert wird. Über den Phosphorylierungsstatus des 4E-BP1 wird dessen Affinität zum eIF4E gesteuert. Der Phosphorylierung, speziell an Serin und Threonin des 4E-BP1 durch m-TOR, folgt die Spaltung vom eIF4E, welches damit in den eIF4F Komplex binden kann (siehe Abbildung 1-15). Rapamycin unterbindet die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Serin 65 und Threonin 70, und somit die Bildung eines funktionsfähigen eIF4F Komplexes [65] (siehe Abbildung 1-16).

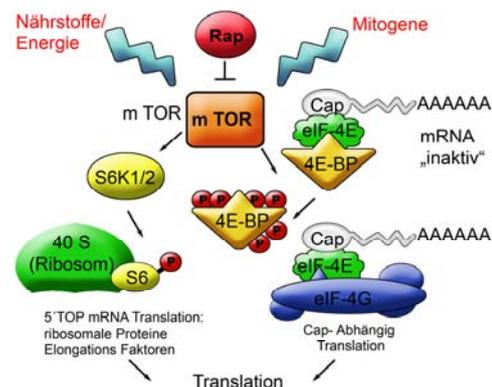
**Abbildung 1-15: Mechanismus der Translation-Initiation.**

Eine Hyperphosphorylation von 4E-BPs (durch 'P' gekennzeichnet) führt zu einer Spaltung von 4E-BP und eIF-4E. Dabei kann das freie eIF-4E an eIF-4G binden. EIF-4G dient dabei als Gerüst für die Translations Faktoren. Diese sind die RNA, eIF4A, das Poly A- Bindungsprotein PABP und eIF3 welches die 40 S Untereinheit der Ribosomen zum 5'Ende der m-RNA leitet.[66]



**Abbildung 1-16: m-TOR abhängige Translationsregulation**

m-TOR reguliert die Translation Initiation via S6K1/2 und 4E-BPs. S6K1/2 phosphoryliert das ribosomale S6 Protein. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die 5'TOP mRNA Translation. Die Phosphorylierung des 4E-BP1 erlaubt die Initiation der Cap-abhängigen Translation.

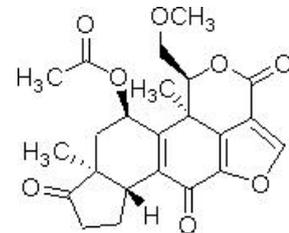


Ein weiterer Angriffspunkt von Rapamycin ist an der S6 Kinase1. Die S6 Kinase1, oder auch p70/S6 Kinase, phosphoryliert das 40 S ribosomale Protein S6 [65, 67]. Die mRNA Familie, deren Translation von S6 Kinasen reguliert wird, sind durch einen endständiges Oligopyrimidin Gebiet (TOP) am 5` Ende charakterisiert [67, 68]. Diese 5` TOP m-RNAs verschlüsseln sowohl Komponenten der Translationsmaschinerie, als auch ribosomale Proteine, Elongations Faktoren und das Poly (A)- bindende Protein (PABP) [67]. Unter Rapamycin Einfluss kommt es zu einer Dephosphorylierung von Threonin 389, Serin 404 sowie Threonin 229 und somit zur Inaktivierung von S6K1 [65, 68, 69]. Daraus resultiert eine Verminderung der 5'TOP m-RNA Translation (siehe Ab-

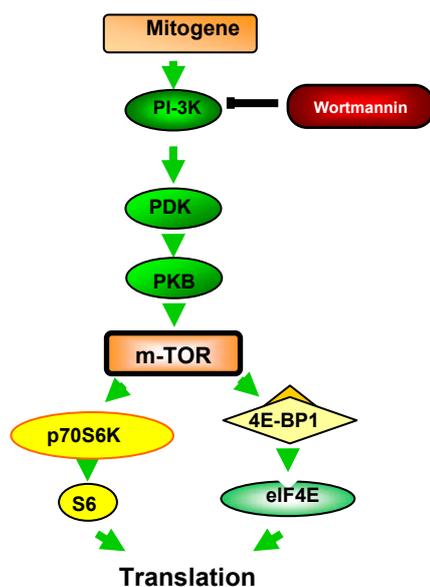
bildung 1-16). Rapamycin zeigt damit einen sehr selektiven Wirkmechanismus auf, der es ermöglicht, gezielt in die Proteinsynthese und damit in die Proliferation von Zellen einzugreifen. In der Praxis wird Rapamycin zum einen zur Prophylaxe von Organabstoßungen bei Transplantpatienten eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Verhinderung von Restenose in nativen Herzgefäßen. Dabei kommt ein mit Rapamycin beschichteter Stent zum Einsatz, welcher kontinuierlich Rapamycin aus einer Polymermatrix über den Zeitraum von 3 Monaten freisetzt. Diese Stütze wird in dem Gefäß an der verengten Stelle platziert und verhindert den Totalverschluss. Die Restenosen, welche nach Stentimplantation beobachtet wurden, sind Folgen der Neointimabildung. Durch Verwendung von Rapamycin beschichteten Stents konnte ein Rückgang dieser Restenosen beobachtet werden [70].

### Wortmannin:

MG: 428,4 g/mol



Wortmannin, ein Stoffwechselprodukt von *Penicillium funiculosum*, ist ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidyloinositol 3-Kinasen (PI3Ks) [71]. Wie oben genannt gehört m-TOR zur Gruppe der Phosphatidyloinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen [63]. Wortmannin wirkt auf ähnliche Weise wie Rapamycin, indem es die Phosphorylierung des 4E-BP1 hemmt und dadurch die Ausbildung des für die Translation nötigen eIF4F Komplexes verhindert [72, 73] (siehe auch Abbildung1-15 und 1-16).



**Abbildung 1-17:** Wortmannin wirkt inhibierend auf die Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3K), welche über die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) und die Protein Kinase B (PKB) letztendlich auf m-TOR wirkt. Somit wird die 4E-BP1 Phosphorylierung gehemmt. Es können keine eIF4F Komplexe gebildet werden. Als Folge daraus ist die Translation gehemmt.

Dabei greift Wortmannin an einer übergeordneten Stelle des Signalweges ein. Auf diese Weise sind weitere Faktoren, die für die Proliferation der Zelle wichtig sind, auch gehemmt. So wird durch Inhibierung der Phosphoinositol-3 Kinasen nicht nur die Phosphorylierung des 4E-BP1 gehemmt, vielmehr werden durch Hemmung nachfolgender Kinasen zelluläre Prozesse reguliert. Die Protein Kinase B (PKB) ist eine Serin/Threonin Kinase welche in der Zelle unter anderem die Apoptose verhindert [74]. Durch deren Funktionseinschränkung werden apoptotische Prozesse in der Zelle nicht mehr reguliert.

## **1.6 B-cell Lymphoma 3 (Bcl-3)**

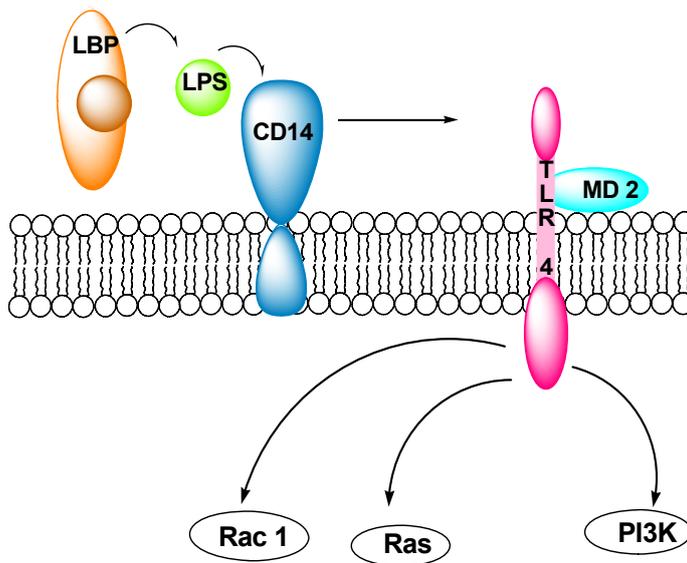
Bcl-3 wurde in den B-Zellen bei chronisch lymphatischer Leukämie entdeckt [75]. Es gehört in die Familie der I $\kappa$ B Regulationsproteine, die unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B regulieren und so Einfluss auf die Proteinexpression in kernhaltigen Zellen nehmen können. *In vitro* bindet Bcl-3 an p50 und p52. Beide sind Mitglieder der Rel Familie und man geht davon aus, dass über diese Bindung die Transkription reguliert wird [76]. Das Bcl-3 Protein besteht aus mehreren Ankyrin Regionen mit Prolinreichen N und C Termini, was auf weitere Protein-Protein Interaktionen als nur die von NF- $\kappa$ B schließen lässt. In verschiedenen Experimenten konnte festgestellt werden, dass Bcl-3 an die SH 3 Domäne von Fyn in transfezierten Zellen und auch in Plättchen binden kann. Zugleich interagiert Bcl-3 aber auch mit Lck, einer Tyrosin Kinase ähnlich Fyn. Fyn reguliert die Zytoskelettfunktion. Die genaue Funktion des BCL-3 Proteins ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. In Thrombozyten übernimmt BCL-3 eine Funktion in der Thrombusverfestigung (*Clot Retraction*), indem es an die SH 3 Domäne von Fyn bindet [77].

## **1.7 Bakterielle Toxine**

### **1.7.1 Lipopolysaccharid**

Das zur Gruppe der Endotoxine gehörende LPS ist ein Zellwandbestandteil Gramnegativer Bakterien. LPS ist ein Heteropolymer, welches aus zwei Hauptbestandteilen besteht: dem hydrophoben Lipid A, welchem die immunmodulatorischen Eigenschaften des LPS zugesprochen werden, sowie den hydrophilen Polysacchariden. Die Lipid A Phosphate und Fettsäure Acylierungen unterscheiden sich unter den einzelnen Bakterienstämmen. Nach Lyse der Bakterienzelle wird das LPS in die Blutbahn abgegeben und ist dort in der Lage, das Immunsystem zu aktivieren, indem es die Monozyten,

Makrophagen, Thrombozyten und die Endothelzellen stimuliert. LPS kann an drei verschiedenen Rezeptoren binden: an dem gelösten oder membrangebundene CD14-MD2-TLR4 Molekülen, allgemein als Toll like Rezeptor 4 bezeichnet, sowie an dem CD11/18 Molekülen, den  $\beta$  2 Integrinen und an den Scavenger Rezeptoren. Im menschlichen Plasma bindet das LPS an ein hepatisches akut Phasen Protein: das LPS binding Protein LPB. Das LPB transportiert LPS Monomere an den CD 14 Rezeptor (siehe Abbildung 1-18).



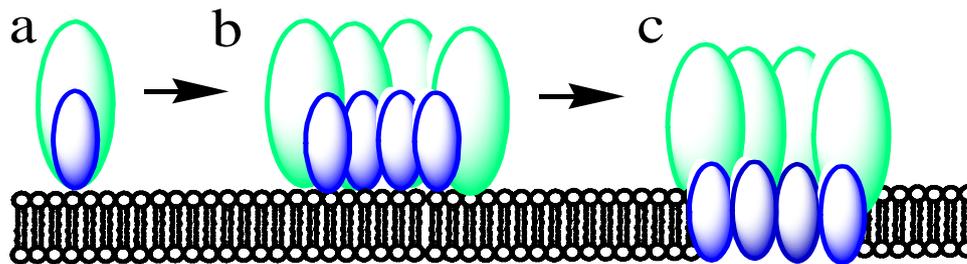
**Abbildung 1-18:** LPS bindet an LPB (LPS binding Protein) und gelangt so zum CD14-MD 2 Rezeptor Komplex. Die Effekte der Bindung des LPS am Rezeptor-Komplex sind die Aktivierung von Rac 1, Ras und PI3K

Indem LPS am CD14-MD2-TLR4 Molekül bindet erhöht sich die Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen. Allerdings ist der genaue Mechanismus der Aktivierung humaner Thrombozyten noch nicht im Detail aufgeklärt. So konnte in verschiedenen Experimenten, mit unterschiedlichen LPS Konzentrationen, keine Aggregation induziert werden. Vielmehr kann die Aggregation als Folge der Aktivierung betrachtet werden. Ein direkter Zusammenhang von der Bindung des LPS an TLR4 und den weiteren intrazellulären Signalwegen ist noch unbekannt.

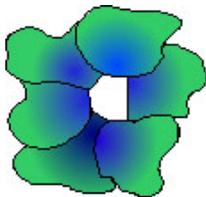
### 1.7.2 Staphylococcus aureus $\alpha$ -Toxin

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten Erreger bakterieller Infektionen und für sehr viele Erkrankungen, wie das Lyell-Syndrom (Staphylococcal scalded skin syndrome) oder auch für eine lebensbedrohliche Sepsis, verantwortlich. Zudem produziert Staphylococcus aureus eine Vielzahl von extrazellulären Proteinen, unter anderem fünf zytolytische Toxine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - Hämolyysin und Leukocidin), eine Koagulase, Enterotoxine A-E, das Shock Syndrom Toxin-1 und viele weitere [1]. Das  $\alpha$ -Toxin aus Staphylococcus aureus ist ein hydrophiles Protein mit einer Masse von 34 kDa, welches hä-

molytischen, zytotoxischen und dermonekrotischen Eigenschaften besitzt. Es besteht aus 293 Aminosäureresten und enthält kein Cystein [78]. Für die Bindung an die Zellmembran benötigt  $\alpha$ -Toxin keine speziellen Proteinrezeptoren, vielmehr bildet es eine Ringstruktur aus Toxin-oligomeren. Diese Heptamere bilden nichtselektive Poren in einem Lumendurchmesser von 1,1 – 2,5 nm in den Zellmembranen [79, 80]. Bei diesen Poren handelt es sich um wassergefüllte Kanäle, die nicht selektive Ionen und kleinere Moleküle (MG 1000-4000) passieren lassen (Abbildung 1-19 und 1-20).



**Abbildung 1-19: Porenbildung:** Das wasserlösliche Monomer bindet an der Zellmembran (a); die membrangebundenen Monomere bilden einen Pre-Poren-Komplex (b). Durch die Oligomerisierung kommt es zur Insertion der zentralen Moleküldomäne in die Bilayermembran, in dessen Folge sich dann ein heptamerischer Porenkomplex ausbildet (c). [modifiziert nach [81]]



**Abbildung 1-20:** Modellvorstellung einer  $\alpha$ -Toxinpore in Aufsicht auf die Zellmembran

Der Zelltod erfolgt durch den schnellen Verlust an lebenswichtigen Molekülen, wie z.B. ATP, sowie durch Veränderung des intrazellulären Milieus durch Einstrom von Wasser (bis hin zur Zytolyse) aber auch von Calciumionen [80]. Calciumionen fungieren als Trigger für viele sekundäre Reaktionen in der Zelle [82]. So werden viele  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Enzyme, wie die Adenylatcyclase, die Phospholipase A2 und die Phospholipase C, reguliert. Weiterhin sind Calciumionen an der Muskelkontraktion und an Sekretionsvorgängen beteiligt. Es ist bekannt, dass Plättchen nicht bis zur Lyse anschwellen können, da ihr Gehalt an zytoplasmatischen Makromolekülen geringer ist [83]. Somit gewinnen sekundäre zelluläre Reaktionen, hervorgerufen durch die Porenbildung, und daraus resultierenden Ionen Einstrom an Bedeutung [1].

Auch konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Toxin in verschiedenster Weise mit dem Blutplättchen interagiert [83, 84]. Die aggregationsauslösende Eigenschaft des  $\alpha$ -Toxins im Plasma wurde in einem Konzentrationsbereich von 1- 2,5  $\mu\text{g/ml}$  beschrieben [83]. Gewaschene Thrombozyten reagieren sensibler. Hier genügt eine Konzentration von 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin im Fluid zum Aggregieren. Die Sensibilität der Thrombozyten

auf das Toxin konnte durch Zugabe von gepoolten humanen IgG wieder verringert werden. Diese Erkenntnisse lassen auf einen protektiven Effekt der Immunglobin- Antikörper auf die durch  $\alpha$ -Toxin induzierte Plättchenaktivierung und Aggregation schließen [83].

Die bisherigen Untersuchungen des Einflusses von Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Toxin auf die Blutplättchen blieben auf die Aggregation beschränkt. Es sind noch keine Daten zur Thrombozytenaktivierung und Veränderungen im Proteinmuster bekannt. In der unten aufgeführten Tabelle 3 werden die Einflüsse des  $\alpha$ -Toxins auf verschiedene Zellpopulationen dargestellt. Die Wirkung beruht meist indirekt durch Mediatorfreisetzung aus verschiedenen Zellen. Durch einen erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle werden diese aktiviert und es folgt die Mediatorfreisetzung.

	<b>Toxin Target</b>	<b>freigesetzte Mediatoren</b>	<b>Zielzellen</b>
$\alpha$ -Toxin	in Säugerzellen allgemein kommt es zum Calciumeinstrom	Thromboxan Leukotrien	Säugerzelle
		LTB <sub>4</sub>	Polymorphkernigeneutrophile Leukozyten Eosinophile Monozyten
		PGI <sub>2</sub>	Glattmuskulzellen
		TXA <sub>2</sub>	
	Monozyten	TNF $\alpha$	Polymorphkernigeneutrophile Endothelzellen
		IL 1	T-Zellen und Makrophagen
		IL 6	Akutphasen Protein, T-Zell- und B-Zellproliferation
		IL 8	Chemotakt für Neutrophile und T-Zellen
	Endothelzellen Makrophagen Neutrophile	PAF	Thrombozyten
	Thrombozyten	PF4	Neutrophile, Monozyten

**Tabelle 3 Wirkung des  $\alpha$ -Toxins auf verschiedenen Zellen [1, 8, 85, 86].**

Durch die Toxinpore kommt es zum Calciumionen Einstrom, dies führt zur Aktivierung der Zelle und letztendlich zur Ausschüttung der Mediatoren. LTB<sub>4</sub>: Leukotrien B<sub>4</sub>, PGI<sub>2</sub>: Prostaglandin I<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , IL 1;2,6,8: Interleukin 1,2,6,8; PAF: Plättchen Aktivierender Faktor, PF<sub>4</sub>: Plättchen Faktor 4

## 1.8 Fragestellung dieser Arbeit

Die Entdeckung, dass Thrombozyten RNA enthalten und diese nutzen, um nach signalabhängiger Aktivierung Proteine zu synthetisieren, wirft ein neues Licht auf die einfachen, nicht zur Regulation fähigen, Zellen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten nicht nur RNA enthalten, sondern diese sogar *splicen* und in Proteine umschreiben können. Dieser Vorgang erfolgt aber nicht spontan, sondern ist vielmehr signalabhängig. Die Signale führen jedoch nicht nur zu einer Translation, vielmehr werden die Thrombozyten aktiviert und erfahren dann einen *shape change*. Durch diese Strukturveränderung ist allerdings auch eine Aggregation der Thrombozyten möglich. Die Aggregation stellt die Hauptaufgabe der Thrombozyten dar, sie führt zum Verschluss der Läsion und stoppt die Blutung. Gerät dieser Prozess der Hämostase außer Kontrolle, kommt es zu Blutungskomplikationen. Blutungskomplikationen, wie eine starke Abnahme der Thrombozytenzahl und die Ausbildung von Verschluss thromben in den Gefäßen, werden häufig bei septischen Patienten beobachtet. Auslöser dieser Komplikationen können Substanzen des Immunsystems sein, die gegen die Infektion ankämpfen oder es sind die Erreger selbst. Aus der Literatur ist bekannt, dass bakterielle Toxine Blutzellen und speziell Thrombozyten beeinflussen können.

Um den Einfluss der bakteriellen Toxine auf Thrombozyten zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- **Einfluss bakterieller Endo- und Exotoxine Toxine auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten**
  - Aktivierung der Adhäsion von Thrombozyten an unterschiedliche Matrices durch bakterielle Toxine
  - Aktivierung thrombozytärer Rezeptoren wie dem GP IIb/IIIa durch bakterielle Toxine
- **Beeinflussung der Proteinexpression humaner Thrombozyten durch bakterielle Endo- und Exotoxine**
  - Signalabhängige *de novo* Synthese des Bcl-3 Proteins
  - Regulation der Bcl-3 Expression
  - Identifizierung und Regulation thrombozytärer Proteine mit Hilfe der 2-D Analyse Methode

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

##### 2.1.1.1 Laborgeräte

APACT-4	Rolf Greiner Biochemica	Flacht
Automatische Pippetierhilfe: Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Durchlaufkühler: FBC 620	Fischerbrand	Schwerte
Electrophoresis Powersupply EPS600	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg i.Br.
Filmmaterial Amersham Hyperfilm™ ECL	Amersham GE Healthcare Limited	UK
Folienschweißgerät: Vacupack plus	Krups	Solingen
Heizblock: Thermomixer 5437	Eppendorf	Hamburg
Hoefer SE600 Dual Vertical Unit, Complete	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg i.Br.
Immobilon™-P Transfer Membrane	Millipore	Bedfordm USA
Inkubator Heraeus	Heraeus	Hanau
IPGphor Isoelectric Focusing Unit	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg i.Br.
Kamera:	Canon <i>Power shot G6</i>	Japan
Laborwaage: F13100	Fischerbrand	Schwerte
Linearschüttler: Polymax 2040	Heidolph Instruments	Schwabach
Magnetrührer: Ikamag RCT	IKA® Labortechnik Janke & Kun- kel	Staufen
Mikrowelle: Micromat	AEG	Nürnberg
Mikroskop: Axioskop	Zeiss	Unterkochen
pH-Meter: CG837	Schott	Mainz
Pipette: 0,5-10µl	Eppendorf	Hamburg
Pipette: 10-100µl	Eppendorf	Hamburg
Pipette: 100-1000µl	Eppendorf	Hamburg
Präzisionswaage: Precisa 40SM-200A	PAG Oerlikon AG	Zürich, Ch
Scanner: AGFA Snapscan 1236s	AGFA	Köln
Spectra Fluor Plus	Tecan	Crailsheim
Spectralphotometer S.250	Secoman	Domont Cedex
Strip Holder, 13cm	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg i.Br.
Vortexer: Reax 2000	Heidolph Instruments	Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage: Millipore	Millipore	Bedford USA
Wasserbad	Julabo	Seelbach
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge: Hettich	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen

### 2.1.1.2 Plastikware

Centrifuge Tubes 50ml	Labcon	SanRafael,USA
Halbmikroküvetten 1201	Ratiolab	Dreieich
Kanülen: Sterican 0,70x30, 0,90x70	Braun	Melsungen
Mehrweghähne: Discifix	Braun	Melsungen
Pipettenspitzen 0,5-10, 10-100, 100-1000µl	Eppendorf	Hamburg
Plastikpipette: Pasteurpipetten PE	Ratiolab	Dreieich
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0ml	Eppendorf	Hamburg
Spritzen: 1, 2, 5, 10, 20, 50ml	Braun	Melsungen
Perfusionsbesteck mit Flügel	Sarstedt	Nümbrecht

### 2.1.1.3 Glasware

Flaschen mit Schraubdeckel (PP) 100, 500, 1000ml	Schott	Mainz
Glasauflaufformen	Pyrex/Schott	Mainz
Messzylinder 5, 10, 25, 100ml	Schott	Mainz
Objektträger Superfrost Plus, Menzel Gläser	Labotec	Wiesbaden
Zählkammer nach Neugebauer: improved	Kühn & Bayer	Nidderau

## 2.1.2 Chemikalien

### Wasserqualität

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde destilliertes Wasser verwendet (Aufbereitungsanlage: Millipore Direct Q3 UV, Millipore Schwalbach). Bei Ribonukleinsäure (RNA)-Analysen wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit destilliertem Wasser angesetzt, das mit Diethylpolycarbonat (DEPC) behandelt wurde. Dazu wurde 1 l dH<sub>2</sub>O mit 100µl DEPC über Nacht inkubiert und das DEPC anschließend durch autoklavieren inaktiviert.

1-Butanol	B7906-500ML	Sigma Aldrich
30% Acrylamid/Bis Solution, 37,5:1	161-0156	BioRad
Aceton	5025.2	Roth
Acetonitril	1.15500.1000	Merck
ADP	5366	Rolf Greiner
Agarose	22674	Roth
Albuminstandard	23209	Thermo Scientific
α-Toxin (α-Hemolysin) Staphylococcus aureus	H-9395	Sigma Aldrich
Amidoschwarz	A-8181	Sigma Aldrich

Ammoniumpersulfat	161-0700	BioRad
Ammoniumsulfat	1.0126.1000	Merck
Bcl-3 Antikörper	sc13038	Santa Cruz
Benzonase®	1.01694.0001	Merck
Borat	B7901	Sigma
Bromphenolblau	B-3269	Sigma
CHAPS	1479.1	Roth
Citronensäure Monohydrat	1.00242.0500	Merck
complete® mini	11.836.153.001	Roch
DEPC	K028.3	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.05586.0500	Merck
Diethylpolycarbonat (DEPC)		
Dimethylsulfoxid DMSO	D-2650	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Roth
DNA latter	T-833.1	Roth
ECL Western blotting detection reagents and Analysis system	RPN2108	Amersham
ECL Plus Western blotting detection reagents	RPN 2132	Amersham
Essigsäure	3738.1	Roth
Ethanol absolut	20 821.321	VWR
Ethidiumbromid	E-7637	Sigma Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	E-6758	Sigma Aldrich
Evans Blau	E-2129	Sigma Aldrich
Fibrinogen (human plasma)	Cat. No. 341576	Calbiochem
Glucose	K1261442	Merck
Glycerol 87%	17-1325-01	Amersham
Glycin 99%	G 8898-1KG	Sigma Aldrich
Goat anti Rabbit	sc 2004	Santa Cruz
Goat anti Mouse IgM, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugat	401225	Calbiochem
Harnstoff	A 120.1	Roth
HBSS without Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> and Phenol red free	Cat. No BE10-527F	Biowitaker
HEPES	H9136	Sigma Aldrich
Humanes Serum Albumin 20%	Ch.B 0103502C	Baxter
IGP Cover Fluid	17-1335-01	Amersham
Immobiline DryStrip gels, pH 3-10L		
IPGphor Strip Holder Cleaning Solution	80-6452-78	Amersham
Isopropylalkohol	6752.3	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	1.04936.1000	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.04873.1000	Merck
Kollagen Typ I (human placenta)	Cat.No. C7774-5MG	Sigma Aldrich
Kodak processing Chemicals D- 19 Developer	P 5670 1GA	Kodak
Kodak Fixer	P 6557 1GA	Kodak
Laminin	Cat. No. L6274-.5MG	Sigma Aldrich
LPS E.coli Serotype 0127:B8	L-3129	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	Sucofin	TSI
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	M-2670	Sigma Aldrich
Medium 199	BE 12117f	Biowitaker
Methanol	65543	Fluka
Naphthol blue black/Amido black 1B	N- 3393	Sigma Aldrich
Natriumazid	K-3051	Roth

Natriumdeoxycholat	D6750-25G	Sigma Aldrich
Natronlauge (NaOH)	6771 1	Roth
Nonidet P40	1754599	Boehringer
Omniscrypt®	Cat.No. 205111	Qiagen
o-Phosphorsäure	9079.1	Roth
PAC-1	340507	BD
PBS- Tabletten	P-4417	Sigma Aldrich
Phosphoserin Detection Kit	525282	Calbiochem
Phosphothreonin Detection Kit	525288	Calbiochem
Phosphotyrosin Detection Kit	525322	Calbiochem
PIPES	P8655-25G	Sigma Aldrich
Ponceau S	P-7170	Sigma Aldrich
Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	161-0304	Bio Rad
Prostaglandin E (PGE1)	13010	Cayman
Puromycin	P8833-10MG	Sigma Aldrich
Rapamycin	553210	Calbiochem
rat mab anti mouse IgG1 HRP	04-6120	Invitogen
Roti® load 2 4x konz.	K 930.1	Roth
Saccharose	9286.1	Roth
Salzsäure (HCl)	4625-1	Roth
SDS solution 10%	161-0416	BioRad
SDS	2326.3	Roth
Seva Blue G	350 50	Serva
Silver Staining Kit, Protein	17-1150-01	GE Healthcare
TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin e)	161-0801	BioRad
Thioharnstoff	T-7875	Sigma Aldrich
Trifluoressigsäure	P008.1	Roth
Tri- Natriumcitrat Dihydrat	3580.1	Roth
TRIS (Trishydroxymethylamino- methan)	4855.2	Roth
TRIZOL® Reagent	Cat. No. 15596-018	Invitrogen
Tween 20	P- 9419- 100ML	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	1.07209.0250	Merck
Wortmannin	W1628-1 MG	Sigma Aldrich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Thrombozyten-Isolierung

Die Blutproben wurden von gesunden männlichen Probanden durch Punktion der Cubitalvene mit einem 21 G Perfusionsbesteck mit Flügeln abgenommen. Die freiwilligen Probanden hatten in den letzten 10 Tagen vor der Blutentnahme keine Antikoagulantien genommen. Das Blut wurde in ACD-A (Acid Citrat Dextrose) aufgenommen um eine Aktivierung durch freie Calciumionen zu verhindern.

In einem ersten Zentrifugationsschritt gewann man bei 800 rpm 37°C für 18 min das PRP (Plättchenreiche Plasma). Durch einen zweiten Zentrifugationsschritt wurde bei 2950 rpm und 37°C für 18 min das Thrombozytenpellet erhalten. Das Zellpellet wurde zweimal mit Waschpuffer resuspendiert und erneut bei 2950 rpm und 37°C für

18 min zentrifugiert. Im Anschluss wird das Pellet in Medium 199 oder HBSS aufgenommen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgt in einer Neubauer improved Zählkammer durch auszählen von 5 Gruppenquadraten (80 Kleinstquadraten) und Berechnung nach

$$\frac{x * V * 4000}{80} = \text{Zellen}/\mu\text{l} .$$

V= Verdünnungsfaktor  
x = die in 5 Gruppenquadraten (80 Kleinstquadraten) gefundenen Thrombozyten

<b>ACD-A</b>	
tri-Natriumcitrat	2,5 g
Zitronensäure	1,37 g
Glucose	2,0 g
Aqua ad 100 ml	

**Tabelle 4 :Zusammensetzung ACD-A nach USP**

<b>Waschpuffer [87]</b>	
PIPES	5 mM
HEPES	20 mM
NaCl	145 mM
KCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 µM
Glucose	5,5 mM
PGE <sub>1</sub>	10 nM
	pH 7,2

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Waschpuffers**

## 2.2.2 Adhäsions Experiment

Kommt es im Verlauf einer Gefäßverletzung zur Exposition von extrazellulärer Matrix, lagern sich sehr schnell Thrombozyten an das geschädigte Areal an und versuchen so die Läsion zu schließen. Dieser erste Schritt der Adhäsion (lose Adhäsion) einzelner Thrombozyten führt zur Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Plättchen und schließlich zur Thrombusbildung. In der initialen Kontaktphase der im Blut zirkulierenden Thrombozyten und der subendothelialen Matrix scheinen die auf Thrombozyten exprimierten Glykoproteine Iba (GPIb-V-IX) und das Glykoprotein VI (GP VI) entscheidend zu sein. Die Interaktion zwischen GPIbα mit an Kollagen verankertem von Willebrand Faktor (vWF) [88] sowie die Bindung von GPVI an fibrilläres Kollagen führen zur Rekru-

tierung von Thrombozyten aus dem Blutstrom an die verletzte Gefäßwand. Es folgte eine Verfestigung der Adhäsion über GPIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) und GPIa- IIa ( $\alpha_2\beta_1$ ).

Die extrazelluläre Matrix der Gefäßwände besteht aus unterschiedlichen Kollagen-Typen, VWF, Fibronectin sowie andere adhäsive Proteine, wie Laminin, Fibulin und Thrombospondin. Fibrinogen/Fibrin und Vitronectin werden zwar nicht von den Gefäßwandzellen synthetisiert, dennoch zählen sie zu den potentiellen thrombogenen Substanzen und können sich an die extrazelluläre Matrix anlagern. Mit diesen Experimenten sollten unterschiedliche Matrices auf ihre Fähigkeit Thrombozyten zu binden getestet werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mikroskopisch.

### **2.2.2.1 Adhäsion an Kollagen**

Das aus humanem Plazentagewebe gewonnene Typ I Kollagen wurde in 0,5 % Essigsäure gelöst, aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Für jeden Versuch wurden die Aliquots (1 mg/ ml) mit 0,5 % Essigsäure verdünnt, um eine Konzentration von 50 µg/ ml bzw. 10 µg/ ml zu erhalten. Diese Lösung wurde dann in die Zellkulturflaschen oder 6 Loch Kulturgefäß gegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Zu Beginn der Adhäsionsversuche wurde der Überstand aus den Kulturflaschen abgesaugt und verworfen. Um unspezifische Bindungen zu unterbinden wurde 1%iges humanes Serum Albumin (HSA) für vier Stunden auf das an den Zellkulturflaschenboden anheftende Kollagen gegeben. Anschließend wurde das HSA wieder abgesaugt und die Kulturflaschen mit HBSS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  frei) gespült. Die Thrombozytensuspension wurde in etwas Nährmedium zugegeben und für vier oder zwölf Stunden bei 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  Sättigung im Inkubator gelagert. Es folgte eine mikroskopische Auswertung der an Kollagen adhärenen Thrombozyten.

### **2.2.2.2 Adhäsion an Fibrinogen**

Fibrinogen, der Faktor I der Blutgerinnung, ist ein löslicher Eiweißkörper (Glykoprotein), der in der Leber gebildet wird. Bei der Blutgerinnung wird es durch Thrombin und Calcium in Fibrin, das für die Bildung des sekundären Thrombus verantwortlich ist, umgewandelt. Für die Experimente mit Fibrinogen wurde das Lyophilisat in 37°C warmer isotonischer Kochsalzlösung zu einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und aliquotiert. Wie schon bei den Kollagen-Experimenten wurde das Fibrinogen in Zellkulturflaschen oder 6 Loch Platten ausgebracht und über Nacht bei 4°C gelagert. Am Tag des Experimentes wurde das Fibrinogen mit einprozentigem HSA für mindestens drei Stunden geblockt und mit HBSS zweimal gewaschen.

### 2.2.2.3 Adhäsion an Laminin

Das Laminin wurde mit HBSS auf eine Konzentration von 50 µg/ ml gebracht und bei 4°C gelagert. Für die Versuche wurden die unspezifischen Bindungen ebenfalls mit einprozentigem HSA beblockt und mit HBSS gewaschen. Laminin ist als Glykoprotein ein Bestandteil der extrazellulären Matrix. Das Lamininmolekül besteht aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Proteinkette, die sich in heterotrimerer Form zum Lamininmolekül zusammensetzen. Die subendothelialen Formen sind Laminin 8 ( $\alpha_4\beta_1\gamma_1$ ) und 10 ( $\alpha_5\beta_1\gamma_1$ ); Thrombozyten enthalten außer 8,10 auch das Laminin 11 ( $\alpha_5\beta_2\gamma_1$ ).

In der Literatur gibt es verschiedene Auffassungen über die Wechselwirkungen von Laminin und den Plättchen. So wurde beschrieben, dass sich die Thrombozyten an Laminin anlagern ohne dabei eine Strukturveränderung (*shape change*) zu erfahren, wie es bei der Adhäsion an Kollagen oder vWF beobachtet wurde. Damit zeigen sich auch keine sekretatorischen oder morphologischen Veränderungen, die zur Aktivierung führen [89]. Neuere Erkenntnisse hingegen belegen, dass Thrombozyten über einen Laminin-Rezeptor (Integrin  $\alpha_6\beta_1$ ) an die E8 Domäne des Laminin binden [90]. Dem folgt dann die Aktivierung über ein weiteres Glykoprotein GP VI zur Lamelopodienformation (siehe auch 1.3.2.3).

### 2.2.3 Proteinexpression in Thrombozyten

Um den Proteinexpressionsstatus der Thrombozyten zu untersuchen wurden Western-Blot sowie das 2D Western-Blot Verfahren angewendet. Das Plättchen-Proteom umfasst alle Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt, mit all ihren Isoformen und posttranslationalen Variationen. Für Proteom-Untersuchungen eignen sich Plättchen besonders durch das Fehlen des Zellkerns. Weiterhin kann man sie in hohen Ausbeuten isolieren und leicht von anderen Blutzellen isolieren. Das Proteom unterliegt einem ständigen Wandel, unter anderem einer Post-Translationalen-Modifikation (PTMs). Im Falle vom Plättchen-Proteom geschehen diese Veränderungen als Antwort auf die Aktivierung. Da die Plättchen nur eingeschränkt zur *de novo* Proteinsynthese fähig sind, werden Veränderungen meist als PTMs sichtbar, wie z.B. Protein-Phosphorylierungen an Serin, Threonin und Tyrosin. Daher geben Veränderungen des Phosphorylierungsstatus eines Proteins wichtige Informationen über die Mechanismen der Plättchenaktivierung.

### 2.2.3.1 Proteinextraktion

Die Verwendung eines Lysepuffers zerstört die Zellmembran und die Proteine gehen in Lösung. So können sie anschließend bei der Elektrophorese (Abschnitt 2.1.4.1) aufgetrennt werden. Der Lysepuffer enthält Protease- und Phosphataseinhibitoren, welche der Denaturierung der Proteine durch zelleigene Enzyme entgegenwirken.

<b>RIPA- Lysepuffer</b>	
Nonidet P 40®	1 %
Natriumdeoxycholat	0,5 %
SDS	1% (m/V)
Complet mini®	4 Tabletten
mit PBS auf	40 ml

**Tabelle 6: Zusammensetzung RIPA Lysepuffer:** Der Lysepuffer wird in 2,5 ml Tubes aliquotiert und bei -20°C gelagert.

<b>Lysepuffers für 2D:</b>	
Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 %
TRIS Buffer	40 mM
Complete Mini®	4 Tabletten
Benzonase®	100 IU/ml
Mit Aqua dest. auf	40 ml

**Tabelle 7: Modifiziertes Amersham Pharmacia Biotech Protokoll (Berkelman und Stenstedt, 1998):** Der Lysepuffer wird zu 2,5 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Nach Zugabe des Lysepuffers werden 100 U/ ml Probenvolumen einer DNase/RNase (Benzonase®) zupipettiert. Die Proben werden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert und anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge mit 20800 g für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und zu Proben von je 100 µl in original Eppendorf-Probengefäßen aliquotiert. Im Folgenden könnte sowohl die Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese oder die erste Dimension angeschlossen werden, falls dies nicht geschieht werden die Proben bei – 80°C gelagert. Vor dem Auftragen der Proben auf die Gele muss der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt werden. Dies erfolgt mit der Proteinbestimmung nach Popov [91].

### 2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Popov

Ansetzen der Lösungen.

**Lösung I:** 0,65 g Amidoschwarz 10B in 50 ml Lösung II.

**Lösung II:** 30 ml Eisessig(100 prozentige Essigsäure), 450 ml Methanol.

**Lösung III:** Lösung I mit Lösung II 1:10 verdünnen.

Die Proteinlösungen (Proben) werden im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt. Davon werden 200 µl in dem Test eingesetzt. Zur Erstellung der Eichkurve wird eine BSA (bovine serum albumine)-Stammlösung (2 mg/1000 µl) mit Aqua dest auf 100, 250, 500, 1000 und 1500 µg/ml im Test verdünnt. Die 200 µl der Eich- bzw. Probelösung wird in originalen Eppendorf-Probegefäßen vorgelegt. Durch den Zusatz von 600 µl **Lösung III** bildet sich ein Komplex aus Proteinen und Amidoschwarz 10B, der dann ausfällt. Die Probe wird 5 min. bei 15800xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird dreimal mit 750 µl **Lösung II** gewaschen, 5 min. bei 15800xg zentrifugiert und im letzten Schritt in 1 ml 0.1 M Natronlauge gelöst. Die Lösungen werden in ½ Mikroküvetten überführt und es wird die Absorption bei 620 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Die Eichgerade wird aus den Absorptionswerten der Eichproben bestimmt und die Konzentrationen der Proben durch Extrapolation aus derselbigen gewonnen.

## 2.2.4 Prinzipien des Western Blot

Die Auftrennung eines Proteingemisches erfolgt durch die SDS-Gel Elektrophorese. Bei dem hier angewendeten SDS-PAGE *Natrium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld durch eine poröse Polyacrylamidmatrix und werden nach ihrem Stokes-Radius, und somit nach ihrer Molekülgröße, aufgetrennt. Die Porengröße, und damit der Bereich der Auftrennung der Gele, kann durch den unterschiedlichen Acrylamidgehalt gewählt werden. Mit Hilfe des anionische Detergenz SDS werden die Proteine denaturiert und die Eigenladungen der Proteine werden überdeckt. Dadurch haben alle Proteine die gleiche negative Ladung pro Einheit. Als Puffersystem kommt das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffer zur Anwendung. Im Anschluss erfolgt ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid Membran. Auf dieser Membran können die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert und auf einem Film durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

### 2.2.4.1 Prinzipien der Elektrophorese

Bei dem Elektrophoreseverfahren nach Laemmli (1970) werden Proteine nach Ladung und Größe getrennt, da ein Protein im angelegten elektrischen Feld zu der ihm entgegengesetzten geladenen Elektrode wandert. Je größer das Verhältnis von Ladung zu Masse ist, desto schneller bewegt sich das Protein. Als Matrix für die Gelelektrophorese wird Polyacrylamid verwendet, welches durch Zusatz von Bisacrylamid quervernetzt wird. In Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine ihrer Größe nach getrennt. SDS bindet als anionisches Detergenz an der Oberfläche der Proteine,

überdeckt deren Eigenladung und zerstört auch die Tertiärstruktur der Proteine. Die aufgetrennten Proteine können über verschiedene Detektionsverfahren qualifiziert werden. Nach erfolgter Auftrennung werden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran transferiert und können so mit geeigneten Antikörpern im Wester-Blot nachgewiesen werden.

Für ein Acrylamid-Gel 180 mm x 180 mm x 1 mm wird benötigt:

<b>Trenngel</b>	<b>für ein 9% iges Gel</b>
Acrylamid	13,5 ml
Trenngelpuffer	5,62 ml
SDS	450 µl
Wasser	23,25 ml
APS	2,25 ml
Temed	22,5 µl

**Tabelle 8: Trenngelzusammensetzung**

<b>Sammelgel</b>	<b>für ein 9%iges Gel</b>
Acrylamid	2,5 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
SDS	200 µl
Wasser	11,3 ml
APS	1 ml
Temed	15 µl

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammelgels**

<b>Trenngelpuffer</b>	<b>Endkonzentration im Gel 375 mM Tris-HCl, pH 8,8</b>
Tris Base (3,0 M)	363 g
Aqua destillata	auf 1000 ml
	pH 8,8 einstellen
<b>Sammelgelpuffer</b>	<b>Endkonzentration im Gel 375 mM Tris-HCl, pH 6,8</b>
Tris Base (3,0 M)	30 g
Aqua .dest	auf 500 ml
	pH 6,8 einstellen

**Tabelle 10: Gelpuffer Bestandteile**

Die Trenngellösung wird in eine vorbereitete Hoefer SE 600 Gelkammer gegossen, um zu polymerisieren. Das Gel wird mit 95 % Isopropanol überschichtet, dies garantiert eine Luftblasen freie Oberfläche. Nach beendeter Polymerisation wird die Isopropanollösung vorsichtig abgehoben und die entstandene Oberfläche wird mit destilliertem Wasser gewaschen.

Es schließt sich nun die Applikation des Sammelgels in die Gelkammer an. In das noch nicht polymerisierte Sammelgel wird ein Gelkamm geschoben. Dieser stellt

eine Ausbildung gleichgroßer Geltaschen sicher. Die Geltaschen werden vor dem Beladen mit der Proteinlösung kurz mit Elektrophoresepuffer gewaschen.

Die Proben wurden dafür mit vierfach Rotiload® 1:3 versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95°C im Thermomixer erhitzt.

Es werden dann 50 µg Proteinlösung pro Tasche appliziert, zusätzlich wird in eine der Taschen ein Molekulargewichts-Standard gegeben (5 µl low range Bio Rad). Jeweils zwei Gele werden in eine Gelkammer überführt und die oberen als auch die unteren Kammern mit insgesamt 5000 ml Elektrophoresepuffer befüllt. Die Elektrophorese wird in einer auf 17°C temperierten Elektrophoresekammer gestartet, wobei nach einer 15 minütigen Fokussierung bei 40 mV folgt die Auftrennung mit 80 mV. Nach der Auftrennung der Proteine schließt sich der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid Membran an (siehe 2.2.4.2).

<b>Elektrophorese Laufpuffer</b>	
Tris ( 2,5 mM)	3,03 g
Glycin (19,2 mM)	14,4 g
SDS (0,1%)	1,0 g
	auf 1000 ml mit Aqua dest. pH 8,3 einstellen

**Tabelle 11: Laufpuffer Bestandteile**

### 2.2.4.2 Transfer aus SDS- Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidendifluorid-Membran

<b>Transferpuffer 10fach</b>	
Tris (25 mM)	30,29 g
Glycin (192 mM)	144 g
	auf 1000 ml mit Aqua dest.

**Tabelle 12: Bestandteile für die Herstellung von 1l Transferpuffer 10 fach**

<b>Transferpuffer</b>	
10x Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
	auf 1000 ml mit Aqua dest. pH 8,3 einstellen

**Tabelle 13: Komponenten für die Herstellung von 1l Transferpuffer**

Der Proteintransfer wurde in einer Tank-Blot Apparatur mit Platin Elektrode durchgeführt. Für den Transfer wurde folgender Sandwich-Aufbau verwendet:

- Abstandshalter
- Silberelektrode
- Abstandhalter

- Schwamm
- Filterpapier
- Gel
- Transfermembran
- Zwei Filterpapier
- Zwei Schwämme
- Filterpapier
- Gel
- Transfermembran
- Zwei Filterpapier
- Zwei Schwämme
- Abstandshalter
- Platinelektrode
- Abstandshalter

Blotbedingungen für 12 h bei 0,5 A auf Eis gefolgt von einer Stunde bei 1A.

### 2.2.4.3 Proteinfärbung mit Ponceau S

Mit dem roten Farbstoff Ponceau S können die Proteine, die durch den Transfer auf die Membran gebracht wurden, sichtbar gemacht werden. Dazu muss die mit Proteinen beladene Membran für etwa zehn Minuten mit Ponceau S inkubiert werden. Anschließend wird die Membran mit zehnpromzentiger Essigsäure gewaschen, gefolgt von mehreren Waschschrirten mit Aqua destillata, bis das Proteinbandenmuster gut zu erkennen ist. Nach erfolgter Ergebnisdokumentation über Scannen oder Kopieren kann die Membran mit der Magermilchlösung behandelt werden (siehe Absch. 2.2.4.4).

### 2.2.4.4 Immunologischer Nachweis des Bcl-3 Proteins

<b>10 fach TBS (Tris-Buffered-Saline)</b>	
Tris Base (100 mM)	12,10 g
NaCl	90 g
	auf 1000 ml mit Aqua dest.

Tabelle 14: TBS Lösung

<b>TBST</b>	
TBS	100 ml
Tween	1 ml
	auf 1000 ml mit Aqua dest.

Tabelle 15: TBS mit Tween versetzt

<b>Blocklösung</b>	<b>5% Magermilch</b>
Magermilchpulver (Succofine)	5 g
TBST	100 ml

Tabelle 16: Blockierungslösung

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit der Magermilchlösung für 1,5 h bei RT blockiert. Nach zwei Waschschritten mit TBS-T schließt sich die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur an. Nach erneutem Waschen wurde die Reaktion mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (anti-rabbit, HRP linked) durchgeführt.

Optimale Antikörperkonzentration:

Primär-Antikörper	Bcl-3 (H146) 1:250
Sekundär-Antikörper	1:1000

Danach wurde die Membran nochmals gewaschen und anschließend die Chemilumineszenzreaktion mit ECL™ (Amersham), entsprechend der Angabe des Herstellers, durchgeführt. Das emittierte Licht der Wellenlänge 466 nm wurde mit geeigneten Filmen (Hyperfilm™ECL™, Amersham) detektiert. Für die Ladekontrolle wurde ein Aktin sensitiver Antikörper verwendet. Dazu muss die vormals detektierte Membran *gestriipt* werden, indem sie drei Waschschrritten zu je zehn Minuten unterzogen wird. Es folgt dann ein erneutes Blocken der Membran für 1,5 h mit einer Magermilch TBST-Lösung. Nach mehreren Waschschrritten wird dann der Aktin HRP gekoppelte Antikörper für 1,5 h inkubiert. Das Einwirken von ECL™ auf die Membran führt zu Lichtsignalen, die auf einem Film detektiert werden können.

#### 2.2.4.5 Prinzipien der 2D-Gel-Elektrophorese

Mit der Zwei-Dimensionalen-Gelelektrophorese können mehrere tausend Proteine aus komplexen Proteingemischen aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteine in zwei Schritten bearbeitet. In der ersten Dimension werden sie nach ihrer Ladung mit einem pH-Gradienten durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) getrennt. In der zweiten Dimension werden die Proteine anhand ihrer molekularen Größe durch SDS-Gelelektrophorese separiert. Mit Hilfe der Zwei-Dimensionalen-Gelelektrophorese kann das Proteom einer Zelle oder eines Gewebes analysiert werden. Das Proteom wird definiert als die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter präzise festgelegten, limitierten Bedingungen. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom ein höchst dynamischer Prozess. Die Proteomanalyse in Form der 2D-Gelelektrophorese ist also nur als subtraktives Verfahren sinnvoll, indem die Proteinexpression zweier oder mehrerer genau definierter Stoffwechselsituationen des selben Zelltyps miteinander verglichen werden [92].

### Probenaufarbeitung:

Die Probenaufarbeitung beinhaltet die Lösung, Denaturierung und Reduktion der Proteine um jegliche Interaktionen zwischen ihnen zu unterbinden [93]. Eine ideale Probenaufarbeitung für 2D-PAGE hat eine komplette Zerstörung aller nicht-kovalent gebundenen Proteinkomplexe und eine Lösung individueller Polypeptide zur Folge. Die Proteinproben sollten so wenig wie möglich manipuliert und in einer geschlossenen Kühlkette bearbeitet werden, um artifizielle, durch die Probenaufarbeitung bedingte, Punkte auf den Gelen zu vermeiden [94]. So führt das Erhitzen von Proben, welche Harnstoff beinhalten, zur Carbamylierung der Proteine, wodurch Ladungsunregelmäßigkeiten auftreten können, die nicht reproduzierbare Ergebnisse liefern. Gewebeproben mit einem hohen Gehalt an DNA/RNA müssen mit proteasefreier DNase/RNase inkubiert werden, um horizontales Schmieren auf den Gelen zu vermeiden. Auch die Zerstörung der Proteinproben durch Proteasen muss bedacht werden. Als Folge dessen ist die Zugabe von Proteaseinhibitoren nötig, die ihrerseits wieder artifizielle Punkte verursachen können. Proteinextrakte sollten nicht weniger als 0,1 mg/ ml Protein und im Idealfall 1-5 mg/ ml Protein enthalten. Um gleich bleibende und vor allem vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen Gele einer Vergleichsgruppe mit derselben absoluten Menge an Protein beladen werden. Dies wird mit dem Erstellen einer Eichkurve und der Proteinbestimmung nach Popov erreicht [91].

### **Erste Dimension**

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) trennt die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgrund ihrer zwitterionischen Eigenschaft auf. In Abhängigkeit des umgebenden pH-Wertes tragen Proteine sowohl negative als auch positive Ladung. Der pI ist definiert als der spezifische pH-Wert, bei dem die Proteinladung gleich null ist. Für die Technik der IEF wird ein pH-Gradient erzeugt und die Proteine werden in einem Spannungsfeld zur Wanderung an den pH-Wert ihres pI angeregt.

Die Probleme der ersten Dimension bestehen in der Instabilität der pH-Gradienten, die mit so genannten Ampholyten gebildet werden. Durch längere Fokussierungszeiten kam es zum „Kathodendrift“, einer Verschiebung des pH-Gradienten in Richtung der Kathode und somit zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor. Das Problem der pH-Instabilität und der fehlenden Reproduzierbarkeit wurde durch die Einführung der immobilisierten pH-Gradienten (IPG) gelöst. In der aus Polyacrylamid bestehenden Gelmatrix wird ein immobilisierter pH-Gradienten durch kovalentes Verknüpfen von basischen und aziden Gruppen erzeugt. Das bis heute nur in wenigen Punkten geänderte Basisprotokoll für die IEF mit IPG

wurde 1988 von Görg et al. etabliert [95] und ermöglicht größere Reproduzierbarkeit und einen Vergleich der Ergebnisse. Zur Vorbereitung der ersten Dimension werden die *Strip holder* mit einer speziellen Reinigungsflüssigkeit (Fa. Amersham Pharmacia) gesäubert und an der Luft getrocknet. Die Proteinproben werden mit dem Rehydrierungspuffer vermischt.

	Endkonz.
Harnstoff	7 M;
Thioharnstoff	2 M;
CHAPS	2 %;
IPG Buffer	0,5 %;
Bromphenolblau; eine Spatelspitze	
Auffüllen mit Aqua dest. auf 25 ml	
Einfrieren bei – 80°C in 2,5 ml Proben	
Kurz vor Gebrauch: Zugabe von 7 mg DTT pro 2,5 ml Puffer	

**Tabelle 17: Ansatz des Rehydrationspuffers:** modifiziertes Amersham Pharmacia Biotech Protokoll (Berkelman und Stenstedt, 1998).

Das Probenvolumen richtet sich nach dem Proteingehalt der Proben und der Größe des Gelstreifens. Für einen analytischen Lauf werden 50 µg Protein pro 13 cm Gelstreifen geladen, wobei diese Menge für einen quantitativen Lauf verfünffacht wird. Das benötigte Gesamtvolumen, bestehend aus dem Rehydrationspuffer und der Probe zur Rehydratisierung eines 13 cm Gelstreifens, beträgt 250 µl. Der in der ersten Dimension verwendete Gelstreifen umfasst den pH-Bereich von 3-10 in linearer Einteilung. Nach dem Auftragen der Proben werden die Gelstreifen in dem *Strip holder* platziert, auf das IPGphor Gerät aufgesetzt, mit *Cover fluide* (Fa. Amersham Pharmacia), einem Mineralöl, überdeckt und das Protokoll für die erste Dimension wird gestartet.

Rehydration	12 h
150 V	2 h
500 V	1 h
1000 V	1 h
3000 V	2 h → insgesamt 7795 Vhr

**Tabelle 18: Protokoll für die erste Dimension für IPG-Phor:** modifiziertes Amersham Pharmacia Biotech Protokoll (Berkelman und Stenstedt, 1998).

Nach Beendigung der ersten Dimension werden die Gelstreifen entweder sofort 15 Minuten äquilibriert, um sie den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese anzupassen, oder in Zellkulturflaschen bei –80°C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt mit der zweiten Dimension fortzufahren.

## Zweite Dimension

In der zweiten Dimension werden die Proteine anhand ihrer molekularen Größe durch SDS-Gelelektrophorese separiert. Bei zusätzlicher Verwendung von Dithiothreitol (DTT) sind die Proteine durch die Zerstörung der Disulfid-Brückenbindungen vollkommen ungefaltet und werden in einem elektrischen Feld nur nach der Molekülgröße aufgetrennt. Die zweite Dimension wird mit zehnpromzentigen SDS-Gelen in der Größe 160x160x1 mm durchgeführt.

2-D SDS Gelkomponenten	für ein 10% iges Gel
30% Acrylamid / Bis 37,5:1)	16,65 ml
4X Resolving Gel Buffer	12,5 ml
Tris Buffer 1,5 M; 181,5 g	
Aqua dest. 750 ml	
Mit HCl auf pH 8,8 einstellen	
Mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen	
10 % SDS-Lsg.	500 µl
Aqua dest.	20,1 ml
Cross linker : 10% Ammoniumpersulfat*	250 µl
Cross linker : TEMED*	16,5 µl

**Tabelle 19:** Protokoll für ein 10%iges SDS-Gels der zweiten Dimension. Modifiziertes Amersham Pharmacia Biotech Protokoll (Berkelman und Stenstedt, 1998). (\*: Zugabe erst kurz vor dem Gießen des Gels).

Die Gelmatrix wird in die Gelkassetten eingebracht und zum Erreichen einer planen Geloberfläche mit N-Butanol überschichtet. Die Gele polymerisieren innerhalb von zwei Stunden. Damit ein problemloses Übertreten der Proteine von der ersten in die zweite Dimension erreicht wird, müssen die Gelstreifen der ersten Dimension vor dem Aufbringen auf die SDS-Gele äquilibriert werden. Pro Streifen der ersten Dimension werden hierzu 20 ml Äquilibrierungs-Puffer zugegeben und 15 min auf einem Schwenkschüttler äquilibriert. Nach den 15 min Äquilibrierung werden die Gelstreifen auf einen feuchten Rundfilter gelegt, um den Äquilibrierungs-Puffer ablaufen zu lassen.

	Endkonzentration
4X Resolving Gel Buffer	50 mM
Harnstoff	6 M
Glycerol 99 %	30 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	eine Spatelspitze
Aqua dest.	Auffüllen auf 200 ml
Einfrieren bei – 80 °C in 40 ml Proben	
Vor Gebrauch 100 mg DTT pro 10 ml Puffer zugeben	

**Tabelle 20: Protokoll für den Äquilibrierungs-Puffer:** nach Amersham Pharmacia Biotech (Berkelman und Stenstedt, 1998).

Nach dem Äquilibrieren werden die Gelstreifen der ersten Dimension auf die SDS-Gele aufgelegt und mit Agarose eingegossen. Dadurch wird ein Verrutschen der Streifen vermieden. Zugleich wird eine Tasche eingegossen, um einen Molekularmarker parallel mitlaufen lassen zu können (Low Range Marker 3µl, Fa. Bio-Rad).

Agarose	Endkonzentration
SDS-Elektrophoresepuffer	
Agarose	0,5 % (w/v)
Bromphenolblau	eine Spatelspitze
In der Mikrowelle in einer Glasflasche verflüssigen; nicht überkochen lassen	
In 2 ml Eppendorfgefäße bei Raumtemperatur aufbewahren	

**Tabelle 21: Protokoll für die Agarose:** nach Amersham Pharmacia Biotech (Berkelman und Stenstedt, 1998).

Jeweils zwei Gele werden in eine Gelkammer überführt.

### Starten der 2. Dimension.

In der zweiten Dimension werden die Proteine, die in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden, in vertikaler Richtung nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Das Protokoll der zweiten Dimension ist in zwei Schritte gegliedert: Der erste kurze Schritt ist zur Übertragung der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension gedacht. Der zweite Schritt mit höherer Ampere-Zahl dient der Auftrennung.

Schritt 1:	15 mA/ Gel	0:15 h
Schritt 2:	30 mA/ Gel	Auftrennung bis die Laufmittelfront das untere Gelende erreicht hat (ca. 4 h).

**Tabelle 22:** Protokoll für die zweite Dimension für eine Hoefer SE600 Kammer, modifiziertes Amersham Pharmacia Biotech Protokoll (Berkelman und Stenstedt, 1998).

Während der Auftrennung der zweiten Dimension werden die Gele mittels eines Durchlaufkühlers auf 17°C gekühlt, um eine Überhitzung der Gele zu verhindern und somit konstante experimentelle Bedingungen gewährleisten zu können. Nach Ende der zweiten Dimension werden die Gele entnommen und angefärbt.

### **Anfärbung der Gele:**

Silberfärbung: Für die Anfärbung von Gelen eines analytischen Laufes wird wegen der großen Sensitivität, die man sich allerdings mit einer geringeren dynamischen Breite erkaufte, die Silberfärbung (Fa. Amersham Pharmacia) verwendet. Die benötigten Reagenzien sind Inhalt des Silver Staining Kit Protein, bis auf Essigsäure (100 %) und Glycerol (99 %) (w/w). Die Gele werden für die Färbeprozedur in Glasauflaufformen (Fa.

Pyrex) überführt. Sie verbleiben während der gesamten Färbeprozedur in diesen Gefäßen. Die einzelnen Inkubationsschritte werden unter kontinuierlichem Schwenken auf einem Schwenk-Schüttler durchgeführt. Für ein Gel werden 250 ml der folgenden Lösungen benötigt. Die mit \* gekennzeichneten Reagenzien werden erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben.

		Endkonz.	Menge	Dauer
Fixierung	Ethanol	100 %	100 ml	30 min
	Essigsäure	100 %	25 ml	
	Aqua dest. auf 250 ml auffüllen			
Sensitivierung	Ethanol	100 %	75 ml	30 min
	Glutardialdehyde	25 % w/v *	1,25 ml	
	Natriumthiosulfat	5 % w/v	10 ml	
	Natriumacetat		17 g	
	mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen			
Waschen	mit Aqua dest.		250 ml	3X5 min
Silberreaktion	Silbernitrat Lsg.	2,5 % w/v	25 ml	20 min
	Formaldehyd	37 % w/v *	0,1 ml	
	mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen			
Waschen	mit Aqua dest.		250 ml	2x1min
Entwicklung	Natriumkarbonat		6,25 g	2- 5 min
	Formaldehyd	37 % w/v *	0,05 ml	
	Auffüllen mit Aqua dest. auf 250 ml			
Entwicklungsstop	EDTA-Na <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O		3,65 g	10 min
	Auffüllen mit Aqua dest. auf 250 ml			
Waschen	mit Aqua dest.		250 ml	3X5 min
Gel-Konservierung	Ethanol		75 ml	2X30 min
	Glycerol	99 % w/w	10,1 ml	
	Auffüllen mit Aqua dest. auf 250 ml			

**Tabelle 23: Färbeprotokoll:** nach Amersham Pharmacia Biotech (Introductions for Silver Staining Kit Protein).

Am Ende der Färbung werden die Gele mittels eines haushaltsüblichen Folien-schweißgerätes in Kunststoff-Klarsichthüllen (Fa. Folex) luftdicht eingeschweißt und bis zur weiteren Auswertung flach gelagert.

**Coomassiefärbung:** Gele eines präparativen Laufes werden zur Vorbereitung auf die sich anschließende Weiterverarbeitung mittels Massenspektrometrie mit Coomassie gefärbt. Die Färbung wird ebenfalls in Glasformen auf einem Schwenk-Schüttler durchgeführt. Für das Färbeprotokoll werden pro Gel je 500 ml der Reagenzlösungen benötigt. Nach der zweistündigen Fixation (Methanol 40 % (v/v), Eisessig 10 % (v/v), Aqua dest.) werden die Gele in Aqua dest. gewaschen (3x20 min). In einem sich anschließenden Äquilibrierungsschritt (Phosphorsäure 2 % (v/v), Methanol 10 % (v/v), Aqua dest.) werden die Gele weitere zwei Stunden inkubiert. Der nun folgende Färbeschritt wird, je nach Färbeintensität, zwischen 12 und 24 Stunden durchgeführt.

	Endkonzentration
Phosphorsäure (85 %)	2 % (v/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
Serva Blau G	0,1 %
Aqua dest.	

**Tabelle 24:** Protokoll für die Coomassie-Färbelösung.

Der abschließende Waschschrift wird über 30 Minuten, mit einer Natriumacid-Lösung zu 0,1 % durchgeführt, um eine Verkeimung der Gele im weiteren Verlauf zu verhindern.

### ***Auswertung der Gele:***

Die fertig gefärbten Gele werden mit einem Scanner mit Durchlichteinheit (Fa. AGFA) eingescannt und digitalisiert. Die Gele, die mittels der Silberfärbung angefärbt wurden, werden mit der Proteomweaver Software (Fa. Definiens) ausgewertet. Hierbei werden die einzelnen Spots der Gele detektiert und optisch-densitometrisch vermessen. Dies lässt im Weiteren einen Vergleich der Gele verschiedener Gruppen, sowohl bezüglich der stärkeren oder schwächeren Ausprägung eines Spots, als auch des Neuauftretens eines Spots in einer der Gruppen zu. Des Weiteren erlaubt die Proteomweaver Software die Durchführung statistischer Tests und somit die Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen einzelnen Punkten in den Gelen unterschiedlicher Gruppen. Sobald die computergestützten Auswertungen beendet sind, kann man die mit Coomassie gefärbten Gele weiterverarbeiten.

### 2.2.4.6 2D Western Blot Analysen mit phosphosensitiven Antikörpern

Die, durch die 2D-Gelelektrophorese, erhaltenen Gele wurden anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid Membran transferiert (siehe auch 2.2.4.2). Die Membran wurde wie unter 2.2.4.4 beschrieben mit Antikörpern detektiert. Nur mit dem Unterschied das, als Blockierungslösung eine fünf prozentige BSA Lösung verwendet wurde. Dazu werden 5 g BSA in 100 ml TBST gelöst. Diesmal kamen phosphosensitive Antikörper zum Einsatz, die gegen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin gerichtet sind. Die optimale Antikörperkonzentration ist unten angegeben. Nach Detektion, mittels Antikörper, folgt anschließend die Chemilumineszenzreaktion mit ECL Plus™ (Amersham), entsprechend der Angabe des Herstellers. Das emittierte Licht, der Wellenlänge 466 nm, wurde mit geeigneten Filmen (Hyperfilm™ECL™, Amersham) detektiert. Das Einwirken von ECL Plus™ auf die Membran führt zu Lichtsignalen, die auf einem Film detektiert werden können. Der Film wurde dann eingescannt und mit der Analyse Software Proteomweaver ausgewertet. Die veränderten Spots wurden aus einem Coomassiegel wie unter 2.2.4.7 Identifizierung der Gele beschrieben ausgestochen und bearbeitet.

optimale Antikörperkonzentration:

	Primär- Antikörper	Sekundär- Antikörper
Phosphothreonin (Kit)	1:100	1:15 000 (goat anti mouse IgM H&L chain HRP 1:1 mit rat mab anti mouse IgG1 HRP)
Phosphotyrosin (Kit)	1:500	1:10 000 (rat mab anti mouse IgG1 HRP)
Phosphoserin (Kit)	1.500	1:10 000 (rat mab anti mouse IgG1 HRP)

### 2.2.4.7 Identifikation einzelner Proteine mittels Massenspektrometrie

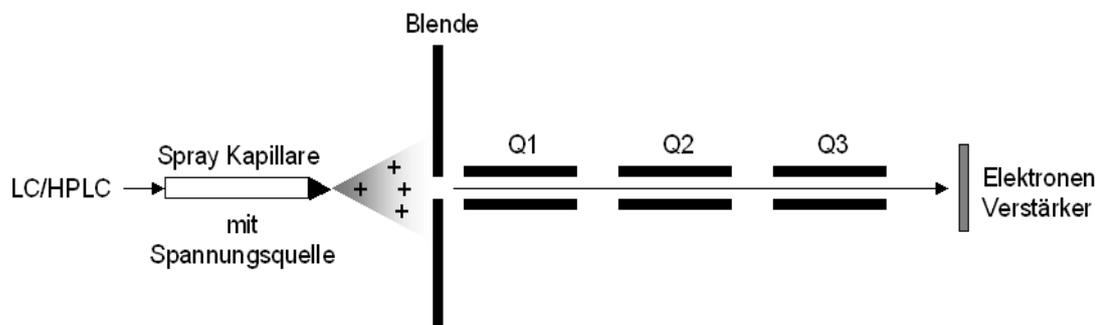
#### Prinzipien der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, die der Identifizierung von organischen Molekülen dient. Anhand des Massenspektrums einer Substanz sind Rückschlüsse auf die Struktur der Verbindung möglich. Die Empfindlichkeit der Massenspektrometrie ist unter anderem abhängig von zusätzlichen Trenn- und Reinigungsmethoden (z.B. Chromatographie) und liegt im Bereich von 0,5 mg bis zu einigen Pikogramm. Unter Anlegen eines hohen elektrostatischen Potentials und mit aus einer Ionenquelle (Heizdraht) stammenden Elektronen wird die Probe im Hochvakuum beschossen, beschleunigt

nigt und die Moleküle in Ionen überführt. Die instabilen Ionen zerfallen in geladene und ungeladene Fragmente. Hierbei werden in einem Molekül bestimmter Struktur nur bestimmte Bindungen bevorzugt gespalten, so dass ein Muster charakteristischer Bruchstücke entsteht. Die beschleunigten geladenen Fragmente werden in einem elektromagnetischen Feld nach ihrer Masse aufgetrennt. Man erhält ein Massenspektrum mit der Darstellung der Fragmentmassen und ihrer relativen Intensitäten.

***NanoLC/ESI-MS/MS (nano liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry)***

Bei der ESI-MS (Abbildung 2-1) [96] wird eine flüssige angesäuerte Proteinprobe mit einem organischen Lösungsmittel versprüht und mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes im Hochvakuum fein zerstäubt. Durch das Abdampfen des Lösungsmittels werden die Proteintröpfchen immer kleiner und die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der Protein-Ionen immer stärker. Es kommt schließlich zur „Coulomb-Explosion“, die zur Bildung von Mikrotropfen führt. Die Ionen werden zum Massenspektrometer weitergeleitet, wo sie mit einem Quadrupol-Analysator detektiert werden. Dies ist ein Massensfilter der unter bestimmten physikalischen Bedingungen nur Ionen bestimmter Masse passieren lässt. Durch kontinuierliche Änderung der Bedingungen ist eine sequenzielle Bestimmung von Ionen verschiedener Masse möglich. Um die Methode zu verfeinern, werden hochkonzentrierte Lösungen mit sehr niedrigen Flussraten im Bereich von nl/min verwendet (nanospray).



**Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines ESI-Massenspektrometers.** Die flüssigen Proben (LC/HPLC) werden kontinuierlich durch die Kapillare eingespritzt. Die ionisierten Moleküle gelangen durch das Hochvakuum zum Quadrupol-Analysator (Q1-Q3). Die Quadrupole Q1 und Q2 lassen alle Ionen passieren. Q3 selektiert und ist nur für Ionen einer bestimmten Masse durchlässig. Hier werden die aktuellen Massen auch detektiert.

Eine Alternative zum Quadrupol-Analysator ist der so genannte *ion-trap*. Hier werden die Ionen in einem stabilen elektrischen Feld gefangen, beschleunigt und an einem Detektor, zehn mal schneller als mit dem Quadrupol-Analysator, analysiert. Lässt man die Ionen im *ion-trap* mit hoher Geschwindigkeit mit Argon-Gas kollidieren, so können

die entstehenden Fragmente einzeln analysiert werden und man erhält Informationen über die Struktur der Proteine. Zusätzlich kann durch eine dem Spray vorgeschaltete Chromatographieeinheit (HPLC) ein Stoffgemisch besser getrennt und in der MS besser und schneller untersucht werden. Die Massenspektren werden abschließend über ihre Sequenzen („Sequenztags“) computergestützt ausgewertet, Peptide werden analysiert und wenn möglich identifiziert.

### Identifizierung der Proteine

Aus Coomassie-Gelen werden diejenigen Punkte, die in der Computeranalyse auffällig erscheinen ausgeschnitten und die Proteine aus den ausgeschnittenen Punkten extrahiert. Hierzu werden die ausgeschnittenen Spots zerkleinert, zweimal mit einer 10 mM Ammoniumbicarbonat  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und ein weiteres mal mit 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 50 % Acetonitrillösung (ACN) gewaschen und geschüttelt. Die Gelstücke werden nun mehrmals mit hundertprozentiger ACN oder Reaktionspuffer (2 % ACN in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung [pH 8,5]) geschüttelt, für eine Minute bei 9200 U/ min zentrifugiert, die Überstände jeweils verworfen und schließlich für 45 min getrocknet. Es schließt sich der Trypsinverdau (Roche, Mannheim) an. Hierbei werden die Gelstücke mit Trypsinlösung (25  $\mu\text{g}$  Trypsin wird in 100  $\mu\text{l}$  0,01 % Trifluoressigsäure [TFA] gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer bis zu einer Endkonzentration von  $c_{\text{Trypsin}}=4$  pmol/ $\mu\text{l}$ ) überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als nächste Schritte werden jeweils zweimal HCOOH und ACN zugesetzt, geschüttelt, zentrifugiert und die Überstände abpipettiert und gesammelt. Zum Abschluss werden die vereinigten Überstände zur Trocknung einrotiert.

Zur Durchführung einer nanoHPLC/ESI-MS/MS (nano high performance liquid chromatographic elektro-spray ionisation tandem mass spektrometry) müssen die gewonnenen Peptide weiter verarbeitet werden. Die Peptide werden mittels *reversed phase* Chromatographie mit einer 75  $\mu\text{m}$  i.d. HPLC-Säule (RP18-3, 100 Å) von 15 cm Länge, 3  $\mu\text{m}$  dC18 Atlantis NanoEase™ (Fa. Waters, USA) aufgetrennt. Hierzu werden der mit einer Eldex HPLC Pumpe (Fa. SunChrome, Friedrichsdorf) erzeugte Fluss der Gradientenlösungsmittel von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit einem so genannten split-system (Valco 4-Wege-Ventil) auf einen Säulendurchfluss von 150 nl/ min reduziert. Ein Gradient von 5-60 % der Lösung A und B (A: 5 % ACN, 95 % 0,1 % v/v Methansäure; B: 95 % ACN, 5 % 0,1 % v/v HCOOH) wird für die Chromatographie der trypsin-verdauten Peptide ausgewählt. Die Analyse der getrennten Peptide wird mit einem LCQ *classic ion trap* Massenspektrometer (Fa. ThermoFinnigan, San Jose, USA) durchgeführt. Die Quellenspannung der Elektronenquelle liegt bei 1,1 KV. Als Spraynadel kommt eine vergoldete Glaskapillare (Fa. New Objective, Inc.) zum Einsatz. Das MS-Instrument wird so pro-

grammiert, dass Peptidfragmente, welche eine Signalintensität von mindestens  $0,9 \times 10^4$  (*superscript: 4*) *counts*, ein Maß für die Fragmentgröße, im *full-scan mode* übersteigen, für zwei Tandem-MS-Experimente (MS/MS) selektiert werden. Nach einem weiteren MS-Experiment wird dann die zweitintensivste Komponente für ein Tandem-MS-Experiment herangezogen, vorausgesetzt auch sie übersteigt den vorher programmierten Grenzwert der Signalintensität. Diese Zyklen werden wiederholt um eine maximale Ausbeute und maximale Qualität an Information zu bekommen. Die Peptide werden anschließend über ihre Sequenzen (*sequenztags*) mit dem Suchprogramm MASCOT auf Homologie mit anderen Peptiden analysiert und wenn möglich identifiziert.

### 2.2.5 FACS Analysen

Die Voraktivierung der Thrombozyten durch die Präparation wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie festgestellt. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die automatisierte Analyse von Fluoreszenzintensitäten und Lichtstreuung bzw. Lichtbrechung einzelner Zellen innerhalb heterogener Zellgemische. Hierbei ist die gleichzeitige quantitative Erfassung mehrerer biochemischer und biophysikalischer Parameter einer einzelnen Zelle unter der Voraussetzung möglich. Grundlage für die Durchflusszytometrie ist die Möglichkeit Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch mit einem zu untersuchenden Molekül zu verknüpfen. Dabei spielt der Einsatz von Antikörpern, die oft hochspezifisch ihre Antigene erkennen, in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern eine große Rolle. Neben Antikörpern können beispielsweise auch nukleinsäurebindende Farbstoffe oder Farbstoffe, die ihr Fluoreszenzverhalten durch Bindung an intrazelluläre Ionen verändern, zum Einsatz kommen. Die Durchflusszytometrie besitzt gegenüber anderen fluorimetrischen Methoden mehrere Vorteile:

- 1) Die computergesteuerte Quantifizierung der Fluoreszenzsignale einer sehr großen Anzahl von Zellen – bis zu mehreren tausend Zellen in der Sekunde – führt zu einer großen statistischen Aussagesicherheit.
- 2) Die Durchflusszytometrie liefert nicht nur einen Durchschnittswert für das zu untersuchende Zellgemisch, sondern eine Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen, die auch eine Unterscheidung von Subpopulationen ermöglicht.
- 3) Außerdem können durch die gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter einer einzelnen Zelle Signale eindeutig miteinander verknüpft werden.

## Aufarbeitung der Thrombozytenproben zur Bestimmung von Oberflächenmarkern

Die Präsentation von Oberflächenmarkern wie GP IIb/IIIa geben Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus der Thrombozytenpräparation. Die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors wurde mit dem PAC-1 Antikörper (CD-41) von Becton Dickinson festgestellt. Dabei wurden Messungen im Vollblut, aber auch mit gereinigten Thrombozyten durchgeführt. Bei den Vollblutmessungen wurden jeweils 10 µl Vollblut mit 50 µl modifizierten Tyrode-Puffer versetzt.

Tyrodes Puffer pH 7,4	
NaCl	137 mM
KCl	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM
BSA	0,35 %
Hepes	10 mM
Glucose	5,5 mM

**Tabelle 25: Tyrodes Puffer Zusammensetzung**

Von diesem Puffer-Blutgemisch wurden 12 µl abgenommen und mit 4 µl PAC-1 Antikörper für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Fixierung mit 125 µl Tyrode und 125 µl zweiprozentigem Paraformaldehyd. Im Fall von gewaschenen Thrombozyten werden 10 µl der Thrombozytensuspension mit 20 µl PAC-1 inkubiert und nach 15 Minuten mit 250 µl zweiprozentigem Paraformaldehyd fixiert.

### Messungen am Durchflusszytometer

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACS-Scan Durchflußzytometer von Becton Dickinson mit einem Argon-Laser (Anregungswellenlänge 488 nm) sowie einem Diodenlaser (Anregungswellenlänge 630 nm) eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei niedriger Durchflussrate und die Proben wurden so verdünnt, dass eine maximale Zählrate von 2000 Ereignissen pro Sekunde nicht überschritten wurde.

Alle Photodetektoren wurden auf logarithmische Verstärkung eingestellt. Die Verstärkungen der Signale von *Forward Scatter* und *Side Scatter* wurden so eingestellt, dass die Messwerte der Thrombozyten für beide Parameter im Mittelfeld der logarithmischen Skalen lagen (FSC: E00, SSC: 337 V). Die Thrombozytenpopulation wurde durch eine Färbung gegen das Glycoprotein IIb/IIIa als spezifischen Thrombozytenmarker identifiziert.

In der FSC-SSC-Auftragung wurde die Thrombozytenpopulation durch das Setzen eines Analysefensters eingegrenzt. Das Fenster wurde eng um die unstimulierte

Population gesetzt und auch bei der Analyse aktivierter Thrombozyten unverändert beibehalten. Bei allen Messungen wurden nur Signale innerhalb dieser Grenzen ausgewertet. Dadurch wurde verhindert, dass Mikropartikel und Mikroaggregate, die sich in aktivierten Thrombozytenproben bilden können, zu verfälschten Signalen führen. Mikropartikel, die sich im FSC-SSC-Diagramm links unterhalb des Thrombozytenfensters befinden, weisen aufgrund ihrer geringeren Größe kleinere Fluoreszenzwerte auf. Kleine Thrombozytenaggregate hingegen, die sich rechts oberhalb des Thrombozytenfensters befinden, führen zu überhöhten Fluoreszenzsignalen, da hier die Fluoreszenzintensität mehrerer Zellen gleichzeitig überlagert wird. Die Verstärkung der Fluoreszenzsignale in den einzelnen Fluoreszenzkanälen wurde für jede Färbemethode so gewählt, dass das Signal der unstimulierten Thrombozytenprobe bei logarithmischer Verstärkung einen mittleren Fluoreszenzwert zwischen 10 und 20 erhielt. Alle Proben einer Messreihe wurden bei identischen Geräteeinstellungen gemessen.

Für jede Messung wurden 20000 Zellen analysiert. Die Messungen und die Auswertungen der Daten erfolgten mit dem Programm *CellQuest*. Ausgewertet wurden die Fluoreszenzmessungen in Form von Histogrammen, in denen die Fluoreszenzintensität als Abszisse und die Anzahl der Zellen als Ordinate aufgetragen wurden. Aus den Histogrammen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Thrombozyten einer Probe berechnet. Diese Mittelwerte dienen als Maß für die Menge der gebundenen Antikörper.

### **2.2.6 Thrombozytenaggregationsmessung**

Die Thrombozytenaggregation wird aus dem plättchenreichen Plasma bestimmt. Dabei wird von gesunden Probanden, die keine Thrombozytenfunktion beeinflussende Medikamente in den letzten zwei Wochen genommen haben, Blut abgenommen. Die Messung wurde frühestens eine Stunde nach Blutabnahme durchgeführt. Zuvor wird das Blut bei 200 x g für 15 Minuten zentrifugiert, das entstandene plättchenreiche Plasma (PRP) wird abgenommen und bis zum Gebrauch bei 37°C gelagert. In einem weiteren Zentrifugationsschritt wird bei 900 x g für 15 Minuten das plättchenarme Plasma (PPP) gewonnen. Da plättchenreiches Plasma eine geringe Durchlässigkeit für langwelliges Licht aufweist, plättchenarmes Plasma dagegen dieses Licht praktisch ungehindert durchlässt, kann die prozentuale Lichtdurchlässigkeit eines Plasmas als Maß für die Aggregation verwendet werden.

Zu Beginn der Aggregationsmessung wird das PRP auf  $2 \times 10^8$  Thrombozyten pro Milliliter mit PPP eingestellt. Die turbidimetrische Messung nach der Methode von Born [97], erfolgt in einem Appact 4 (Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer). Um eventuell auftretende Transmissionsunterschiede auszugleichen wird das

PRP auf einen Wert von 0 % Transmission und das nach vollständiger Aggregation entstehende PPP auf den Wert von 100 % Transmission eingestellt. Die Aggregation wird durch Zugabe von ADP, Kollagen oder bakterieller Toxine induziert. Für jede Messung werden 250 µl vom PRP benötigt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Induktoren versetzt werden. Die Messung endet automatisch nach drei Minuten und die Aggregation wird als Prozentwert am Computer ausgegeben.

### 2.2.7 RNA Extraktion

Zur Isolierung der RNA aus Thrombozyten wurden die Plättchen aus dem PRP gewonnen. Dabei macht man sich die wasserunlöslichen Eigenschaften der RNA zunutze. Die Zellen werden lysiert, die RNasen inaktiviert und die RNA anschließend isoliert. So erhält man am Ende ein Gemisch aus ribosomaler RNA, Transfer-RNA, *messenger* RNA (m-RNA) und anderen. An dieser Stelle werden die Eigenschaften des Lösungsmittelgemisches ausgenutzt: so lysiert das Guanidinisothiocyanat nicht nur die Zellen, sondern denaturiert die Proteine und inaktiviert sogar die RNasen. Mit der phenolischen Komponente entfernt man Proteine und kleinere DNA-Fragmente. Durch Zugabe von Chloroform bildet sich ein Drei Phasen-System. In der organischen Phase befinden sich die Proteine, in der Interphase die DNA und in der oberen wässrigen Phase die RNA.

Diese *singel- Step-Methode* wird wie folgt durchgeführt. Das Pellet wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 250 µl Trizol®, einer monophasischen Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, versetzt. Nachdem das Homogenat 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, wurden 50 µl Chloroform zugegeben und für 5 min geschüttelt. Es schließt sich ein 15 min Zentrifugationsschritt (12000 g, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417 R) an. Man erhält drei Phasen: in der obersten befindet sich die RNA, in der trüben bis weißlichen Interphase die DNA und in der untersten roten Phase das Protein Phenol-Chloroformgemisch.

Die klare obere Phase wird vollständig abpipettiert und die RNA mit 125 µl (eiskalten) Isopropanol gefällt. Danach wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die RNA präzipitiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 g, 4°C, 15 min) sedimentiert die RNA auf den Grund des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig vom entstandenen Pellet abgehoben, darauf folgten zwei Waschschrte mit je 250 µl 75 % Ethanol (reiner Alkohol + DEPC Wasser). Das nun gewaschene RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 25 µl DEPC Wasser resuspendiert und für 5 min auf 55°C erhitzt. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mittels Nanotrop® photometrisch bei 260 nm gemessen. Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und

der Quotient OD 260/ OD 280 gebildet. Verunreinigungen durch Proteine würden sich in einem niedrigeren Quotienten widerspiegeln. Eine hinreichend reine RNA liegt dann vor, wenn die Ergebnisse zwischen 1,6 und 2,0 liegen [98]. Die Qualität wurde mit einem einprozentigen Agarose Gel kontrolliert. Die RNA wurde bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.8 Reverse Transkription (RT)

Die gesamte RNA wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für eine RT wurde folgender Ansatz verwendet:

Kits:

1. Omniscript® reverse transcription
2. oligo dT Primer 10 µM
3. RNAse Inhibitor 10 U/ µl

Reverse Transkription Komponenten	RT Ansatz
10fach Puffer RT	2 µl
dNTP-Mix (5mM each dNTP)	2 µl
Oligo dT-Primer 10µM	2 µl
RNAse Inhibitor 10U/µl	0,4 µl
H <sub>2</sub> O RNAse-frei	0,6µl
Omniscript rev. Transkriptase	1 µl
m-RNA	

**Tabelle 26: RT Komponenten**

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, dann für eine Minute auf 95 °C erhitzt, um die Transkriptase zu inaktivieren, und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

### 2.2.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung der DNA. Sie beruht auf einem immer wieder kehrenden Zyklus aus drei Schritten:

1. Denaturierung:

Dabei trennen sich bei 94 °C die beiden Stränge der c-DNA Stränge.

2. Hybridisierung:

Bei 55 °C lagern sich die im Überschuss vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige c-DNA.

3. Verlängerung:

Die Temperatur wird nun wieder auf 72 °C, das Temperaturoptimum

der Polymerase, erhöht und es werden weitere Nukleotide an die entstehenden DNA-Stränge angebaut.

Kits:

1. Hot Star Taq Plus (Qiagen Catalog no. 203603/6)
2. dNTP-Mix 10mM of each (Fermentas Catalog no. R0192)
3. Primer sense und antisense (forward und reverse) (MWG-Biotech AG)

### Protokoll

- PCR-Ansatz (25 µl): Aqua bidest. 25,6 µl

10x Taq-Puffer 5,0 µl

dNTP (jedes dNTP 0,125 mmol/l) 8,0 µl

Primer (*sense*) (5 µmol/l) 3,0 µl

Primer (*anti sense*) (5 µmol/l) 3,0 µl

Primer für Bcl3

*sense* 5'-TCA AGA ACT GCC ACA ACG ACA C-3'

*anti sense* 5'-CTG GGG TCA GAG TCC TGG GAG -3'

AmpliTaq Gold (10 U/µl) 0,4 µl

Genomische DNA 5,0 µl

- Programm Thermocycler :

a) Aktivierung der Taq-Gold : 96 °C — 10 Min.

b) 35 Reaktionszyklen jeweils bestehend aus :

Denaturierung: 94 °C - 20 sec.

Annealing: 62 °C - 30 sec.

Extension: 72 °C - 40 sec.

c) Elongation: 72 °C -10 min

Halt: 25 °C - unendlich

- Für den Verdau wurden 7 µl PCR-Produkt, 1 µl NEB<sub>2</sub>-Puffer, 1 µl BSA (10x) und 1 µl Mnl in ein 0,65 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

- Inkubation über Nacht (mind. 4 h) bei 37 °C im Thermoblock.

- Zur Detektion wurde der Verdau mit 2 µl Probenpuffer versehen und auf ein 3 % TAE-Gel aufgetragen. Als Standard diente MW 5: 1 µl Standard, 9 µl Aqua.dest. und 2 µl Probenpuffer mischen.

- Auftrennen bei 120 V für ca. 30 Minuten und Sichtbarmachung im UV-Licht, Photodokumentation.

PCR-Komponenten	50µl PCR Ansatz
10 fach Coral Load Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix 10mM of each	1,0 µl
Primer sense	0,5 µl
Primer antisense	0,5 µl
Taq Plus DNA Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O RNase-frei	40,25 µl
cDNA (siehe 2.2.6)	2,5 µl

**Tabelle 27: PCR Ansatz**

### 2.2.10 Agarosegel-Elektrophorese

Das Verfahren der Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Darstellung von PCR-Produkten verwendet. Hierbei kam es durch das Anlegen einer definierten Spannung zur Wanderung negativ geladener Nukleinsäurefragmente im elektrischen Feld. Aufgrund ihrer Größe und Ladung bewegten sich die einzelnen Fragmente unterschiedlich schnell zur Anode, so dass eine analytische Auftrennung ermöglicht wurde. Die Elektrophorese wurde in einer neutralen, Ethidiumbromid enthaltenden Gelmatrix durchgeführt. Ethidiumbromid bindet unspezifisch an Nucleinsäuren und dient somit der Sichtbarmachung der einzelnen Fragmente im UV-Licht (254 nm). Die verwendete Agarose, sowie die Konzentration der Gelmatrix variierten in Abhängigkeit der Größe des PCR-Produktes.

#### Protokoll

Die entsprechende Agarosemenge wird im benötigten Volumen TBE- bzw. TAE-Puffer aufgenommen und durch Erhitzen auf dem Magnetrührer gelöst (50 ml 1% Gel: 0.5 g Agarose). Die Agarose kurz aufkochen lassen, anschließend 2,5 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid pro 25 µl Gel zugeben. Die flüssige Agarose blasenfrei in Gelschlitten gießen, ca. 30 Minuten abkühlen lassen. In die ausgekühlten Geltaschen 12 µl bestehend aus 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Probenpuffer pipettieren. Als Standard: 1 µl Standard, 9 µl Aqua. bidest. und 2 µl Probenpuffer mischen. Bei einer Spannung von ca. 80-120 V erfolgt die Auftrennung für etwa 30 Minuten bis eineinhalb Stunden. Die Banden werden im UV-Licht sichtbar gemacht anschließend erfolgt die Photodokumentation.

<b>Reagenzien</b>	
<b>Tris-borat-EDTA (TBE)-Puffer (pH 8,0)</b>	
Tris	45 mM
Borat	45 mM
EDTA	1 mM
A.bidest.	ad 1000 ml
<b>Tris-acetat-EDTA (TAE)-Puffer (pH 7,2)</b>	
Tris	40 mM
Eisessig	12 %
EDTA	1 mM
A.bidest.	ad 1000 ml
<b>Probenpuffer</b>	
40 % Saccharose-Lösung	0,9 ml
0,25 % Bromphenolblau-Lösung	0,9 ml
EDTA (0,5 M) Lsg. pH 8,0	0,1 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	

Tabelle 28: Agarose Elektrophorese Komponenten

### 2.2.11 Clot Retraction

In der Endphase der Blutgerinnung erfolgt ein Zusammenziehen des Blutgerinnsels, durch die Verkürzung der Fibrinfäden, unter Auspressung von Serum. Dieser Vorgang wird als *Clot Retraction* bezeichnet. Das Zusammenziehen wird durch Thrombasthenin bewirkt und ist abhängig von der Thrombozytenzahl sowie der Fibrinpolymerisation. Für die Versuche zur *Clot Retraction* wurden gewaschene Plättchen eingesetzt, welche in M199 resuspendiert sind und auf eine Zahl von  $2 \times 10^8$  Zellen/ ml eingestellt wurden. Zu diesen Zellen wurde dann  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) und Fibrinogen (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugegeben. Das Ganze wurde für einen Zeitraum von zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  gerührt. Das absolute Versuchsvolumen war ein Milliliter. Für die Aggregationinduzierung wurde Thrombin (1 U/ml) bzw.  $\alpha$ - Toxin (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet. In einigen Experimenten wurden die Thrombozyten für 30 Minuten mit Rapamycin vor inkubiert und dann in den Versuchsaufbau gebracht. Nach Zugabe von Thrombin bzw.  $\alpha$ - Toxin war die Ausbildung von Fibringelen zu beobachten. Die *Clot Retraction* wurde fotografisch überwacht, dabei wurden alle 15 Minuten Fotos gemacht. Um die Stabilität der entstanden Clots zu testen, wurde die Suspension zweimal leicht geschwenkt.

### 2.2.12 Fluoreszenz Mikroskopie (Immunzytochemie)

In den Suspensionsexperimenten werden ruhende oder Toxin stimulierte Thrombozyten mit Fibrinogen kokultiviert. Die Stimulation der Thrombozyten erfolgte mit 0,5 U/ml  $\alpha$ -Toxin und 0,1  $\mu$ g/ml LPS für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>- Atmosphäre. Die Zellen werden mit zweiprozentigem Paraformaldehyd fixiert und auf Vectabond™ beschichtete Deckgläschen durch eine Zytospin Zentrifuge aufgebracht. Mit Alexa Fluo® 488 Phalloidin werden die F- Aktin Filamente angefärbt und Alexa Fluor® 555 färbt die Sialinsäure in den Granula an. Die Adhäsions-Experimente werden in Achtloch Chamberslides aus Borosilikat, welche mit Fibrinogen oder Kollagen beschichtet sind, durchgeführt. Für vier Stunden werden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert und in einigen Versuchsreihen werden die Zellen zusätzlich mit  $\alpha$ -Toxin stimuliert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Olympus IX81, FV300 mit konfokal Ausrüstung und 60 x/1.42 NA Öl durchgeführt. Mit einer Olympus FVS-PSU/IX2-UCB Kamera mit entsprechender Software wurden die Bilder aufgenommen.

### 2.2.13 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse im Text und in den Graphiken, Schaubildern und Tabellen sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) von n unabhängigen Experimenten. Die statistischen Analysen wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. In den Abbildungen wurde zusätzlich noch angegeben, ob die entsprechenden p-Werte für Paarvergleiche  $<0,05$  sind.

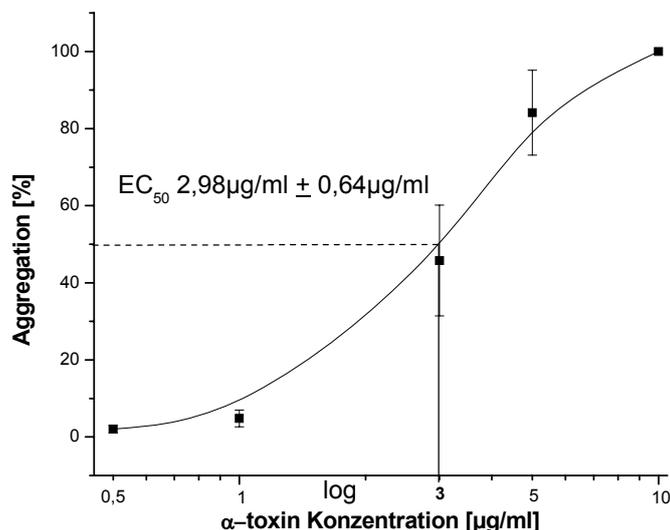
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Thrombozytenaktivierung

#### 3.1.1 Staphylococcus aureus $\alpha$ -Toxin induzierte Aggregation

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass *Staphylococcus aureus* die Plättchenaggregation induzieren kann [99]. Siegel und Cohen konnten als erste zeigen, dass das  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* die Plättchenaggregation auslöst. Sie beschreiben einen *shape change* an isolierten Plättchen, die mit  $\alpha$ -Toxin behandelt wurden. Dem *shape change* folgt die Freisetzung prokoagulatorischer Faktoren aus den Thrombozyten Granula. Mit der Freisetzung der Faktoren verlieren die Thrombozyten gleichzeitig Kaliumionen und NAD, es konnte aber keine Zelllyse beobachtet werden [100].

Nach Applikation von  $\alpha$ -Toxin in den Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  setzt sehr schnell die Aggregation ein und erreicht innerhalb von zwei Minuten ihr Maximum. Bei semilogarithmischer Auftragung der Konzentrationen ergibt sich folgender graphischer Verlauf (Abbildung 3-1), wobei der Wert der bei Applikation von 10  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin erreicht wurde einer 100 prozentigen Aggregation gleichgesetzt wird. Aus den Messung ergibt sich eine  $EC_{50}$  von 2,98  $\mu\text{g/ml} \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$ .

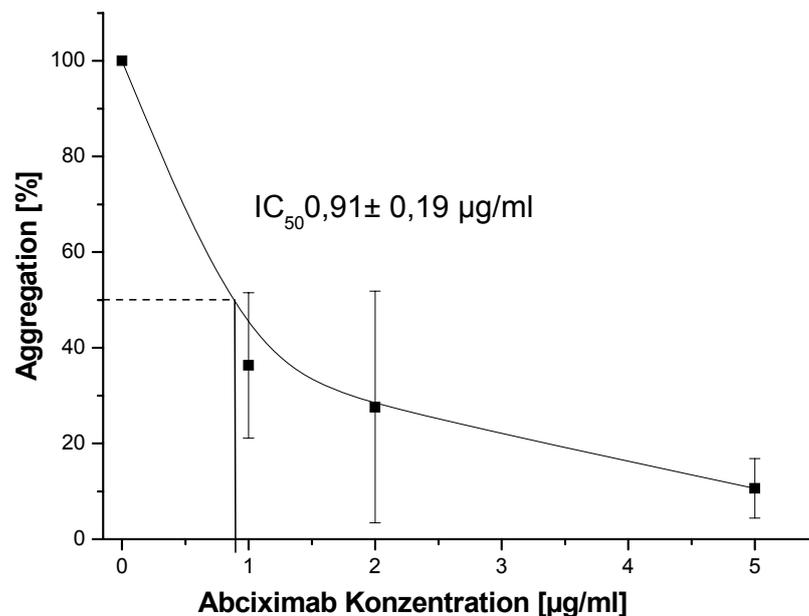


**Abbildung 3-1:** Aggregationskurve, welche mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Toxin Konzentrationen erreicht wurde. Der Wert von 10  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin wird einer 100 prozentigen Aggregation gleichgesetzt.

Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Toxin konnte mit LPS in verschiedenen Konzentrationen keine Aggregation erreicht werden.

### 3.1.2 Inhibierung, der durch $\alpha$ -Toxin induzierten Aggregation

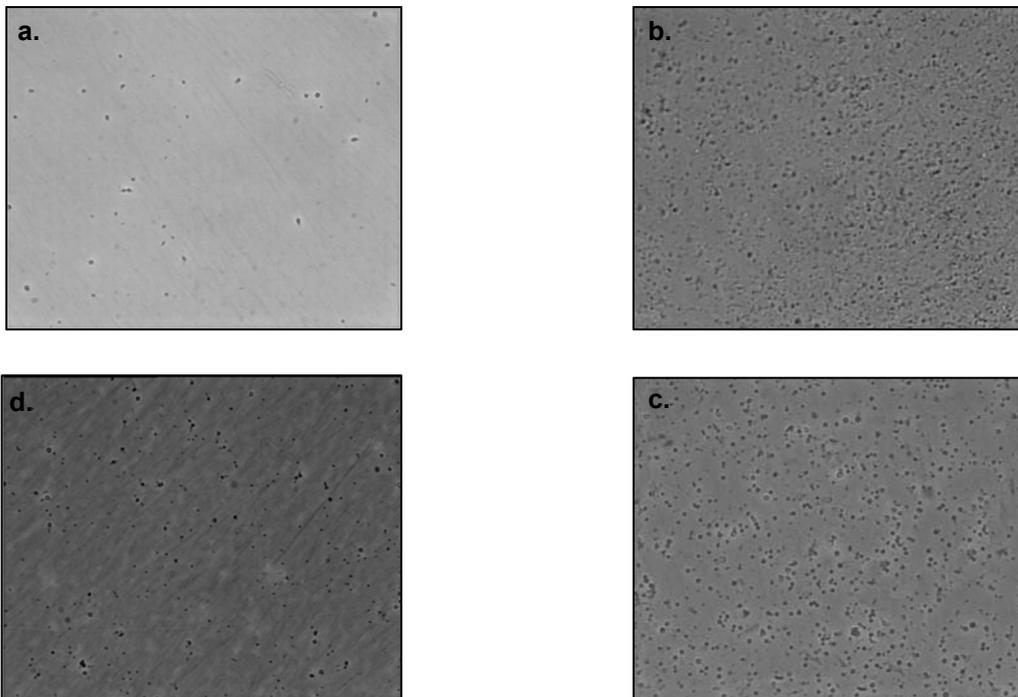
Die Aggregation der Thrombozyten, die als Folge der Aktivierung mit Freisetzung pro aggregatorischer Mediatoren aus den Thrombozyten Granula gesehen werden kann, kann durch verschiedene Inhibitoren unterbunden werden. Im heutigen Klinikalltag werden unterschiedliche Inhibitoren verwendet, z.B direkte Thrombozytenfunktions-Inhibitoren wie Acetylsalicylsäure, welche die Freisetzung von Thromboxanen aus den Thrombozyten unterbindet. Aber auch Rezeptorblocker wie die Thienopyridine Clopidogrel und Prasugrel, die die Aktivierung der Thrombozyten über den ADP- Rezeptor  $P_2Y_{12}$  verhindern. Als Folge der ADP induzierten Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Sekretion der  $\alpha$ -Granula. In den  $\alpha$ -Granula sind verschiedene Substanzen gespeichert (siehe Tabelle 1; Abschnitt 1.2.1) unter anderem auch Fibrinogen. Dieses dient als Brückenmolekül, in dem es zwei Thrombozyten über einen ihrer GP IIb/IIIa Rezeptoren miteinander verbindet. Durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers 7E 3 (Abciximab) wird die Bindung des Fibrinogens an dem GP IIb/IIIa Rezeptor unterbrochen. In den Experimenten, in denen mit  $5 \mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin die Aggregation ausgelöst wurde, konnte mit  $0,91 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$  Abciximab eine 50 prozentige Inhibierung der Aggregation erreicht werden. Dabei wurde die Gabe von  $0 \mu\text{g/ml}$  Abciximab auf 100 Prozent Aggregation gesetzt (siehe Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2:** Konzentrationsabhängige Inhibierung, der mit  $5 \mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin ausgelösten Aggregation.

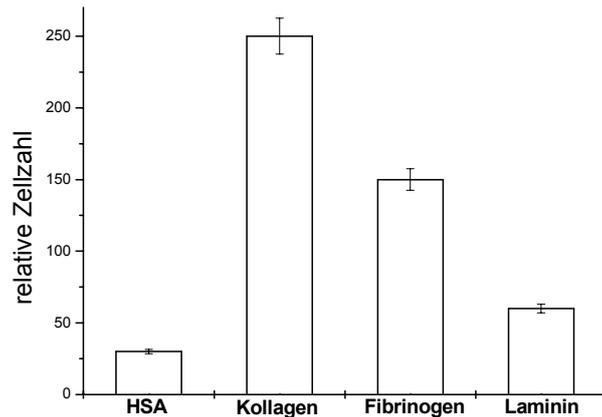
### 3.2 Adhäsionsexperimente

Die Adhäsionsexperimente wurden mit  $2 \times 10^8$  gereinigten Thrombozyten durchgeführt. Dabei wurde die Zellsuspension auf vorbeschichtete Zellkulturflaschen ausgebracht. Nach vier Stunden wurde die Suspension abgesaugt und die Kulturflaschen zwei Mal mit HBSS gewaschen. Die mikroskopischen Aufnahmen der adhärennten Zellen in Abbildung 3-3 wurden bei 40-facher Vergrößerung gemacht. Dabei wird eine große Varianz zwischen der als Kontrolle dienenden HSA Gruppe und den subendothelialen Matrices zu erkennen (siehe Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3:** (a) HSA; (b) Kollagen; (c) Fibrinogen; (d) Laminin

Für eine bessere Quantifizierung wird die relative Zellzahl bestimmt. Dabei wurde ein respektiver Ausschnitt von  $1 \times 1$  cm bei 40 facher Vergrößerung ausgezählt ( $n=3$  Experimenten). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-4 zu erkennen. Hier zeigt sich, dass die Thrombozyten verstärkt an Kollagen, gefolgt von Fibrinogen, adhären. Die Adhäsion an Laminin ist dem der HSA-Gruppe vergleichbar gering.



**Abbildung 3-4:** Auszählung der adhärennten Thrombozyten

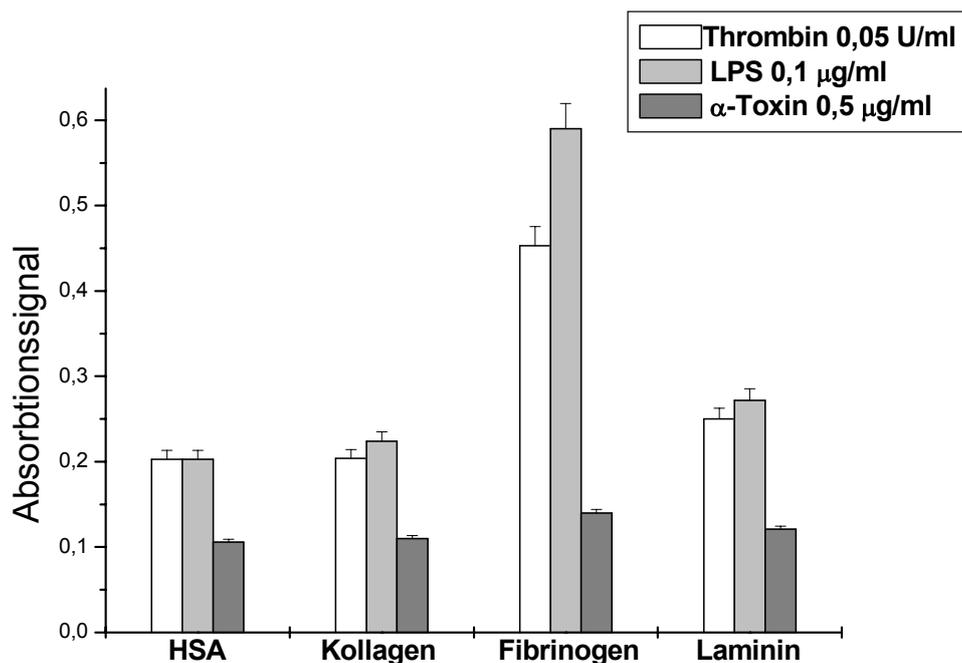
Die Abbildung 3.4 zeigt Thrombozyten, die auf beschichtete Zellkulturflaschen ausgebracht wurden. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass an das, als Kontrolle dienende, humane Serum Albumin (a) nur sehr wenige Thrombozyten adhärennt werden. Dass dennoch Plättchen sich anlagerten, ist auf die Voraktivierung der Thrombozyten bei der Isolation bzw. schon bei der Abnahme zurück zu führen. Dem gegenüber sieht man aber eine deutliche Zunahme der Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen (b) und Fibrinogen (c). Diese Adhäsion wird über spezielle Rezeptoren die Glykoproteinen (GP) reguliert.

Für die Adhäsion an Kollagen ist der GP VI Rezeptor auf den Thrombozyten verantwortlich. Kollagen wird auf der intakten Gefäßwand nicht präsentiert. Erst durch eine Gefäßverletzung kommt es zur Exposition, worauf die Anlagerung der Thrombozyten folgt. Wie unter 1.3.2.1 beschrieben, schließt sich der Anlagerung der Thrombozyten, über GPVI, eine Aktivierung von Signalwegen an. Die Anlagerung der Thrombozyten an Fibrinogen erfolgt über den Fibrinogenrezeptor, welcher sich auf der Thrombozytenoberfläche befindet. Mittels der Bindung an den GP IIb/IIIa Rezeptor werden intrazelluläre Mechanismen gesteuert. Es kommt zum so genannten *outside-in signaling* (siehe 1.3.2.2).

An das ausgebreitete Laminin binden die Thrombozyten über ihr  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin. Anders als bei der Bindung der Thrombozyten an Kollagen oder Fibrinogen folgt hier keine Aktivierung der Thrombozyten [89, 101]. Sie unterziehen sich keinem *shape change*, es konnte weiterhin auch nicht gezeigt werden, dass es zur Sekretion von Serotonin oder anderen aggregationsfördernden Substanzen kommt [89].

In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurden diese Adhäsionsversuche auch mit stimulierten Thrombozyten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Thrombin (0,05 U/ml), LPS (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder  $\alpha$ -Toxin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine zusätzliche Aktivierung durch die o.g. Stimuli die

Adhäsion der Thrombozyten an die Matrixproteine noch steigern kann. Da sich eine mikroskopische Auszählung der adhärenen Thrombozyten als nicht praktikabel erwies, wurde nach einer Alternative gesucht. Dabei wurden die adhärenen Zellen mit 2%igem Toluodin, welches in 4%igem Paraformaldehyd gelöst wurde, angefärbt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C fixiert, und im Anschluss mit Wasser gewaschen. Die Lösung entfärbt sich mit jedem weiteren Waschschrift. Nun werden die adhärenen Zellen mit einer 1%igen Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) Lösung solubilisiert. Das SDS lysiert die Zellen und der aufgenommene Farbstoff wird freigesetzt. Die Absorption der Farbstofflösung wird bei 595 nm in einem Tecan ELISA-Reader gemessen. In Abbildung 3-5 sind die Ergebnisse der Absorptionsmessung dargestellt. Die toxinstimulierten Thrombozyten adhärenen dabei wie in vorangegangenen Experimenten an HSA, Kollagen, Fibrinogen und Laminin. Im Gegensatz zu den nicht toxinstimulierten Thrombozyten, adhärenen die mit LPS und  $\alpha$ -Toxin stimulierten verstärkt an Fibrinogen, was auf eine Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors schließen lässt.



**Abbildung 3-5:** Semiquantitative Auswertung der an HSA, Kollagen, Fibrinogen und Laminin adhärenen Thrombozyten. Messung der Absorption bei 595 nm. (n= 3 Experimente)

Durch Stimulation mit LPS bzw. Thrombin ist eine verstärkte Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen zu erkennen. Dabei hat sich bei allen Versuchen gezeigt, dass  $\alpha$ -Toxin die Adhäsion an alle vorgegebenen Matrices nicht erhöhen konnte. Die stärkste Aktivierung der Thrombozyten wurde hier durch  $\alpha$ -Toxin Stimulation erreicht. So konnten Aggregate nachgewiesen werden. Diese sehr widersprüchlichen Ergebnisse der  $\alpha$ -

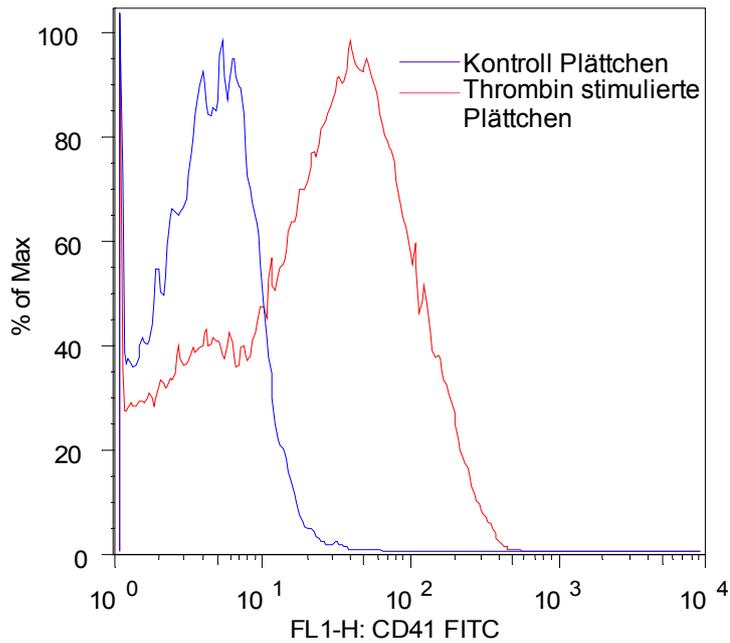
Toxin-Experimente ziehen eine genauere Untersuchung der Thrombozyten-Toxin-Interaktion nach sich.

### 3.3 Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors

Die Ergebnisse der Adhäsionsexperimente warfen Fragen zur Aktivierung der Thrombozyten auf, da es sich gezeigt hatte, dass  $\alpha$ -toxinstimulierte Thrombozyten aggregieren, aber die Adhäsion an subendotheliale Matrices nicht erhöht werden können. Somit wurden Untersuchungen über die Aktivierung des GPIIb/IIIa der unter anderem die Adhäsion von Thrombozyten an Matrices reguliert angestrebt.

Der GP IIb/IIIa Rezeptor ist ein sicherer Aktivierungsmaker für Thrombozyten [102]. Unter physiologischen Bedingungen präsentieren Thrombozyten einen nicht aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor auf ihrer Membran. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer raschen Konformitätsänderung des GPIIb/IIIa Komplexes, wodurch hochaffine Fibrinogenbindungsstellen freigelegt werden. Die Bindungsstellen sind ein Dodekapeptid (His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val; HHLGGAKQAGDV) am Carboxyterminalen Ende der  $\gamma$ -Kette [28] und zwei Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenzen enthaltenden Regionen der  $A\alpha$ -Kette des Fibrinogens [29].

Durch *inside-out signaling*, welches zu einer Aktivierung des GP IIb/IIIa- Rezeptors über  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren führt, kann der PAC 1 Antikörper gebunden werden. Doch nicht nur *inside-out signaling* kann den GP IIb/IIIa-Rezeptor aktivieren, auch *outside-in signaling* führt zu dessen Aktivierung. Aktivierte GP IIb/IIIa Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran können den FITC konjugierten Antikörper binden und werden so für die FACS- Analyse sichtbar. Der PAC-1 Antikörper kann nur an aktivierten GP IIb/IIIa binden. Die Bindung an den Kontrollplättchen ist daher sehr gering, doch lässt sich durch die Blutabnahme und der weiteren Verarbeitung des Blutes eine geringfügige Aktivierung nicht vermeiden. Als Positivkontrolle wurden die Thrombozyten mit Thrombin stimuliert. Die Protease Thrombin aktiviert Thrombozyten über  $G_i$ -abhängige Rezeptoren. Durch dieses *inside-out signaling* geht der GPIIb/IIIa- Rezeptor in seine aktive Form über und der PAC-1 Antikörper kann dann an der Fibrinogenbindungsstelle binden. Durch diese vermehrte Bindung des PAC-1 erfolgt eine Rechtsverschiebung im FSC und die aktivierten Thrombozyten können klar von den Kontrollplättchen differenziert werden. Nach Thrombin-Applikation kommt es innerhalb einer Minute zu einer maximalen Aktivierung von 18 % und nimmt dann im weiteren zeitlichen Verlauf wieder ab. In der nachfolgenden Abbildung wird die Zunahme der Fluoreszenzintensität sichtbar.

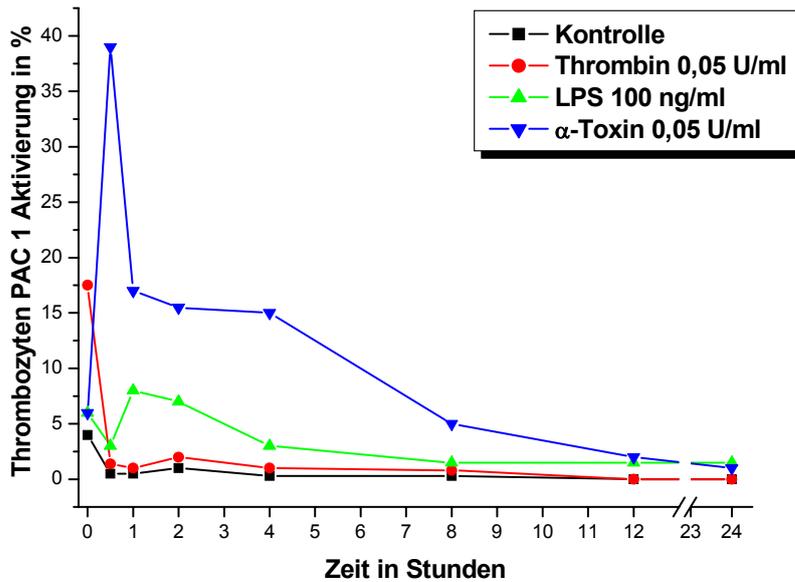


**Abbildung 3-6:** Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors auf Thrombozyten, durch 1 U/ml Thrombin. Der Nachweis erfolgte im Vollblut. Durch die Rechtsverschiebung des Multipletts (Zunahme der Fluoreszenzintensität) zeigt sich eine Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors. Die Auswertung erfolgte durch logarithmische Auftragung des *forward side-ward scatters* (FSC).

Doch nicht nur Thrombin kann den GP IIb/IIIa- Rezeptor auf Thrombozyten aktivieren, auch  $\alpha$ -Toxin und LPS können den Rezeptor anregen. Die Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin erfolgt schon nach wenigen Minuten und ist bereits nach 30 Minuten abgeschlossen, das PAC-1 Signal geht danach auf Null.

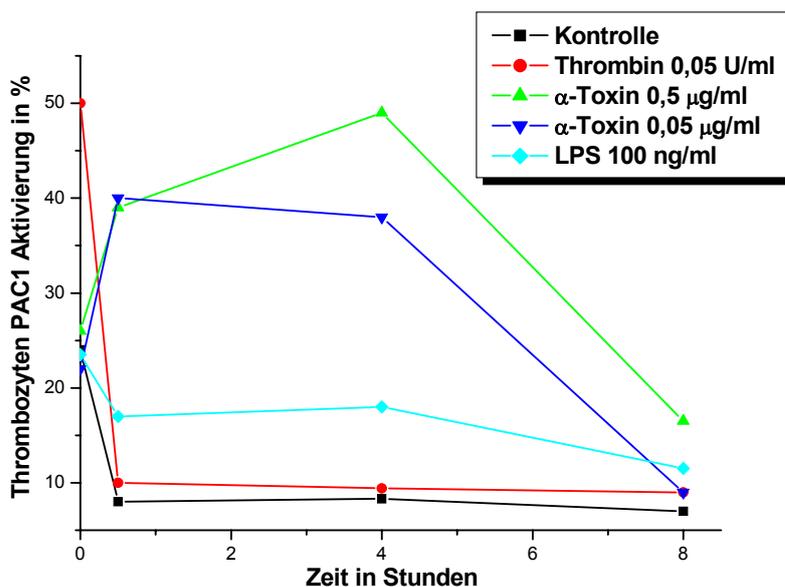
Die Thrombozyten, die mit  $\alpha$ -Toxin stimuliert wurden, zeigen eine maximale Aktivierung von fast 40 % nach 30 Minuten. Diese Aktivierung nimmt dann stetig ab, bis sie nach 24 Stunden 3 % erreicht. Bereits nach einer Stunde hat sich das Aktivierungssignal halbiert auf 18 %. Nach acht Stunden werden kaum noch Thrombozyten aktiviert. Diesem Ergebnis liegen verschiedene Mechanismen zugrunde. Eine Aktivierung von Thrombozyten hat die Sekretion von Fibrinogen aus den Granula zur Folge. Das frei werdende Fibrinogen kann an dem GP IIb/IIIa Rezeptor binden und damit die PAC-1 Bindungsstelle besetzen. Man muss auch die Aggregation der Thrombozyten in Betracht ziehen, bei der die Thrombozyten über Fibrinogenbrücken verbunden sind. Dabei bindet das Fibrinogen an GP IIb/IIIa und der PAC-1 Antikörper kann nicht mehr binden. Zum anderen kann das  $\alpha$ -Toxin die Zellen zerstören, was zu einer Verringerung der GP IIb/IIIa Präsentation führt.

Bei den LPS stimulierten Thrombozyten zeigt sich nach einer Stunde eine moderate Aktivierung von 8 %, die dann ebenfalls rasch wieder abnimmt und nach vier Stunden auf den Ausgangswert von 4 % gesunken ist. Diese Werte spiegeln auch die Aggregationsversuche mit LPS wieder. Sie zeigen, dass LPS zu einer sehr geringen Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors auf Thrombozyten führt.



**Abbildung 3-7:** Zeitlicher Verlauf der GP IIb/IIIa Aktivierung durch  $\alpha$ -Toxin einer Konzentration von 0,05 U/ml sowie durch LPS (0,1  $\mu$ g/ml) und 1,0 U/ml Thrombin. Durch Thrombin (1,0 U/ml) wird der Rezeptor durch *out-side in signaling* aktiviert und kann so den Fluoreszenzfarbstoff binden. Nach 30 Minuten ist keine weitere Aktivierung durch Thrombin möglich.  $\alpha$ -Toxin führt erst nach 30 Minuten zu einer maximalen Aktivierung des Rezeptors. Doch bereits nach weiteren 30 Minuten nimmt die Aktivierung ab. LPS aktiviert den GPIIb/IIIa erst nach einer Stunde maximal jedoch zu keiner Zeit so stark wie  $\alpha$ -Toxin.

Anhand der mit  $\alpha$ -Toxin (0,05  $\mu$ g/ml) erreichten Aktivierung zeigt eine zehnfach höhere Konzentration von  $\alpha$ -Toxin (0,5  $\mu$ g/ml) nur eine Verschiebung des Aktivierungsmaximums von 30 Minuten auf vier Stunden. Jedoch erreichen beide Konzentrationen nach acht Stunden ihr Minimum und eine Veränderung wird auch über weitere 16 Stunden nicht mehr sichtbar.

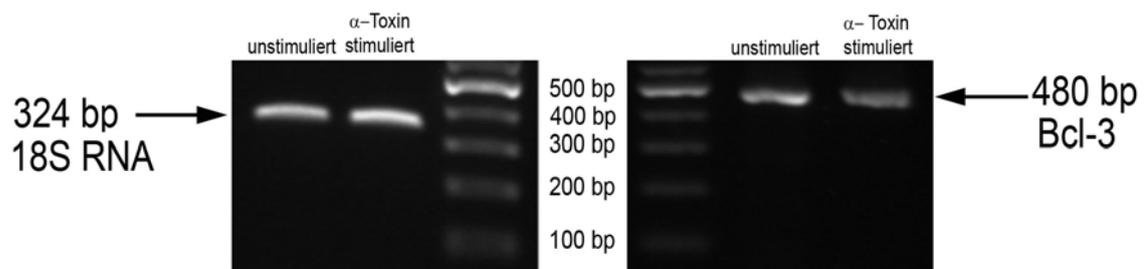


**Abbildung 3-8:** Thrombozytenaktivierung mit zwei unterschiedlichen  $\alpha$ -Toxin Konzentrationen. Die Maximale Aktivierung verschiebt sich von 30 Minuten auf vier Stunden.

### 3.4 RNA Nachweis

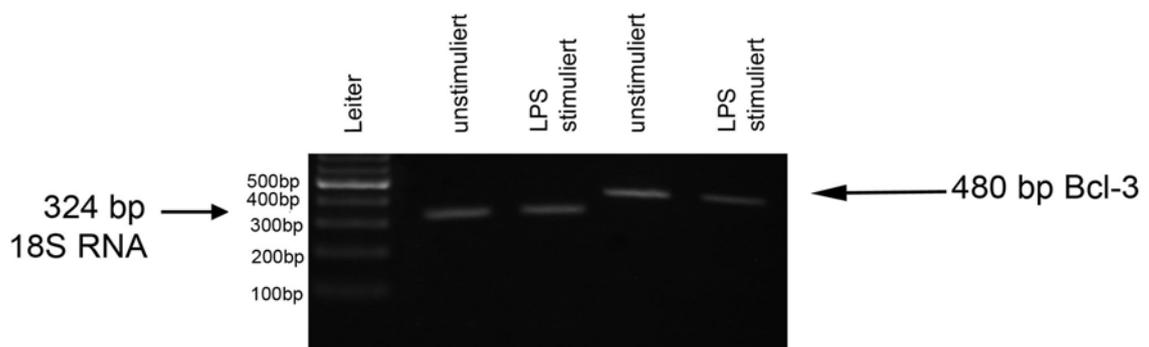
Als Quelle der thrombozytären m-RNA werden die Megakaryozyten betrachtet. Im Verlauf der Thrombopoese gelangen die genetischen Informationen in Form von m-RNA Strängen in die Thrombozyten [11]. Der Nachweis spezifischer RNA gibt darüber Auskunft, ob die Information für die Proteinsynthese in den Thrombozyten enthalten ist. Wenn diese Information fehlt, können die Proteine nur gespeichert und nicht neu synthetisiert werden.

Plättchen enthalten die m-RNA für Bcl-3. Diese RNA setzt sich mit speziellen Primern zu den entsprechenden Basenpaaren um (siehe Abbildung 3-9). Die Stimulation der Thrombozyten mit  $\alpha$ -Toxin zeigt keine vermehrte Expression der Bcl-3 m-RNA. Im Gegenteil, man könnte von keiner signifikanten Veränderung der m-RNA sprechen. Die 18S RNA diente als Beladungskontrolle und zeigt dabei eine nahezu gleiche Beladung mit RNA.



**Abbildung 3-9:** Dargestellt sind die Signale für Bcl-3 bzw. 18S- rRNA unter Kontrollbedingungen und nach  $\alpha$ -Toxin Stimulation.

In der unteren Abbildung sind die PCR-Produkte, nach Amplifikation mit Bcl-3 bzw. 18S rRNA Primer aus Thrombozyten RNA dargestellt. Dabei zeigen LPS stimulierte Thrombozyten eine ähnliche RNA Konzentration, wie in unstimulierten Thrombozyten. Auch hier erfolgt eine RNA Beladungskontrolle mit der 18S RNA.



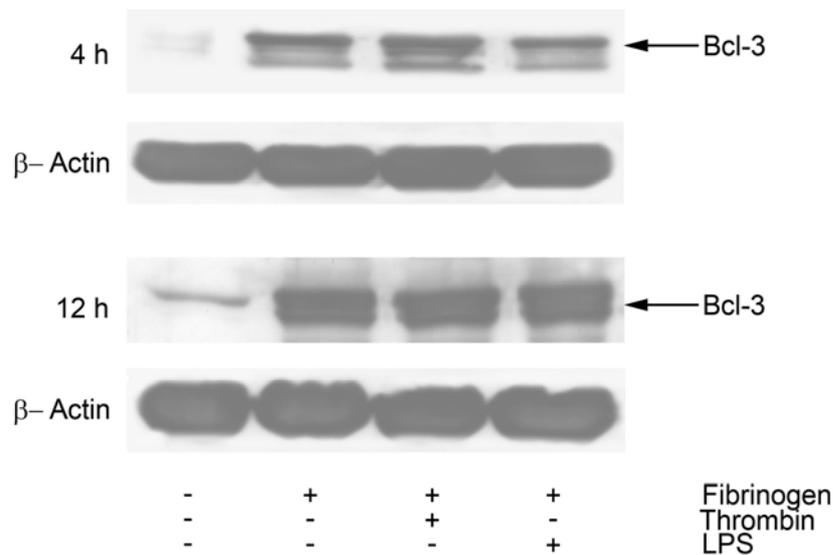
**Abbildung 3-10:** Bcl-3 c-DNA Produkt aus unstimulierten und mit LPS stimulierten Thrombozyten.

### 3.5 Proteinexpression

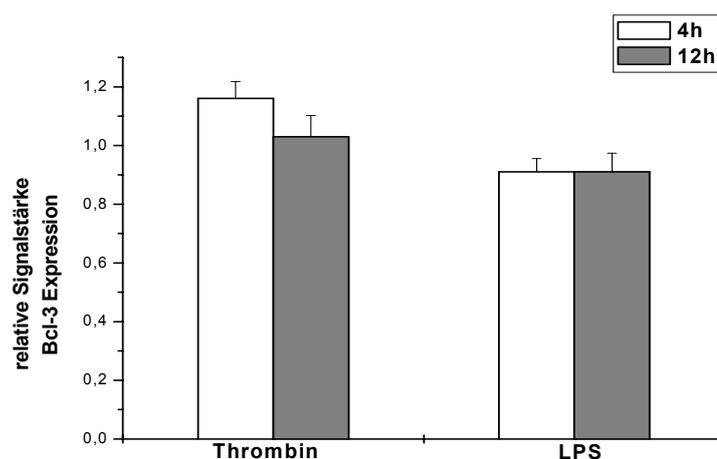
#### 3.5.1 Bcl-3 Expression in Thrombozyten stimuliert mit LPS

##### 3.5.1.1 Effekt der Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen

Bei diesen Experimenten wurden die Thrombozyten auf fibrinogenbeschichteten Kulturflecken für vier bzw. zwölf Stunden ausgebracht. Die Plättchen wurden zusätzlich mit Thrombin und LPS stimuliert. Pro Geltrack wurden 50µg Gesamtproteinmenge appliziert, die Aktin Western dienen als Ladekontrolle (siehe Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-11:** Western Blot Auswertung der Thrombozyten, die adhären an Fibrinogen mit Thrombin oder mit LPS stimuliert wurden.



**Abbildung 3-12:** Densitometrische Auswertung des Western Blots aus Abbildung 3-11 normiert auf das Fibrinogen Signal zum entsprechenden Zeitpunkt.

Die Signalintensitäten für Bcl-3 sind relativ gleichstark. Das lässt darauf schließen, dass die Expression des Bcl-3 von der Beteiligung der  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrine abhängt [61]. Dennoch konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass LPS stimulierte

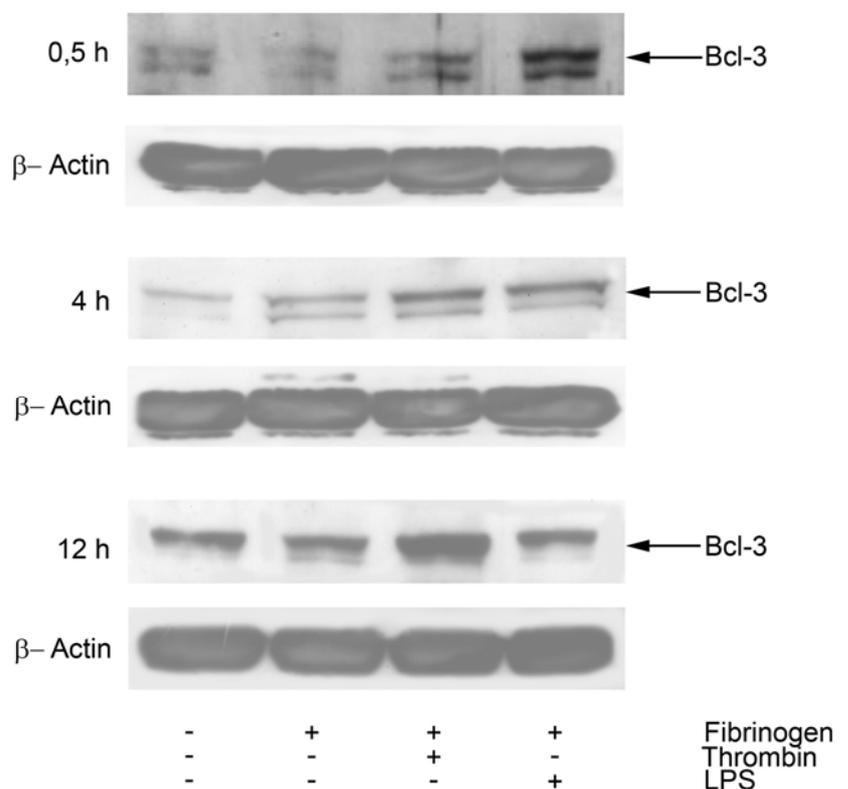
Thrombozyten genau wie Thrombin stimulierte Bcl-3 exprimieren. Somit zeigt sich, dass bakterielle Toxine, genau wie endogene Substanzen, auf Thrombozyten wirken können. Vielmehr reagieren die Plättchen auf den Stimulus mit einer geregelten Antwort. Die Expression von Bcl-3 in den LPS stimulierten Thrombozyten ist zwar mit 0,91, bezogen auf das Fibrinogensignal, etwas geringer, doch konnte auch die Stimulation mit Thrombin das Signal nicht signifikant (nur um 1,16 ) steigern in Bezug auf das Fibrinogensignal. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch nach 12 Stunden wieder. Dann nimmt das Kontrollsignal stark zu. Doch sind die zusätzlichen Stimulationen mit Thrombin (1,03) und LPS (0,91), bezogen auf das Fibrinogensignal, nicht sehr erfolgreich. Das lässt auf einen starken Stimulus durch das Fibrinogen (1 mg/ml) schließen. Andererseits kann auch durch die statischen Bedingungen die Aktivierung begünstigt sein.

### 3.5.1.2 Proteinexpression in Thrombozytensuspension

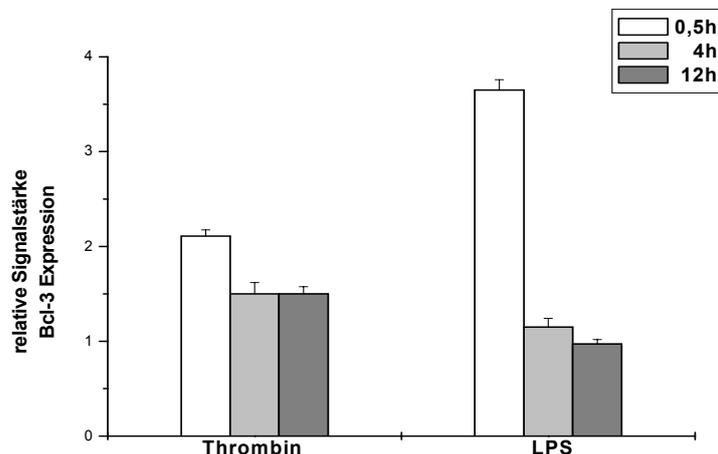
In den folgenden Suspensionsexperimenten (siehe Abbildung 3-14) wurden die Thrombozyten in Medium 199 suspendiert mit Fibrinogen (100 µg/ml) und zusätzlich mit LPS 0,1 µg/ml oder Thrombin 0,05 U/ml stimuliert. Repräsentative Western Blots sind in Abbildung 3-14 dargestellt. Der Aktin-Western dient als Beladungskontrolle.

**Abbildung 3-14:** Thrombozyten in Suspension stimuliert mit Thrombin 0,05 U/ml und LPS 0,1 µg/ml über den Zeitraum von 30 min über vier und zwölf Stunden. Die Aktin Western dienen als Ladekontrolle.

Es ist die Zunahme des Bcl-3 Signals im zeitlichen Verlauf in den Thrombin stimulierten Thrombozyten zu erkennen. Die LPS stimulierten Thrombozyten zeigen schon nach 30 min keine weitere Steigerung der Bcl-3 Expression.



Die densitometrische Auswertung zeigt eine sehr starke Aktivierung der LPS stimulierten Thrombozyten bereits nach 30 Minuten, im Vergleich zu Thrombin stimulierten Thrombozyten. Nach vier Stunden exprimieren jedoch thrombinaktivierte Plättchen mehr Bcl-3 als solche, die mit LPS stimuliert wurden. Nach zwölf Stunden sinkt die Expression von Bcl-3 in LPS stimulierten Plättchen sehr stark ab.

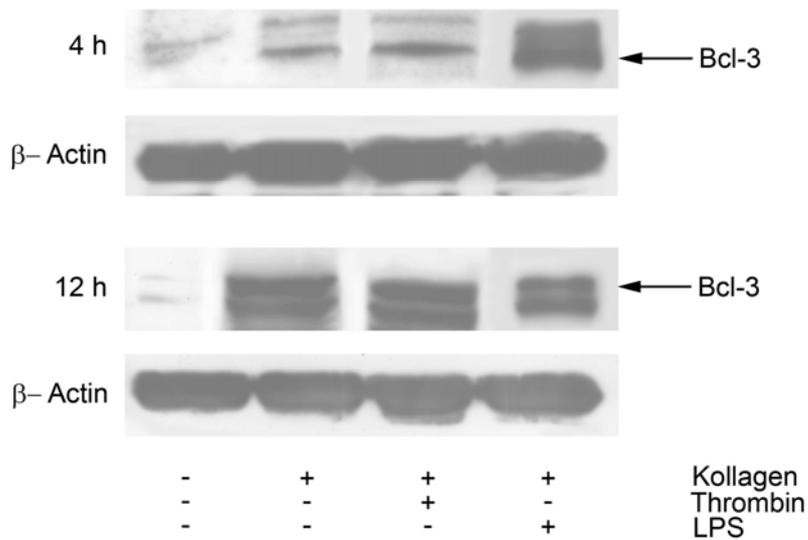


**Abbildung 3-15:** Densitometrische Auswertung des Western Blots aus Abbildung 3-15 normiert auf das Fibrinogen Signal. Die densitometrische Auswertung der Blots aus Abbildung 3-16 bestätigt die maximale Expression des Bcl-3 Signals in den LPS stimulierten Thrombozyten nach 30 Minuten.

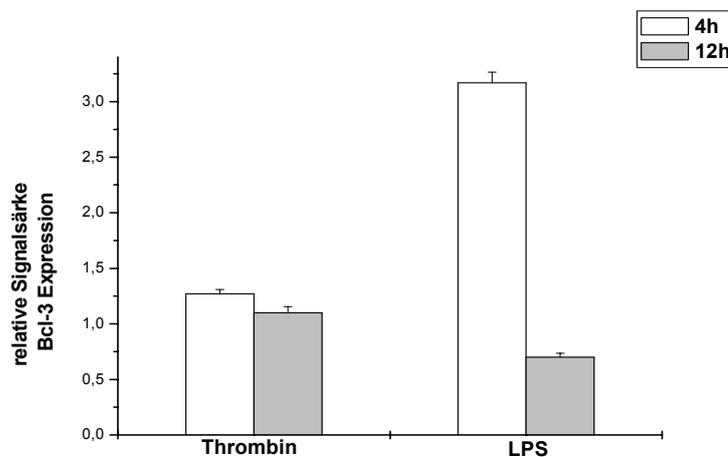
Es hat sich gezeigt, dass auf die Verwendung von Fibrinogen in den Suspensionsexperimenten nicht verzichtet werden kann. So wurden von Pabla et al. nachgewiesen, dass die  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrine durch ihr *outside in signaling* die Translation und weitergehend die Proteinsynthese regulieren [61]. Lindemann et al. zeigte in weiteren Experimenten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Stimulation der  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrine und der Aktivierung des eukaryotischen Initiations Faktor 4 E (eIF4E) besteht [15]. Der eIF4E verknüpft die mRNA mit den Ribosomen [60]. In ruhenden Thrombozyten ist der eIF4E Faktor im Membrangerüst und in der löslichen Fraktion eingelagert [15]. Kommt es durch äußeren Einfluss zu einer Aktivierung wird eIF4E im Zytoskelett verteilt und gelangt so schneller an die dort befindliche mRNA.

### 3.5.1.3 Adhäsion humaner Thrombozyten an Kollagen

Die Folge der Thrombozyten Adhäsion an Kollagen endet in einer Aktivierung (siehe Abschnitt 1.3.2.1). Dabei binden die Thrombozyten über GP VI und IV sowie den Integrinen  $\alpha_2\beta_1$ . Sie sind dann unter anderem in der Lage Proteine wie Bcl-3 zu exprimieren. Eine zusätzliche Stimulation der an Kollagen adhärenen Thrombozyten mit Thrombin und LPS führt zu einer gesteigerten Expression von Bcl-3. Nach 12 Stunden zeigen die toxischen Eigenschaften von LPS ihre Wirkung. So nimmt das Bcl-3 Signal sehr stark ab. Im Vergleich zum LPS-Signal nimmt die Expression von Bcl-3 unter Kollagen-Stimulation von vier nach zwölf Stunden stark zu, wie auch unter der zusätzlichen Stimulation mit Thrombin.



**Abbildung 3-16:** An Kollagen adh rente Thrombozyten exprimieren Bcl-3 über den Zeitraum von vier und zwölf Stunden. Der Aktin Western zeigt eine vergleichbare Proteinbeladung der Gele. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus fünf Versuchen.



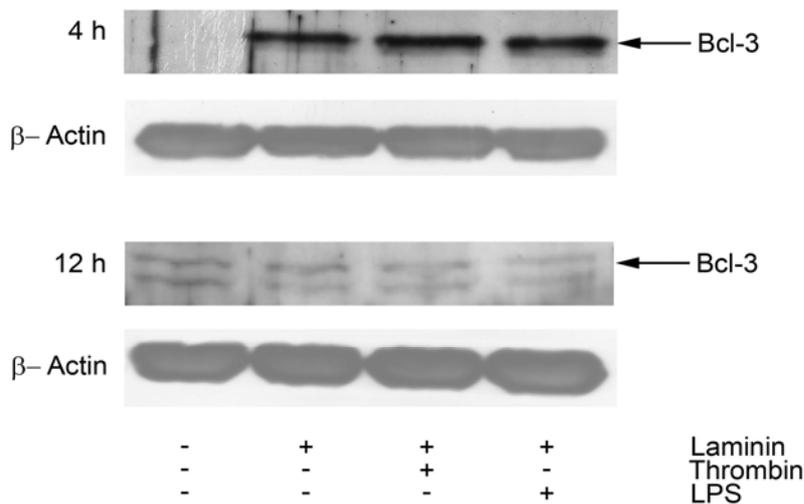
**Abbildung 3-17:** Die densitometrische Auswertung der Abbildung 3-16 zeigt eine deutlich gesteigerte Expression von Bcl-3 in den mit LPS stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden im Vergleich zur Stimulation mit Thrombin. Nach zwölf Stunden ist das Bcl-3 Signal in der LPS Gruppe geringer als in den thrombinstimulierten Thrombozyten. Als Referenz für diese Messung wurde das Kollagensignal zum jeweiligen Zeitpunkt gewählt.

Die densitometrische Auswertung zeigt eine mehr als doppelt so starke Expression von Bcl-3 in den LPS stimulierten Thrombozyten, als in thrombinstimulierten Zellen nach vier Stunden. Doch nach 12 Stunden verringert sich die Signalstärke in LPS behandelten Plättchen stärker als in der Thrombingruppe.

### 3.5.1.4 Adhäsion von Thrombozyten an Laminin

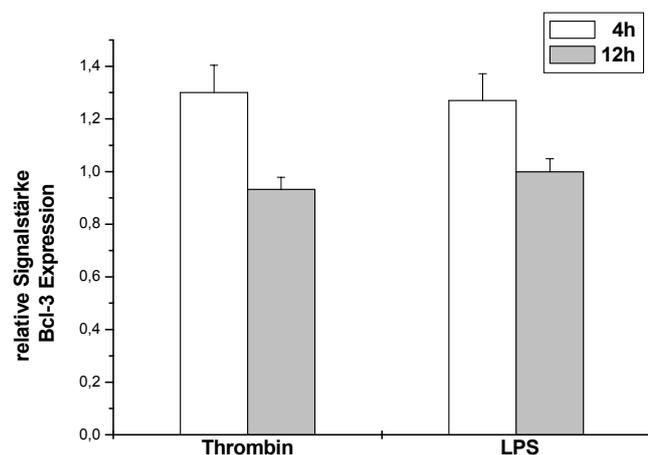
Die Adhäsion an Laminin, eines der Hauptkomponenten der nicht-kollagenen Adhäsionsproteine, führt über eine GP VI Aktivität zum *Spread* der Thrombozyten. Dabei binden die Thrombozyten über  $\alpha_6\beta_1$ -Integrine an Laminin. Die nachfolgenden Signalkaskaden ähneln denen von an Kollagen adhärenen Thrombozyten. Über die  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin Aktivierung kommt es zur Tyrosin Phosphorylierung sowie zur Aktivierung von Syk und PLC $\gamma$ , was letztendlich PKC aktiviert, und auch zur Sekretion der thrombozytären Granulas führt. Mit dem *Spread* geht eine intrazelluläre Umlagerung von Translationsfaktoren einher, dem dann die Expression von Proteinen wie z.B. Bcl-3 folgt.

Doch es werden bereits in den vier Stunden Experimenten kaum Unterschiede in den verschiedenen Versuchsbedingungen sichtbar. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede in den Experimenten mit Kollagen und Fibrinogen sehr viel deutlicher. Auch nach zwölf Stunden werden kaum Unterschiede in den verschiedenen Bedingungen sichtbar. In Abbildung 3-18 wurden repräsentative Western Blots aus fünf Experimenten dargestellt. Die densitometrische Analyse in Abbildung 3-19 zeigt kaum einen Unterschied in den einzelnen Behandlungsgruppen.



**Abbildung 3-18:** Western Blot von Laminin adhärenen Thrombozyten zum Zeitpunkt vier und zwölf Stunden.

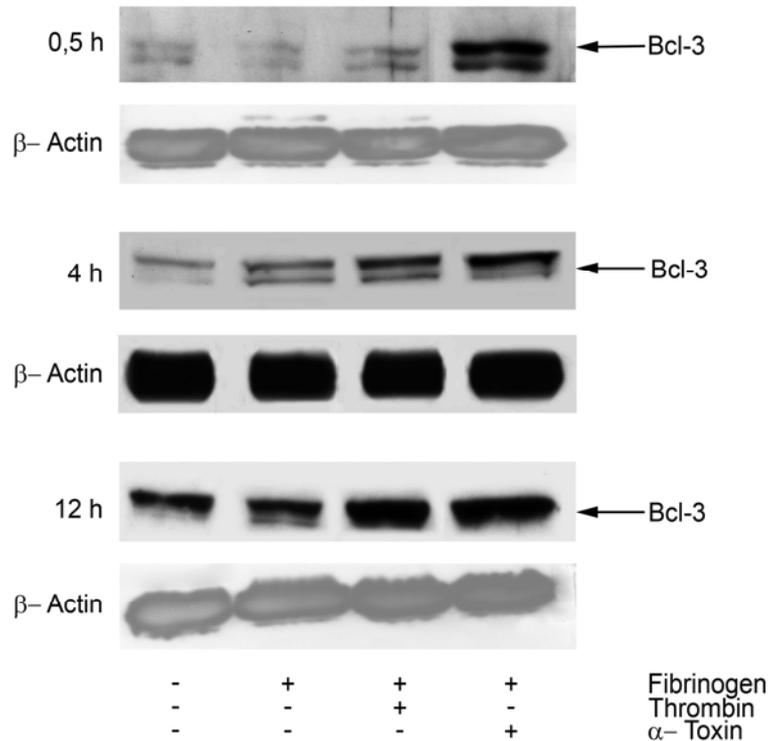
**Abbildung 3-19:** Die Auswertung der Abbildung 3-18 zeigt eine leicht gesteigerte Expression von Bcl-3 unter zusätzlicher Stimulation mit Thrombin und LPS nach vier Stunden. In den zwölf Stunden Experimenten ist kaum eine Unterscheidung der Signale möglich. Die relativ starke Grundaktivierung konnte geringfügig noch durch zusätzliche Stimulation erhöht werden.



## **3.5.2 Bcl-3 Proteinexpression in $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten**

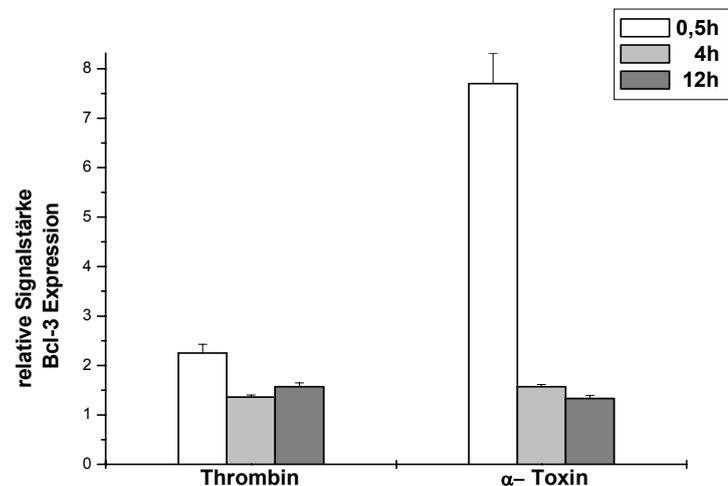
### **3.5.2.1 Proteinexpression in Thrombozytensuspension**

Die Suspensionsexperimente wurden durchgeführt um den Einfluss adhäsiver Mechanismen auszuschließen. Dabei wurden die Thrombozyten im Medium 199 suspendiert und mit Fibrinogen (100  $\mu\text{g/ml}$ ) und zusätzlich mit  $\alpha$ -Toxin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Thrombin (0,05 U/ml) stimuliert. Bereits nach 30 Minuten ist eine Expression von Bcl-3 sichtbar, wobei die verschiedenen Versuchsbedingungen sehr unterschiedliche Expressionsintensitäten zeigen. Die  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten exprimieren bereits nach 30 Minuten sehr viel Bcl-3, im Verhältnis zu den anderen Versuchsbedingungen. Nach vier Stunden wird dieser Trend nicht mehr so stark fortgesetzt. Die Kontrolle sowie die Fibrinogen- und Thrombin-,  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten exprimieren nahezu identische Mengen an Bcl-3. (siehe Abbildung 3-20). Im Vergleich zu den Thrombin stimulierten Thrombozyten exprimieren  $\alpha$ -Toxin stimulierte Plättchen noch mehr Bcl-3. Doch nach zwölf Stunden wird von Thrombin stimulierten Thrombozyten mehr Bcl-3 produziert als von den  $\alpha$ -Toxin stimulierten. Im zeitlichen Verlauf der Suspensionsexperimente lässt sich ein Trend zu mehr Proteinprodukt feststellen. In den Suspensionsexperimenten zeigt sich, dass  $\alpha$ -Toxin bereits nach 30 minütiger Stimulation der Bcl-3 Expression 7,7mal stärker ist, als in der Fibrinogen Gruppe. Das Thrombin-Signal ist nur 2,25mal intensiver als das Signal von Fibrinogen stimulierten Thrombozyten. Nach vier Stunden nehmen die Signalintensitäten von Fibrinogen und Thrombin zu. Die Intensität des Bcl-3 Signals von  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten bleibt nahezu gleich. Bezogen auf das Fibrinogen-Signal nach vier Stunden, steigert die Stimulation mit Thrombin die Bcl-3 Expression um 0,36 und eine Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin um 0,57. Nach zwölf Stunden sind kaum noch Unterschiede zwischen der Thrombin-Stimulation 1,28 und  $\alpha$ -Toxin-Stimulation 1,33, bezogen auf das Fibrinogen-Signal, zu erkennen. Vergleichend dazu die densitometrische Analyse in Abbildung 3-21.



**Abbildung 3-20:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit M199 und Fibrinogen (100 mg/ml). Einige Thrombozyten wurden mit Thrombin 0,05 U/ml bzw. mit 0,5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Toxin stimuliert. Die Aktin Western wurden zur Ladekontrolle durchgeführt.

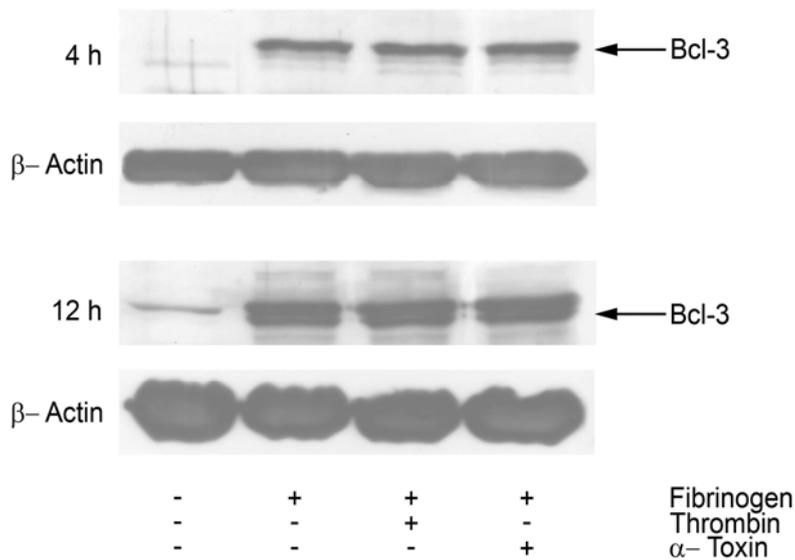
**Abbildung 3-21:** Bei der Auswertung der Western aus Abbildung 3-20, wird deutlich, dass das  $\alpha$ -Toxin nach 30 min den stärksten Stimulus für die Bcl-3 Expression darstellt. Die Expression ist 7,7 mal stärker als in Thrombozyten, welche sich in Suspension mit Fibrinogen alleine befinden. Nach vier Stunden exprimieren thrombinstimulierte Thrombozyten annähernd gleiche Mengen an Bcl-3 (Faktor 1,36) wie  $\alpha$ -Toxin (Faktor 1,57) stimulierte Thrombozyten. Die Werte sind auf die Expression von Bcl-3 in der Fibrinogen Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt normiert.



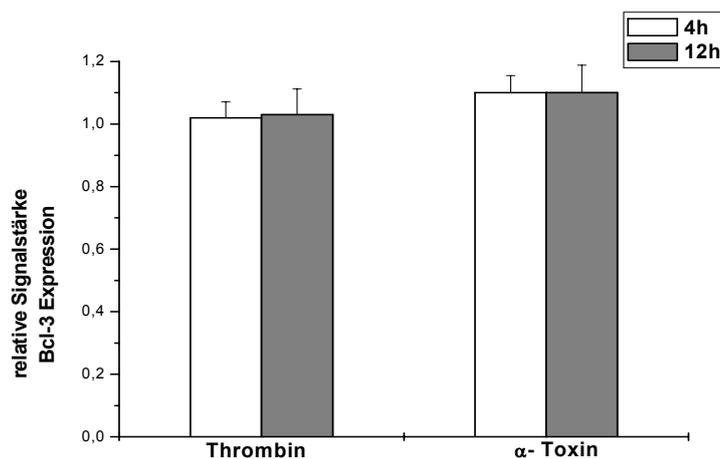
### 3.5.2.2 Adhäsion an Fibrinogen

In diesen Experimenten zeigte sich, dass eine zusätzliche Stimulation der an Fibrinogen adhärenen Thrombozyten zu einer gesteigerten Expression von Bcl-3 führt. Jedoch ist die Steigerung relativ gering: in der Thrombin Gruppe um 0,02 und in der  $\alpha$ -Toxin Gruppe um 0,1, bezogen auf das Fibrinogen nach vier Stunden. Nach 12 Stunden sind die Verhältnisse ähnlich. In der Thrombingruppe steigt die Signalintensität um

0,03 und in der  $\alpha$ -Toxin Gruppe um 0,1 in Bezug auf die Fibrinogengruppe. Auch hier scheint eine starke Grundaktivierung durch das Fibrinogen voraus zu gehen. Im Gegensatz zu den Suspensionsversuchen ist unter stationären Bedingungen die unterschiedlich starke Aktivierung nicht so stark ausgeprägt. In den Abbildungen 3-22 und 3-23 sind die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Die densitometrische Auswertung zeigt eine geringfügig stärkere Aktivierung durch zusätzliche Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin im Zeitraum über vier und zwölf Stunden im Vergleich zu Thrombin behandelten Thrombozyten.



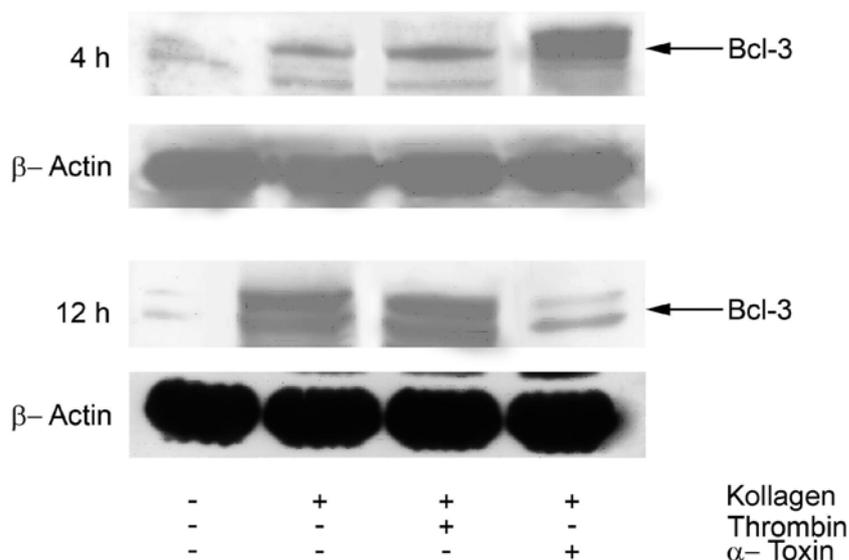
**Abbildung: 3-22:** *Western Blot* Untersuchungen Fibrinogen adhärenter Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden zusätzlich mit Thrombin 0,05 U/ml bzw. mit 0,5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Toxin stimuliert.



**Abbildung 3-23:** Densitometrische Auswertung der *Western Blot* Analysen aus **Abbildung 3-22**. Die zusätzliche Stimulation mit Thrombin oder  $\alpha$ -Toxin zeigt eine moderate Steigerung der Expression.

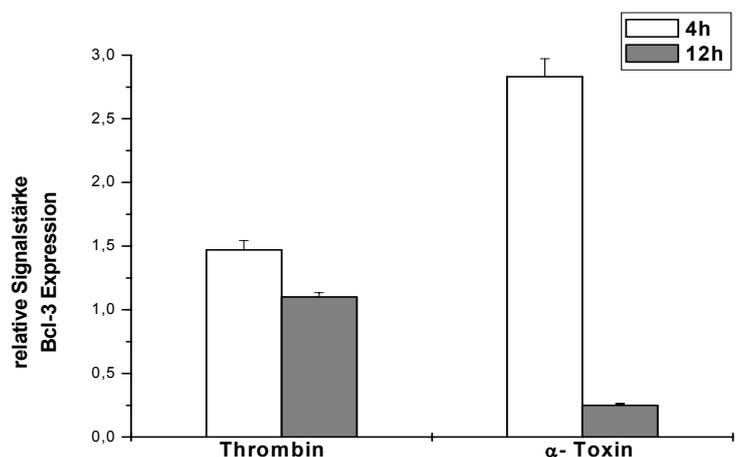
### 3.5.2.3 Adhäsion an Kollagen

Durch die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen kommt es durch eine Aktivierung zur Initiation der Proteinexpression. Der Aktivierung der Thrombozyten folgt eine Sekretion der thrombozytären Granulas und damit eine Aktivierung weiterer, noch ruhender Thrombozyten. Durch zusätzliche Stimulation mit Thrombin und  $\alpha$ -Toxin kann eine Aktivierung und darauf folgende Proteinexpression gesteigert werden. So auch in den hier vorliegenden Experimenten. Die Stimulation mit Thrombin steigert die Expression von Bcl-3 auf 1,47 und in den  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten wird die Bcl-3 Expression auf 2,83 in Bezug auf das Kollagen-Signal gesteigert. Die densitrometrische Analyse in Abbildung 3-25 zeigt eine deutliche Zunahme der Bcl-3 Expression in der  $\alpha$ -Toxin stimulierten Versuchsgruppe nach vier Stunden. Doch nach zwölf Stunden sinkt das Signal stark ab. Als mögliche Ursache kommt der toxische und zellzerstörende Effekt des  $\alpha$ -Toxin in betracht.



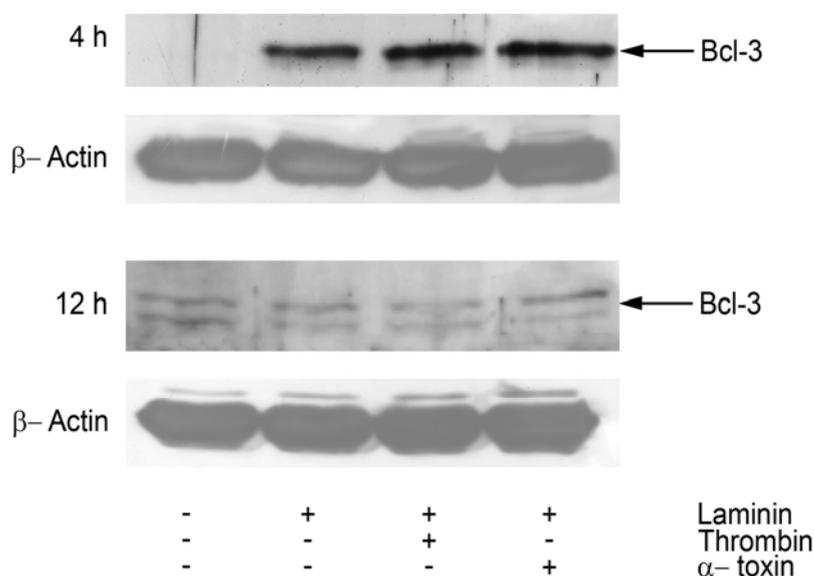
**Abbildung 3-24:** Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen: über einen Zeitraum von vier und zwölf Stunden.

**Abbildung 3-25: Auswertung der Western Blot Analyse aus Abbildung 3-24.** Die Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin steigert die Bcl-3 Signalintensität auf 2,83 und die Thrombin Stimulation auf 1,47 in Bezug auf das Fibrinogen-Signal nach vier Stunden. Nach zwölf Stunden zeigt das  $\alpha$ -Toxin seinen toxischen Effekt, das Bcl-3 Signal nimmt schlagartig ab.



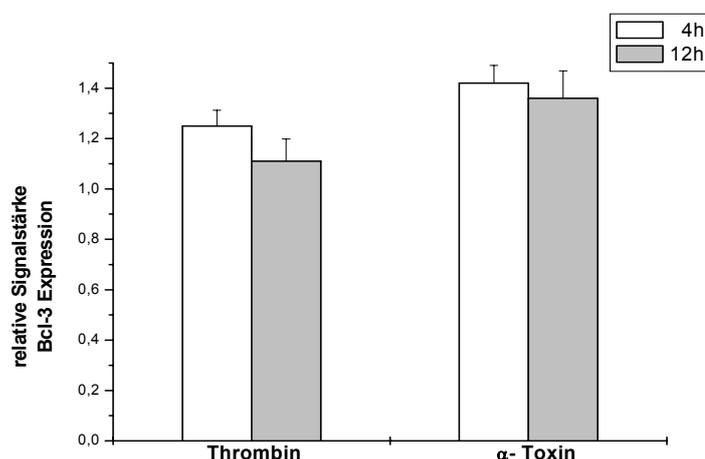
### 3.5.2.4 Adhäsion an Laminin

Die Adhäsion der Thrombozyten an Laminin löst eine Signalkaskaden aus, die zur Initiierung der Translation führen. So konnte nach vier Stunden ein Signal für Bcl-3 ermittelt werden, dass durch weitere Stimulation der an Laminin adhärenen Thrombozyten mit Thrombin oder  $\alpha$ -Toxin gesteigert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass nach vier Stunden zusätzlicher Thrombin-Stimulation das Signal für Bcl-3 um 0,25 und nach 12 Stunden um 0,11 in Bezug auf das Laminin-Signal zu den entsprechenden Zeiten gesteigert werden konnte. Durch  $\alpha$ -Toxin-Stimulation wurde das Signal um 0,42 nach vier Stunden und um 0,36 nach 12 Stunden gesteigert.



**Abbildung 3-26:** Analyse von Laminin adhärenen Thrombozyten die weiterhin mit Thrombin 0,05 U/ml bzw. 0,5 $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Toxin behandelt wurden.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit LPS Stimulation zeigt die  $\alpha$ -Toxin Stimulation eine geringfügige Zunahme der Bcl-3 Expression im Vergleich zur Thrombin Stimulation.



**Abbildung 3-27:** Auswertung der Western-Blots aus Abbildung 3-26: nach vier Stunden kann das Bcl-3 Signal durch Thrombin um 0,25 und durch  $\alpha$ -Toxin um 0,42 in Bezug auf das Laminin Bcl-3 Signal gesteigert werden.

### 3.5.3 Inhibierung der Proteinexpression

Die Proteinsynthese kann an verschiedenen Punkten durch Inhibitoren unterbrochen werden. Die einzige Möglichkeit in den Thrombozyten zur Unterbrechung stellt das Eingreifen in die Translation dar. Die Translation läuft wie o.g. in verschiedenen Stufen ab. Durch den Einsatz geeigneter Translationsinhibitoren kann man regulierend in diesen Prozess eingreifen.

#### **Puromycin**

Puromycin greift auf der Stufe der Terminierung der Translation ein. Dabei wird Puromycin anstelle von einer Acyl-t-RNA an die m-RNA angelagert. Als Folge dieser Bindung können keine weiteren t-RNAs an die m-RNA binden. Die Translation der m-RNA in Aminosäuresequenzen wird abgebrochen und es entstehen funktionslose Proteine.

Die Thrombozyten sind wie unter 2.2.1 isoliert und für 30 Minuten mit 1mM Puromycin inkubiert worden. Anschließend sind sie auf mit Fibrinogen beschichteten Wells ausgebracht worden. Nach vier Stunden hat man die Zellen wie in vorangegangenen Versuchen abgenommen und für die Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Das Ergebnis ist in der unteren Abbildung 3-28 dargestellt. Mit Puromycin wird die Translation von Bcl-3 in allen Thrombozyten nahezu vollständig unterbunden. Bei der densitometrischen Auswertung wurde das Signal aus der unbehandelten Stimulationsgruppe eins gesetzt. Die inhibierende Wirkung wurde Anhand des Signals der Kontrollgruppe ermittelt und ist in Abbildung 3-29 dargestellt. Dabei konnte durch den Einsatz von Puromycin die Expression von Bcl-3 auf unter 50 Prozent zum Kontrollniveau gebracht werden. Die Thrombozyten der Thrombin und LPS Gruppen sprachen dabei geringfügig besser auf die Inhibierung an, als die Thrombozyten, die mit  $\alpha$ -Toxin oder nur mit Fibrinogen behandelt wurden.

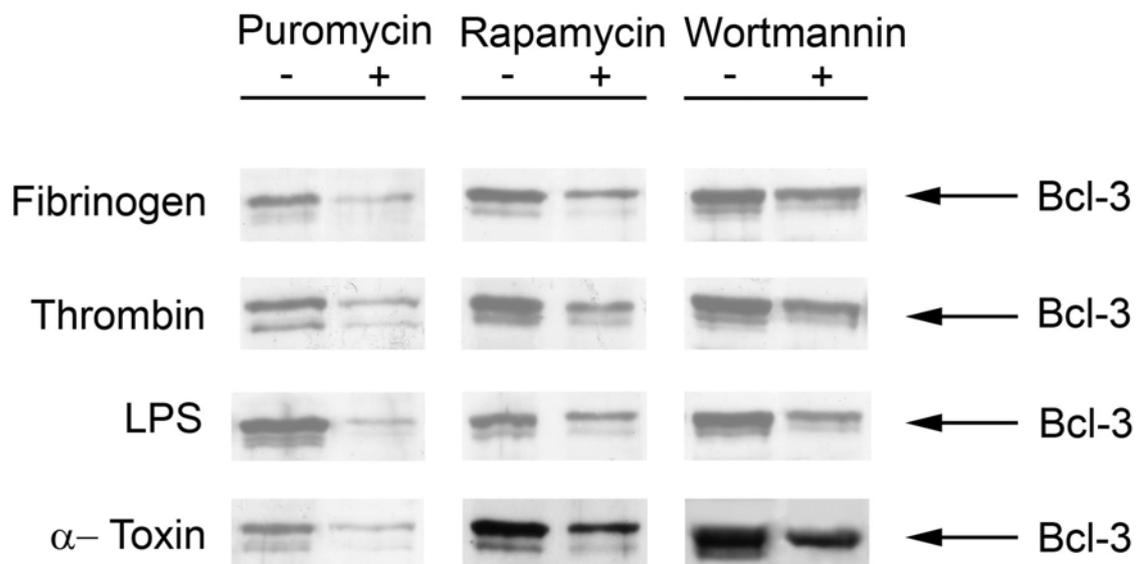
#### **Rapamycin**

Die Thrombozyten wurden mit 1 $\mu$ M Rapamycin für 30 Minuten vorbehandelt, bevor sie auf mit Fibrinogen beschichteten Zellkulturschalen für vier Stunden ausgebracht wurden. In den Experimenten zeigte sich, dass die Expression von Bcl-3 über m-TOR geregelt wird. (Abbildung 3-28). Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blots zeigt sich, dass durch Rapamycin die Expression von Bcl-3 in allen Versuchsgruppen um 50 Prozent gesenkt werden konnte. Einzige Ausnahme stellt die LPS Gruppe dar bei der nur eine Reduktion um rund 40 % erreicht wurde. Zum Vergleich siehe Abbildung 3-30. Es sind bis zum heutigen Tag nur sehr wenige Proteine bekannt, die über

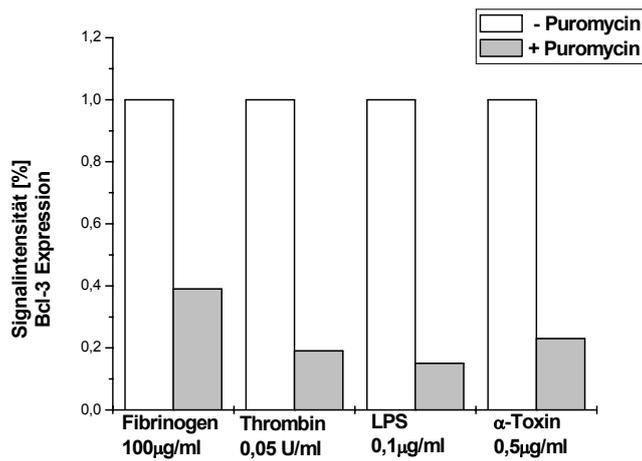
m-TOR reguliert werden. Bcl-3 ist eines davon. Diese Ergebnisse bestätigen auch die von Weyrich et al. gemachten Beobachtungen.

## Wortmannin

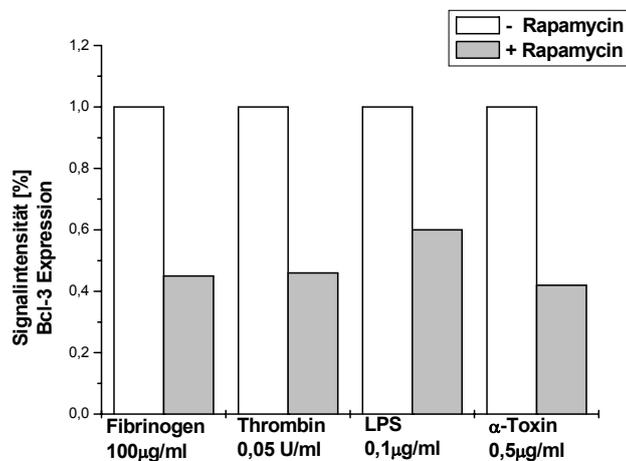
Wortmannin ist ein PI 3-Kinase-Inhibitor und hat eine Halbwertszeit von 20 Minuten, welches eine wiederholte Applikation vom Pharmakon notwendig macht. Auch hier zeigt sich eine verringerte Expression von Bcl-3 in den Thrombozyten. Die Plättchen sind wie bei allen Inhibitionsversuchen für 30 Minuten mit 100 nM Wortmannin vorinkubiert, bevor sie für vier Stunden auf fibrinogenbeschichteten Zellkulturschalen gegeben wurden (siehe Abbildung 3-28). Die nachfolgende densitometrische Auswertung zeigt eine Reduktion der Bcl-3 Expression um 30 bis 65%, abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen. (Vergleiche dazu Abbildung 3-31). Die mit LPS und Fibrinogen behandelten Thrombozyten sprechen nicht so stark auf den Inhibitor Wortmannin an wie Thrombin und  $\alpha$ -Toxin stimulierte Thrombozyten.



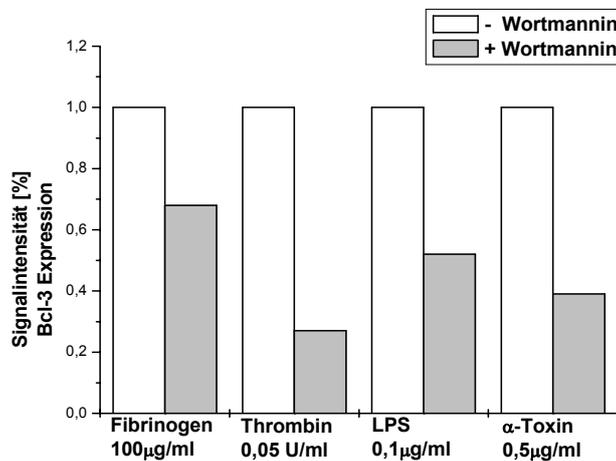
**Abbildung 3-28:** zeigt den Einsatz von Translationsinhibitoren: Die inhibierende Wirkung ist jeweils im Vergleich mit der positiv Kontrolle in Suspensionsexperimenten über vier Stunden dargestellt (+ gleich Pharmakon vorinkubiert;- bedeutet keine Vorbehandlung).



**Abbildung 3-29:** Bei der densitometrischen Auswertung der in Abbildung 3-28 dargestellten *Western-Blots* wurde die Signalintensität der Puromycin negativ Gruppe auf eins gesetzt (n= 5).



**Abbildung 3-30:** Densitometrische Auswertung der in Abbildung 3-28 gezeigten *Western-Blots*: Das Signal; der nicht mit Rapamycin behandelten Gruppe wurde auf eins gesetzt (n= 5).

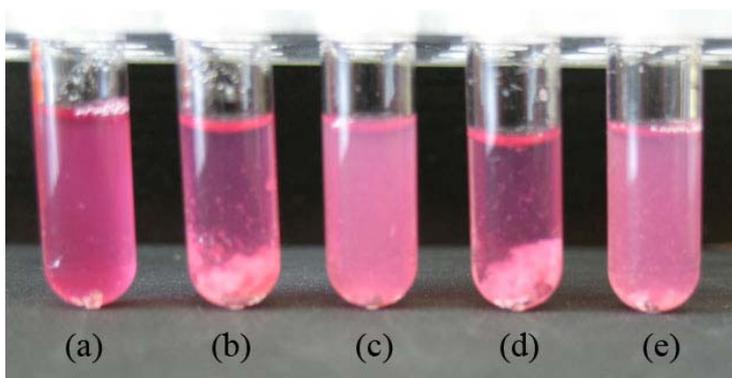


**Abbildung 3-31:** Densitometrische Auswertung der *Western-Blots* aus Abbildung 3-28: Die Signale der Plättchengruppen ohne Wortmannin wurden auf eins gesetzt (n= 5).

### 3.5.4 Beeinflussung der *Clot-Retraktion*

Bei der Ausbildung eines Thrombuses (engl. *clot*) werden drei Formen unterschieden. Der Abscheidungs- oder weiße Thrombus entsteht durch Anlagerung von Thrombozyten an Fibrinfäden, die sich an einer Endothelläsion gebildet haben. Die Ausbildung eines Gerinnungsthrombuses, oder auch roten Thrombus, erfolgt in den Gefäßen durch zu langsam fließendes Blut. Dabei findet man alle Blutbestandteile in den Thromben. Als dritte Form wird der gemischte Thrombus unterschieden, der sich aus den beiden oberen Thrombenformen zusammensetzt. Aus dem Kopfteil entsteht der Abscheidungsthrombus und der Gerinnungsthrombus bildet den Schwanzteil aus. Die Thrombusentstehung im Allgemeinen bezieht sich auf die Anlagerung von Thrombozyten an Fibrinfäden. Daraus resultiert eine Aktivierung weiterer Thrombozyten, welche aggregieren und so die Läsion verschließen. Zur Stabilisierung der Thromben verkürzen sich die Fibrinfäden und es kommt zur *Clot Retraction*. Ein wichtiges Schlüsselenzym für diesen Prozess ist das Bcl-3 Protein. [77]

Durch den Einsatz von Rapamycin wird die Translation von Bcl-3 unterbunden. Bcl-3 ist für die Verkürzung der Fibrinfäden in Thromben verantwortlich. Wird die Synthese dieses Proteins verhindert, kann zwar eine Aggregation der Thrombozyten auftreten, doch werden die entstanden Thromben nicht verfestigt. In der unteren Abbildung (Abbildung 3-32) wurden mit Rapamycin vorinkubierte Thrombozyten in die Reagenzgefäße (c) und (e) appliziert, wobei (c) zusätzlich mit Thrombin (1 U/ml) stimuliert und (e)  $\alpha$ -Toxin (0,5  $\mu$ g/ml) aktiviert wurde. In (b) ist Thrombin zu den Thrombozyten gegeben worden und (e) enthält  $\alpha$ -Toxin. Die Gruppe (a) dient als Kontrolle und wurde weder inhibiert noch aktiviert. Wie zu erkennen ist, sind die Thrombozyten aggregiert. Aus diesem Grund wurde mit LPS, welches keine Aggregation in humanen Thrombozyten auslöst, kein Experiment vorgenommen. Die Stabilität der nach zwei Stunden entstandenen *Clot* wurde durch zweimaliges leichtes Schwenken der Reagenzgläser getestet. Die Aggregate in (c) und (e) sind wieder zerfallen, wobei in (b) und (d) stabile Aggregate erhalten wurden.



**Abbildung 3-32: *Clot-Retraktion*.**

- a) Kontrolle
- b) Thrombin
- c) Thrombin + Rapamycin
- d)  $\alpha$ -Toxin
- e)  $\alpha$ -Toxin + Rapamycin

## Semi quantitative Auswertung der Clot –Retraction

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Clot	o	++	++	+++	+++
Clot resuspendiert	o	-	+	-	+

**Tabelle 29: Semiquantitative Auswertung der Clot- Retraction aus n= 5 Experimenten:**

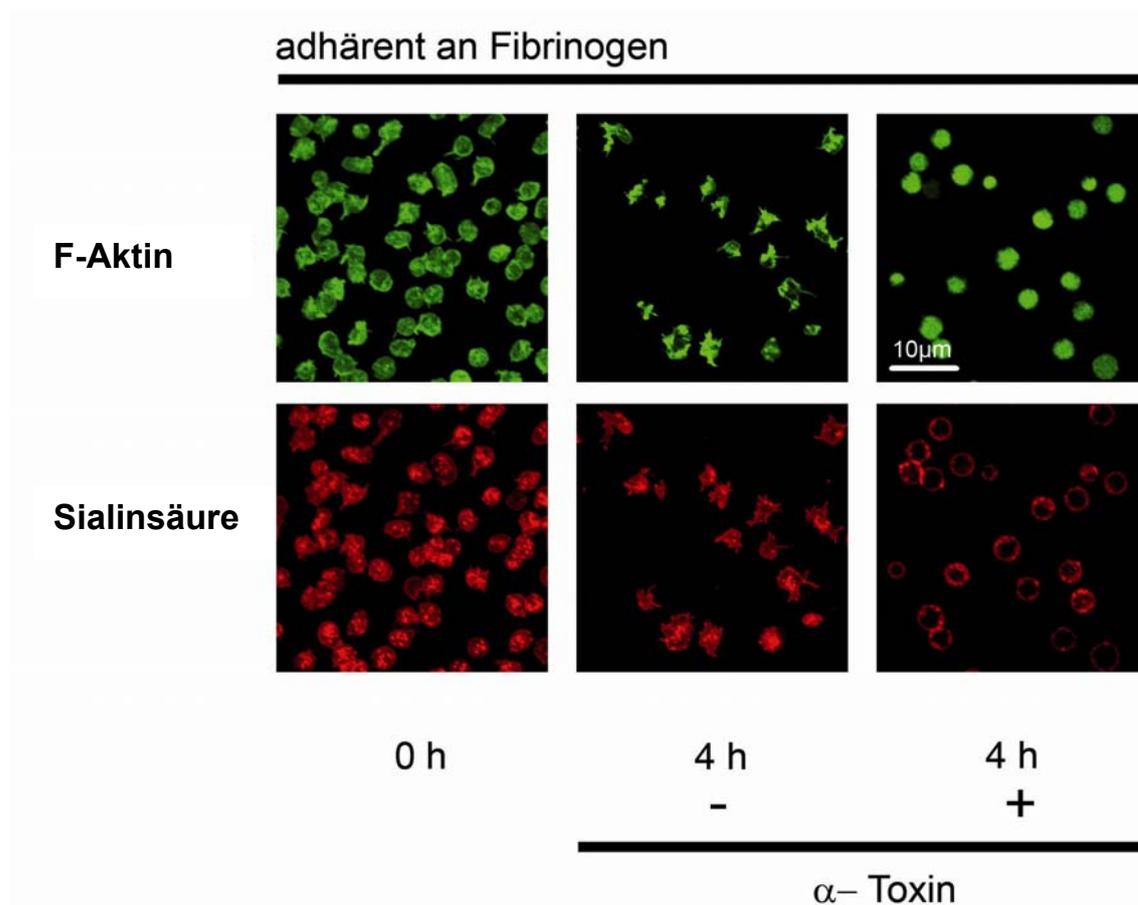
Dabei zeigen die Thrombozyten, die mit 1 U/ml Thrombin stimuliert wurden, eine Aggregatbildung. Dieser Clot lässt sich bei Rapamycin behandelten Thrombozyten wieder resuspendieren. Auch  $\alpha$ - Toxin stimulierte Plättchen weisen eine Aggregatbildung auf; nur bei den mit Rapamycin behandelten Thrombozyten lässt sich das Aggregat wieder auflösen.

### 3.6 Mikroskopische Aufnahmen der $\alpha$ - Toxin Wirkung

Die hier dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen den zellzerstörenden Effekt des  $\alpha$ -Toxins unter verschiedenen Bedingungen. In Abbildung 3-33 sind Thrombozyten adhärent an Kollagen für vier Stunden und zusätzlich noch mit  $\alpha$ -Toxin stimuliert. Zur besseren Identifizierung wurden die Thrombozyten mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin für die F-Aktin Filamente des Aktinzellgerüsts und mit Alexa Fluor® 555 für die Sialinsäure der Granulamembran angefärbt.

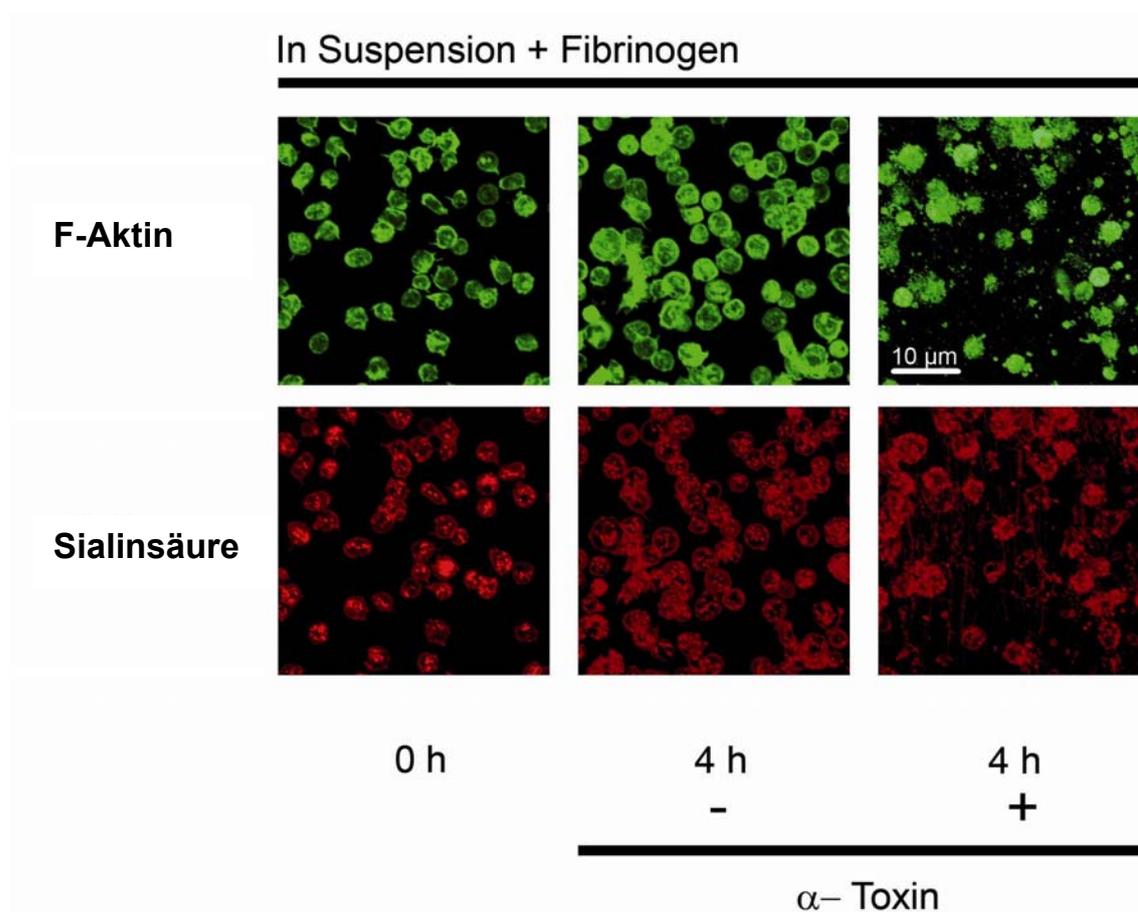
Zum Zeitpunkt Null besitzen die Zellen noch ihre runde Form, das F-Aktin ist noch sehr gleichmäßig im Zellinneren verteilt. Die Sialinsäure der Granulas zeigt die Thrombozytengranulas noch als intakt und in der Zelle verstreut an. Nach Stimulation mit  $\alpha$ - Toxin wandern die Granula an die Zellmembran und setzen ihren Inhalt frei. Das Aktingerüst zeigt in den Thrombozyten, die nur adhärent an Kollagen sind (mittlere Spalte Abbildung 3-33), eine Verteilung in die Peripherie der gespreizten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die zusätzlich noch mit  $\alpha$ - Toxin stimuliert wurden (rechte Spalte Abbildung 3-33), eine diffuse Aktin-Verteilung im Zellinneren.





**Abbildung 3-34:** Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten adhärent an Fibrinogen. Eine Versuchsreihe wurde zusätzlich noch mit  $\alpha$ -Toxin behandelt. Auch hier zeigt das Toxin seinen Effekt.

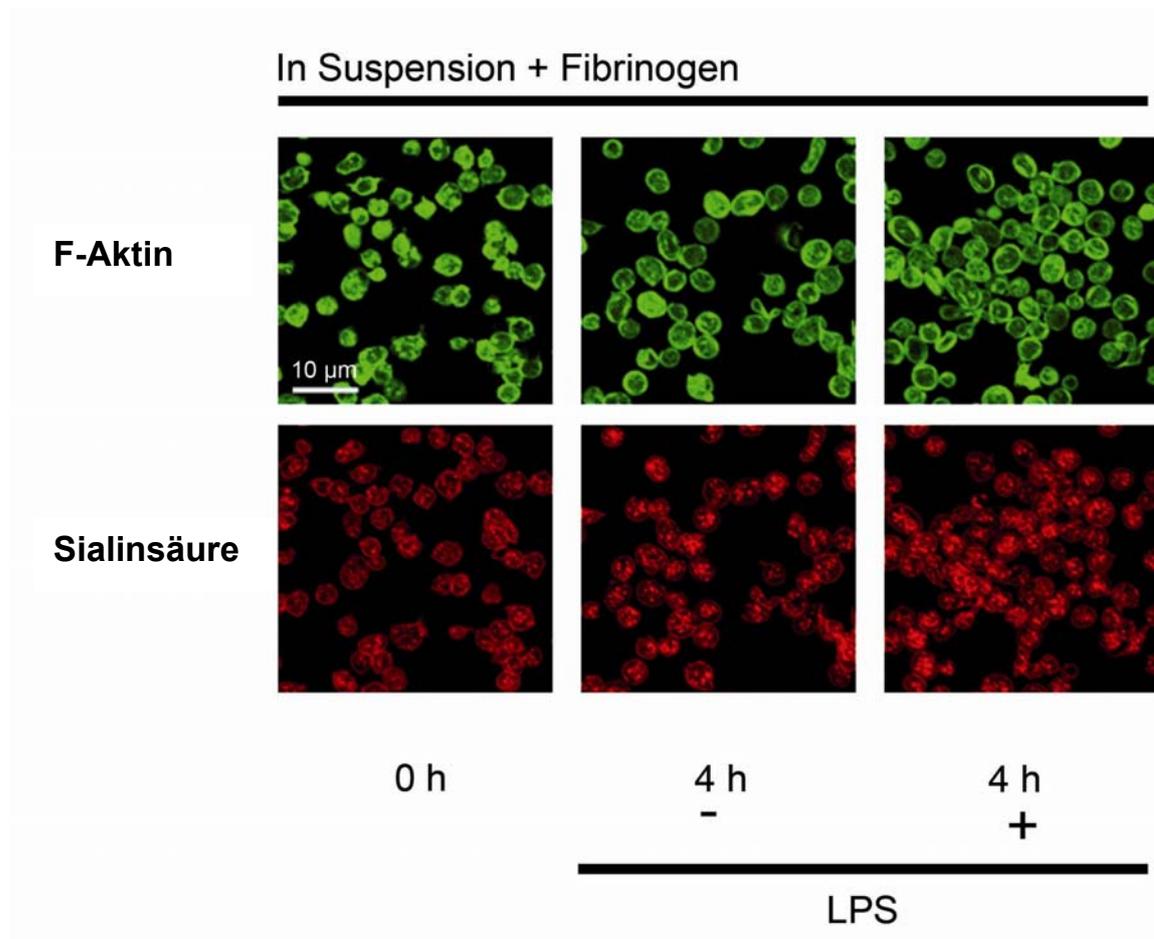
In den Experimenten, in denen Thrombozyten im Medium mit Fibrinogen versetzt wurden, zeigen die Zellen auch nach vier Stunden (mittlere Spalte Abbildung 3-35) kein *spreading*. Im linken unteren Viertel der Bilder, in der mittleren Spalte, sind kleine Aggregate zu erkennen, sowohl in der Aktin-Färbung als auch in der Sialinsäure-Anfärbung. Die  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten (rechte Spalte Abbildung 3-35) zeigen ein ausgeprägtes Fibrinnetz. In der Sialinsäure-Anfärbung sind die Granula nicht mehr eindeutig zu erkennen. Das Aktingerüst ist nicht mehr sichtbar. Im linken oberen Viertel der  $\alpha$ -Toxin Gruppe sind Thrombozytenaggregate sowohl in der Aktin- und der Sialinsäure-Färbung zu finden.



**Abbildung 3-35:** Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten im Medium, das zusätzlich Fibrinogen enthält: Die Thrombozyten wurden mit oder ohne  $\alpha$ -Toxin über vier Stunden in der Suspension kultiviert. Hier zeigt die Kontrolle nach vier Stunden auch keine Formänderung, aber dafür sind kleine Aggregate erkennbar. In den mit Toxin stimulierten Zellen ist eine definierte Zellstruktur im Sinne von Granulastrukturen nicht mehr zu erkennen.

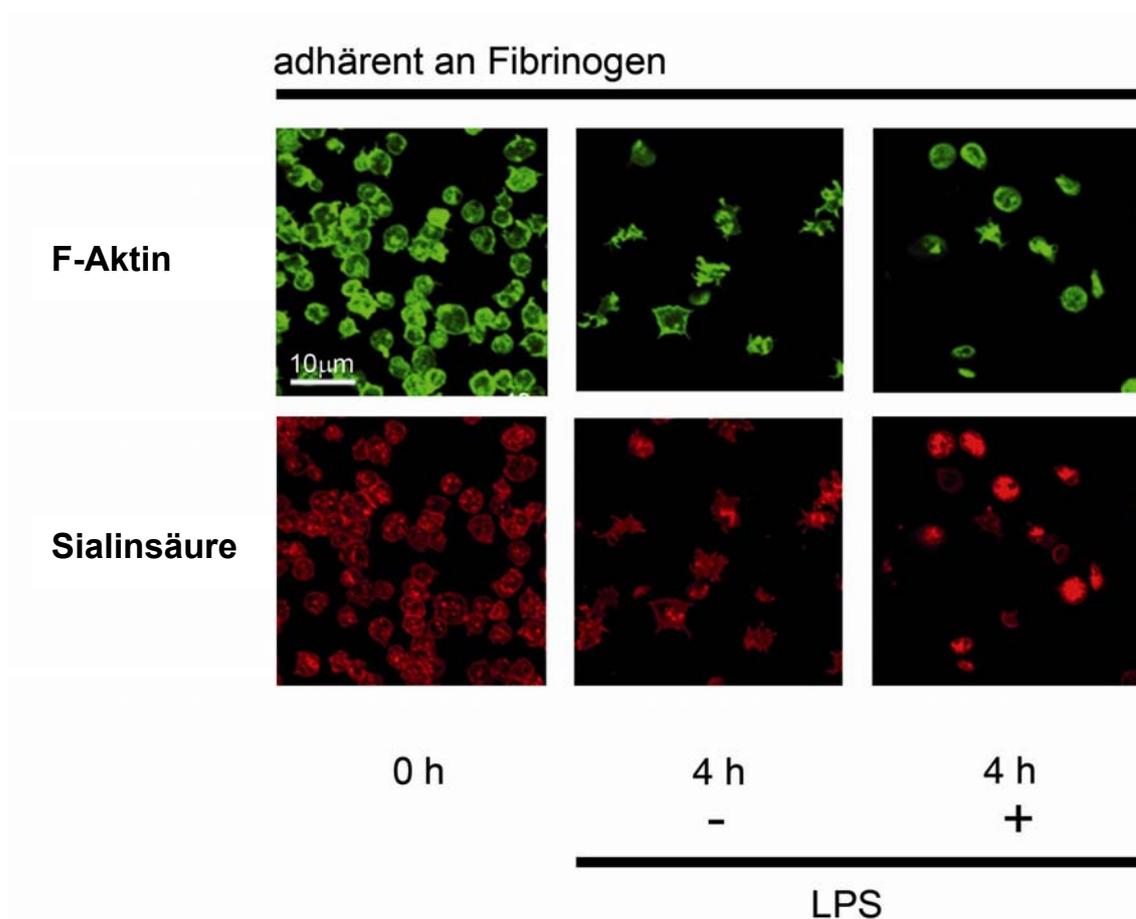
### 3.7 Mikroskopische Aufnahmen von LPS stimulierten Thrombozyten

In diesen Experimenten wurden die Thrombozyten mit 0,1 µg/ml LPS stimuliert. Zur besseren Identifizierung wurden die Thrombozyten mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Phalloidin für die F-Aktin Filamente und mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 für die Sialinsäure gefärbt. Es lässt sich kein Unterschied zwischen den Thrombozyten, die nur mit Fibrinogen kultivierten und den Thrombozyten, die zusätzlich noch mit LPS stimuliert wurden, erkennen. LPS aktiviert die Thrombozyten nicht in dem Maße wie  $\alpha$ -Toxin (vgl. 3.6).



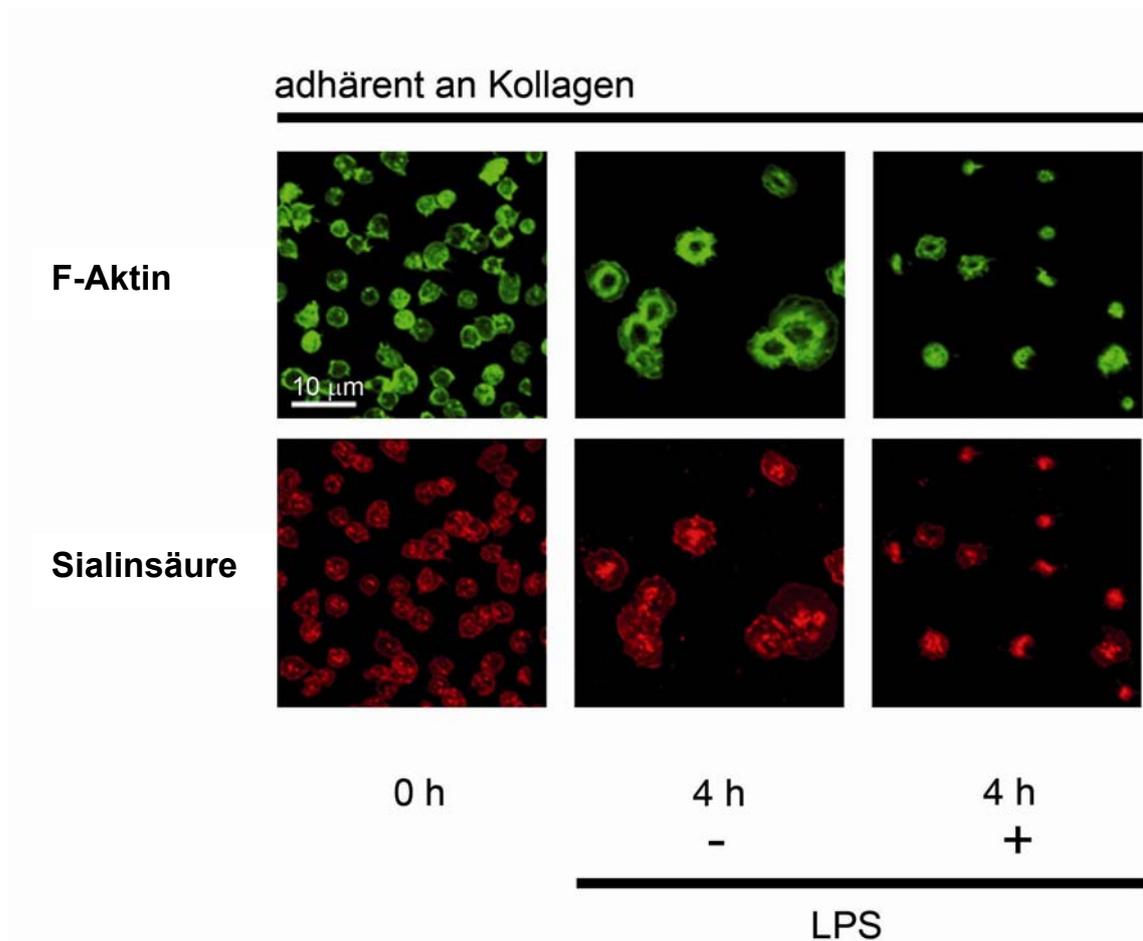
**Abbildung 3-36:** Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten im Medium, das zusätzlich Fibrinogen enthält: Die Thrombozyten wurden mit oder ohne LPS über vier Stunden in der Suspension kultiviert. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen.

Im nächsten Experiment wurden die Thrombozyten für vier Stunden auf Fibrinogen kultiviert. Nach vier Stunden zeigen die Kontrollthrombozyten ein typisches *spreading*. Dabei siedeln sich die Granula im Zellinneren an. Im Vergleich zeigen die LPS stimulierten Thrombozyten diese Eigenschaften nicht mehr. Dies lässt darauf schließen und bestätigt wiederum die schon gemachte Aussage, dass LPS die Thrombozyten nicht zum Spreading aktivieren kann. Umso erstaunlicher ist die Anordnung der Granula im Zellinneren.



**Abbildung 3-37:** Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten adhären an Fibrinogen: Eine Versuchsreihe wurde zusätzlich noch mit LPS behandelt. Nach vier Stunden zeigen die Zellen ein *spreading* auf Fibrinogen. Die Thrombozyten die vier Stunden in Fibrinogensuspension kultiviert wurden, zeigen eine Formveränderung (*spreading*). Die F-Aktin Färbung zeigt, dass die Aktinfillamente sich aus dem Zellinneren in die Außenbereiche verteilt haben. Die Granulas, die durch die Sialinsäure angefärbt wurden befinden sich im Zellinneren. In mit LPS stimulierten Thrombozyten ist kein *spreading* zu beobachten, die Granula befinden sich zentral in den Zellen.

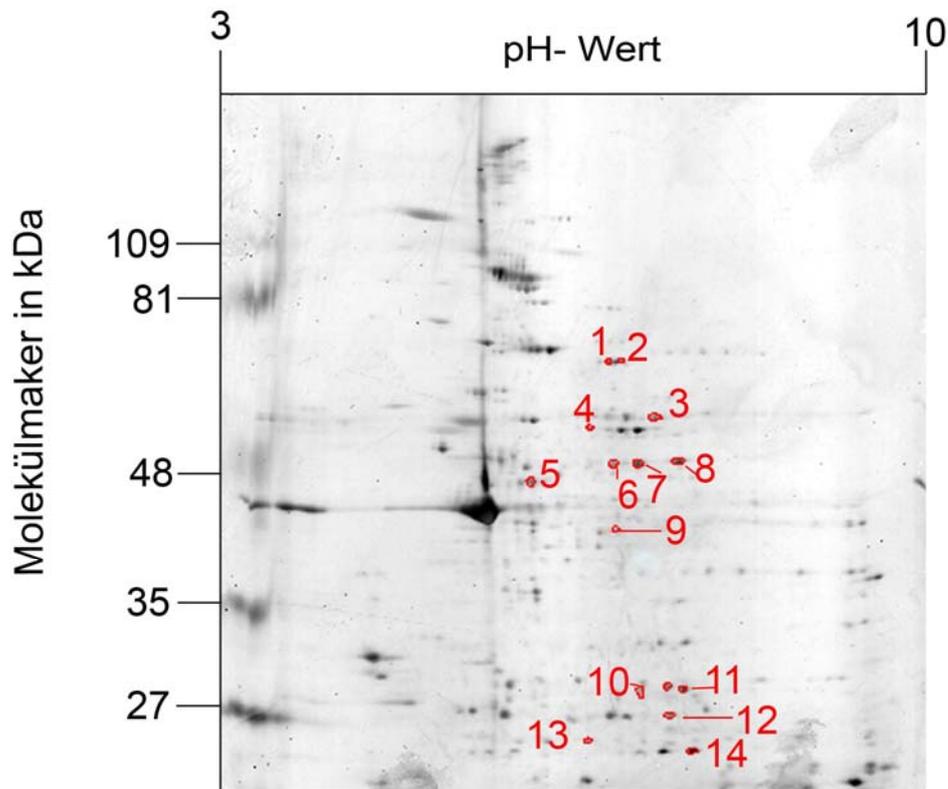
Im Gegensatz zu den an Fibrinogen adhären-, zeigen die an Kollagen adhärenen Thrombozyten ein ausgeprägtes *spreading*. Dabei vergrößert sich die Oberfläche um ein vielfaches und die Aktinfillamente verteilen sich kreisförmig über den gesamten Zellinnenraum. Die Granula, deren Sialinsäure angefärbt wurde, sind gut sichtbar zentral im Zelllumen verteilt. Ein ausgeprägtes Spreading wie in der Kontrollgruppe ist in der LPS-Gruppe nicht zu erkennen. Auch sind die Granula über das gesamte Zelllumen verteilt (siehe Abbildung 3-38)



**Abbildung 3-38:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kollagen adhärenter Thrombozyten, eine Versuchsreihe wurde mit LPS behandelt. Nach vier Stunden zeigen die Kontroll-Plättchen ein ausgeprägtes *spreading*. Die LPS stimulierten Thrombozyten zeigen hingegen kaum ein *spreading*.

### 3.8 Massenspektrometrische Auswertung der 2D Proteomanalyse

Zur Identifizierung veränderter Plättchenproteine wurden die Thrombozytenproteinlysate mit der 2-D Gelelektrophorese untersucht. Die 2-D Gelelektrophorese wurde dabei noch um die Detektion mittels phosphosensitiver Antikörper erweitert. Dabei wurden mehrere hundert Proteinspots von der Analysesoftware gefunden, die eine signifikante Veränderung zeigten. Die mit Hilfe der Software Proteomweaver gefundenen auffälligen Proteine wurden massenspektroskopisch mit der nanoHPLC/ESI-MS/MS Technik analysiert und sind in den Tabellen 30 und 31 dargestellt. In der Abbildung 3-41 ist ein Silbergel der vier Stundenexperimente dargestellt. Die Tabelle 30 gibt Auskunft über die in der Abbildung 3-39 nummerierten Spots.



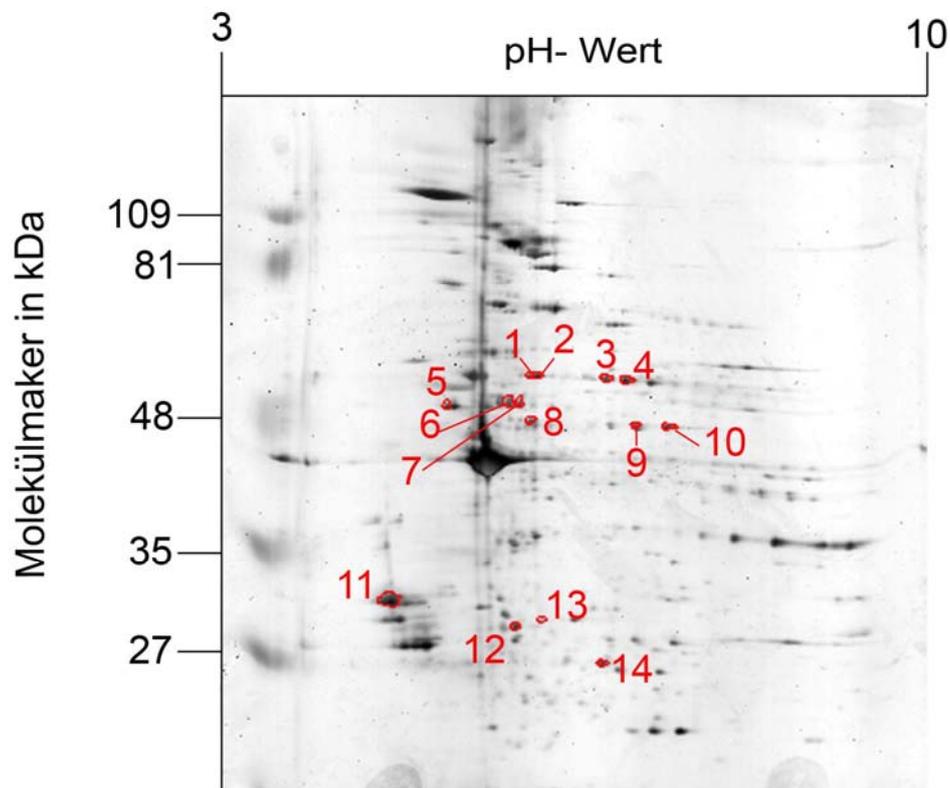
**Abbildung 3-39:** Silbergel der vier Stunden Experimente mit den ermittelten Proteinspots: Die Nummern bezeichnen, die in Tabelle 30 aufgeführten Spots und die identifizierten Proteine.

Nummer	Spot ID	Protein	Vorkommen/ Funktion	Literatur- quelle
1	68364	WD repeat protein 1 Aktin-interacting protein 1	Induziert den Abbau von Aktin-fillamenten	
2	68361	WD repeat protein 1 Actin-interacting protein 1	Induziert den Abbau von Aktin-fillamenten	
3	68353	Fibrinogen Beta chain	Monomere polymerisieren zu Fibrin, Cofaktor der Thrombozyten-aggregation	
4	68363	T-complex protein 1 subunit beta	Molekulares Chaparon an der Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt	
5	38474	PLEK Protein (Platelet p47 protein)	Hauptsubstrat der Protein C Kinase	[103]
6	38469	Coronin Actin binding Protein 1C	Funktion in der Signal Transduktion	[104]
7	71750_38477	Alpha Enolase	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasmidi-	

			nogen fungieren kann	
8	71751	Alpha Enolase	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann	
9	38472	Fumarylacetoacetase	Hydrolysiert 4 Fumarylacetoacetat in Fumarat und Acetat	
10	68356	Ras suppressor protein 1	steuert die RAS Signalkaskade	
11	68350_63113	Ras suppressor protein 1	steuert die RAS Signalkaskade	
12	68334	Triosephosphate isomeras 1 variant	Isomersase in der Fettsäurebiosynthese	
13	68368	DJ-1 Protein	Sensor für oxidativen Stress	
14	68365	Superoxid- Dismutase	mitochondrial, zerstört Radikale	

**Tabelle 30:** Liste, der nach vier Stunden Stimulation mit Thrombin, LPS und  $\alpha$ -Toxin regulierten Proteine.

Die Abbildung 3-40 zeigt ein zwölf Stundenexperiment Silbergel in Tabelle 31 sind die nummerierten Spots benannt.



**Abbildung 3-40:** Silbergel der zwölf Stunden Experimente mit den ermittelten Proteinspots. Die Nummern bezeichnen die in Tabelle 31 aufgeführten Spots und die identifizierten Proteine.

Liste der nach zwölf Stunden Toxin Stimulation signifikant veränderte Proteine aus dem Silbergel aus Abbildung 3-40.

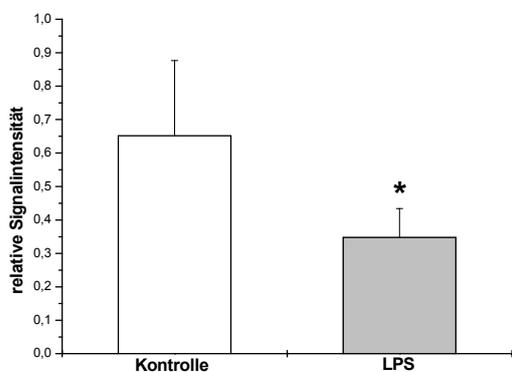
Num-mer	Spot ID	Protein	Vorkommen/ Funktion	Litera-tur- quelle
1	72763	Protein- disulfid- isomerase ER 60 precursor	Protein des ER und der Zellmembran, katalysiert den Um- Abbau von Disulfidbrücken	
2	72619	Protein-disulfide- isomerase ER 60 precursor	Protein des ER und der Zellmembran, katalysiert den Um- Abbau von Disulfidbrücken	
3	55613_443 47	Fibrinogen beta chain	Koagulationsfaktor, welches aus den $\alpha$ -Granula sekretiert wird	[105]
4	64942	Fibrinogen beta chain	Koagulationsfaktor, welches aus den $\alpha$ -Granula sekretiert wird	[105]
5	57838_1	H <sup>+</sup> transporting two sector ATPase (mitochondrial)	Mitochondrium Produziert ATP aus ADP unter Protonengradient	
6	44337_647 39	Fibrinogen gamma A chain precursor	Monomere polymerisieren zu Fibrin, Cofaktor der Thrombozytenaggregation	
7	44336	Fibrinogen gamma A chain precursor	Monomere polymerisieren zu Fibrin, Cofaktor der Thrombozytenaggregation	
8	64667	Alpha Enolase	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann	
9	57848_443 39	Alpha Enolase	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann	
10	57877_566 86	Alpha Enolase	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann	
11	64600	Tropomyosin 2	Bindet an Aktinfillamente von Muskel- und nicht Muskelzellen	
12	64601	AF212303	Glutathion abhängige Thiol-Transferase, im Zytosol	
13	5662	Proteindisulfid- isomerase	Protein des ER und der Zellmembran, katalysiert den Um- Abbau von Disulfidbrücken	
14	64598	Peroxiredoxin-6	Enzym welches an Redoxreaktionen der Zelle beteiligt ist	

**Tabelle 31:** Identifizierte Proteinspots, der zwölf Stunden Experimente mit Thrombin-, LPS- und  $\alpha$ -Toxin Stimulation.

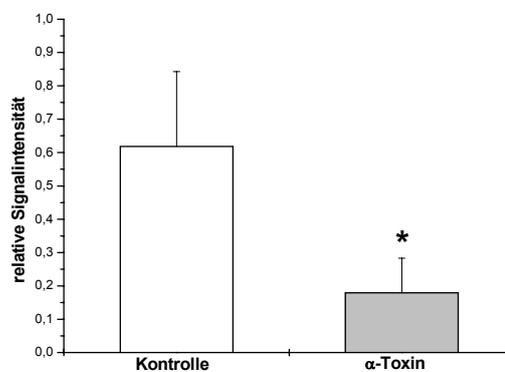
### 3.8.1 Effekte der Stimulation mit bakteriellen Toxinen auf die Proteinexpression

Die Regulation der unter Abschnitt 3.8 beschriebenen Proteine ist im Anhang 1 dargestellt. Dabei sind die unter den Versuchsbedingungen beschriebenen Zahlenwerte relative Expressionswerte der entsprechenden Proteine. Auf fünf regulierte Proteine unter Toxin Stimulation wird näher eingegangen: DJ-1 Protein, Ras suppressor Protein1, PLEK Protein, Fumarylacetoacetase sowie das Coronin actin binding Protein.

Beim DJ-1 Protein handelt es sich um eine atypische Peroxiredoxin ähnliche Peroxidase [106], welches als Redox-sensitives Chaperon agiert und als Sensor für oxidativen Stress dient. Als atypische peroxiredoxinähnliche Peroxidase reduziert DJ-1  $H_2O_2$ , in den Mitochondrien durch Oxidation an Cys 106. Der Verlust der DJ-1 Aktivität lässt den  $H_2O_2$ - Wert in den Mitochondrien rasch ansteigen [106]. In den Kontrollplättchen wird dieses Protein stark exprimiert (siehe dazu Anhang Tabelle 37). Mit Stimulation der Plättchen nimmt die Signalstärke in LPS stimulierten Thrombozyten um mehr als 40 % ab und in der  $\alpha$ -Toxin Gruppe ist DJ-1 nur noch zu 29 % exprimiert. Eine *down regulation* von DJ-1 lässt auf einen Anstieg des oxidativen Stresses schließen [107], mit nachfolgendem Verlust der *de novo* Synthese von DJ-1.

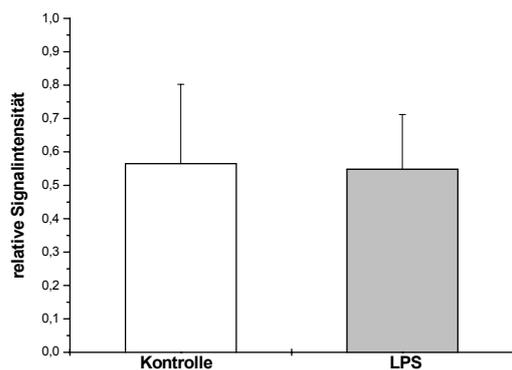


**Abbildung 3-41:** Änderung der relativen Signalstärke des DJ-1 Proteins in LPS stimulierten Thrombozyten zum Zeitpunkt vier Stunden (\* $p < 0,05$ ; bei  $n \geq 3$ )

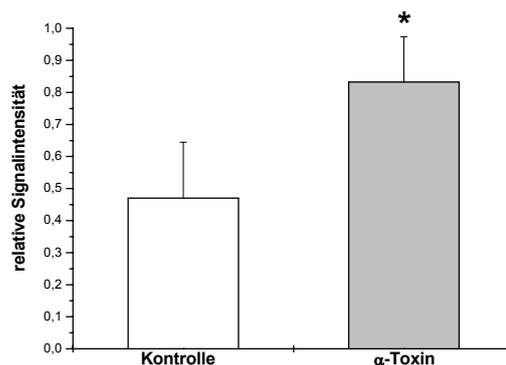


**Abbildung 3-42:** Änderung der relativen Signalstärke des DJ-1 in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Blutplättchen zum Zeitpunkt vier Stunden (\* $p < 0,05$ ; bei  $n \geq 3$ )

Ein weiteres Protein das Ras suppressor Protein 1 oder auch als Rsu-1 bezeichnet, ist ein LRR (leucin rich repeat) Protein. Rsu-1 blockiert die Ras Transformation und inhibiert so alle nachfolgenden Signalwege über Rho und Rac. Durch Stimulation mit LPS verändert sich die Expression kaum, doch nach vier stündiger Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin nimmt die Expression um 58 % zu.



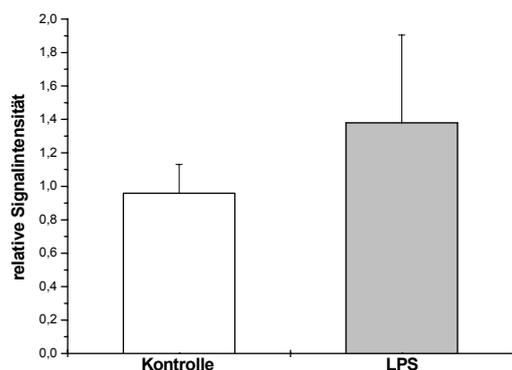
**Abbildung 3-43:** Ras- suppressor Protein 1 Expression nach vierstündiger Stimulation mit LPS.



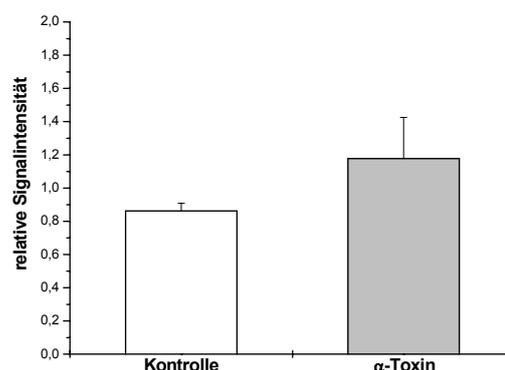
**Abbildung 3-44:** Expression von Ras-suppressor Protein 1, nach vierstündiger Stimulation mit α-Toxin ( $p < 0,05$  bei  $n=5$ ).

### 3.8.2 Änderung im Phosphorylierungsmuster Toxin stimulierter Thrombozyten

Unterschiede im Phosphorylierungsmuster einzelner Proteine geben Auskunft über die Funktionalität einzelner Proteine. Viele Proteine werden durch Serin-, Threonin- oder Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Durch geeignete Antikörper ist es möglich Veränderungen sichtbar zu machen. PLEK Protein oder Pleckstrin 1 ist das Hauptsubstrat der Protein Kinase C in Thrombozyten und Leukozyten [108]. Die Phosphorylierung von PLEK durch PKC an Serin oder Threonin führt zur Sekretion von Thrombozytengranula und gibt über den Aktivierungszustand der Thrombozyten Aufschluss [109].



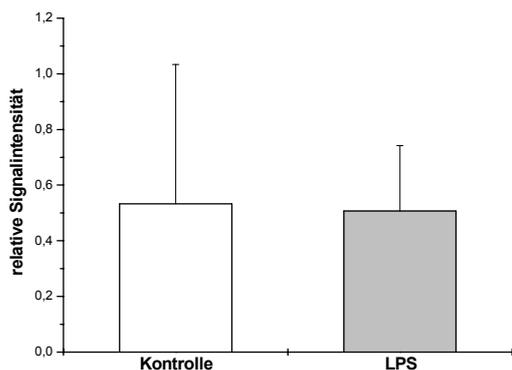
**Abbildung 3-45:** PLEK Protein Signal in LPS stimulierten Thrombozyten



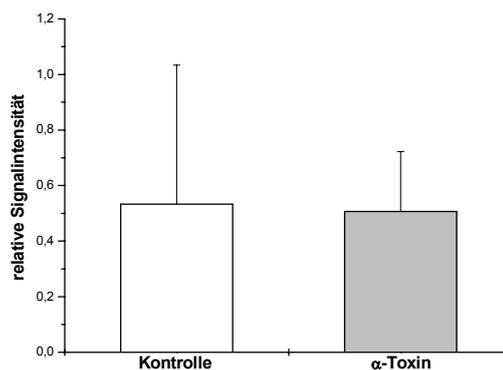
**Abbildung 3-46:** PLEK Protein Signal in α-Toxin stimulierten Thrombozyten

Der Phosphothreonin 2D- Western zeigt eine geringfügige Zunahme von 21 % der PLEK Phosphorylierung unter LPS Stimulation und einen geringfügig höheren Anstieg der Phosphorylierung von 36 % unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation.

Die Fumarylacetoacetase Hydrolase ist ein Enzym, welches die Hydrolyse von vier Fumarylacetoacetat in Fumarat und Acetoacetat katalysiert. Somit stellt es ein Stoffwechsellenzym dar.



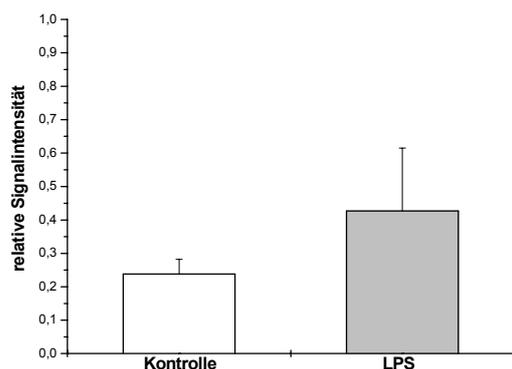
**Abbildung 3-47:** Threoninphosphorylierung von Fumarylacetoacetase in 4 h LPS stimulierten Thrombozyten (n=5).



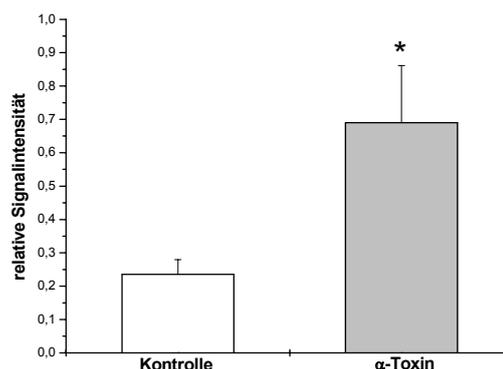
**Abbildung 3-48:** Threoninphosphorylierung  $\alpha$ -Toxin stimulierter Thrombozyten (4h) am Beispiel von Fumarylacetoacetase (n=5).

Unter Stimulation mit bakteriellen Toxinen, wie dem LPS und dem  $\alpha$ -Toxin, ist dieses Enzym geringer an Threonin phosphoryliert, als unter Kontrollbedingungen. In den LPS stimulierten Thrombozyten ist das Signal um 5% geringer und in den  $\alpha$ -Toxin stimulierten Zellen um 7 %, als das Kontrollsignal. Diese Schwankungen sind vernachlässigbar gering, zeigen jedoch den Einfluss der vierstündigen Stimulation auf die Proteinphosphorylierung.

Das Coronin-Actin-binding Protein gehört zur Gruppe der WD 40 Proteine. Coronin interagiert mit den F-Aktin Filamenten des Zytoskelettes. Das Protein ist damit am Umbau des Zytoskelettes während der Phagozytose, Chemotaxis, Degranulation und am *cell signaling* beteiligt. Eine vermehrte Phosphorylierung lässt somit auf eine verstärkte Aktivität dieses Proteins in toxinstimulierten Thrombozyten schließen. Unter Stimulation mit LPS steigt der Phosphorylierungsgrad um 79 % bezogen auf die Kontrollthrombozyten. Die Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin führt zu einer nahezu Verdreifachung der Intensität des Phosphothreonin Signals.

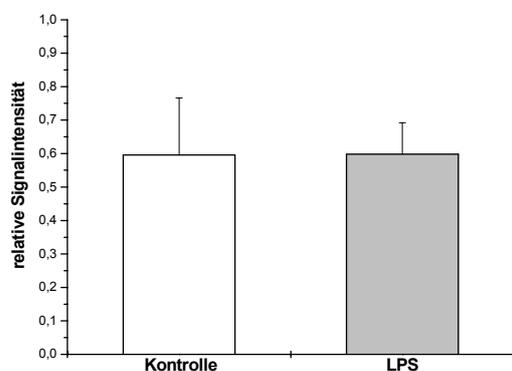


**Abbildung 3-49:** Phosphothreonin Signal vom Coronin Actin binding Protein in LPS stimulierter Thrombozyten im Vergleich mit Kontrollthrombozyten (4h Experiment n=5)

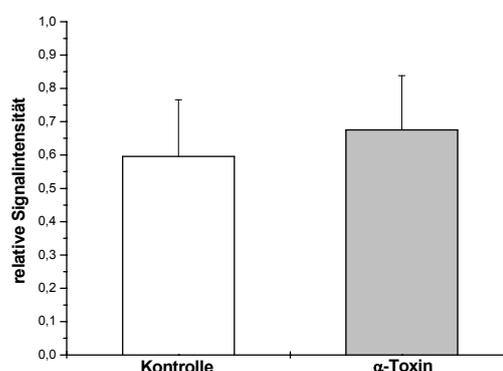


**Abbildung 3-50:** Phosphothreonin Signal vom Coronin Actin binding Protein α-Toxin stimulierter Thrombozyten im Vergleich zu Kontrollplättchen ( $p < 0,05$  bei  $n=5$ )

Die Protein-Disulfid-Isomerase ist an Redoxvorgängen und der Umlagerung von Disulfidbrücken einiger Proteine beteiligt. Sie kommt im Lumen vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor und katalysiert die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion. In LPS stimulierten Thrombozyten wird die Isomerase nicht signifikant reguliert. Im Unterschied dazu steigt das Protein Signal unter α-Toxin Stimulation um 13% an, aber unter Berücksichtigung des Kontrollsignals ist dies nicht signifikant.



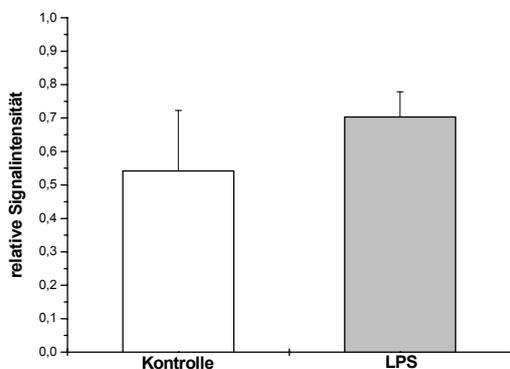
**Abbildung 3-51:** Signal der Protein-Disulfid Isomerase LPS stimulierter Thrombozyten.



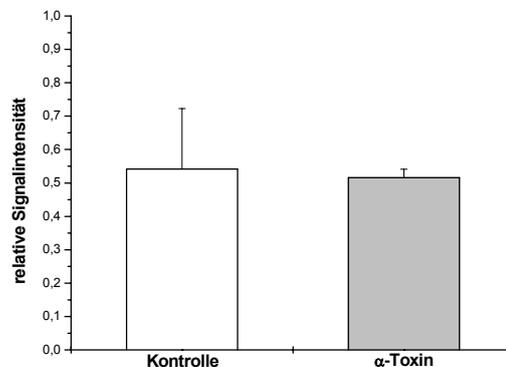
**Abbildung 3-52:** Signal, der Protein-Disulfid-Isomerase α-Toxin stimulierter Thrombozyten.

Peroxiredoxin-6 gehört zur Familie der Peroxiredoxine. Diese nutzen die Redoxeigenschaften des Cysteins um Peroxide zu reduzieren. Peroxiredoxine unterstützen die Redoxbalance der Zellen im Normalzustand und unter oxidativem Stress. Die 6 Peroxiredoxine sind an den Orten der ROS (reaktive Sauerstoffverbindungen) verteilt, somit findet man sie im Zytosol in den Mitochondrien und den Peroxisomen. Das Peroxiredoxin-6 ist ein bifunktionales Protein, mit sowohl Glutathion-Peroxidase als auch

Phospholipase A2 Eigenschaften [110]. In LPS stimulierten Thrombozyten ist eine Zunahme der Signalintensität um 29 % in Silbergefärbten Gelen nach 12 Stunden zu beobachten. Im Gegensatz dazu nimmt das Signal in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten um 5 % ab.

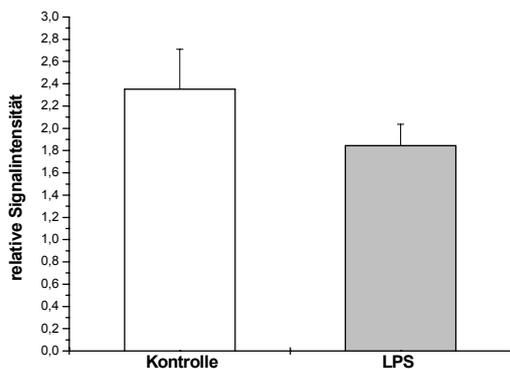


**Abbildung 3-53:** Peroxiredoxin-6 Signal in LPS stimulierten Thrombozyten (n=5; 12 h Experimente).

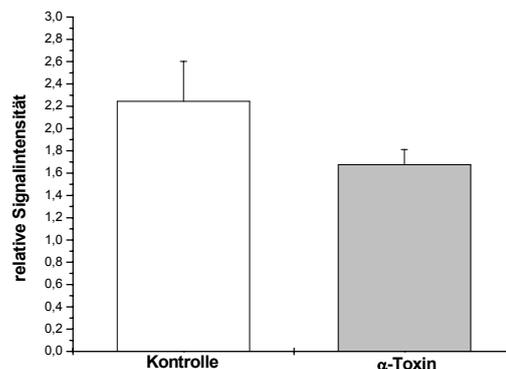


**Abbildung 3-54:** Peroxiredoxin-6 in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten (n=5; Zeitraum 12 h).

Tropomyosin-2 ist ein Aktin bindendes Protein, welches die Kontraktion der Aktinfäden und somit den *shape change* in Thrombozyten regulieren kann [111].



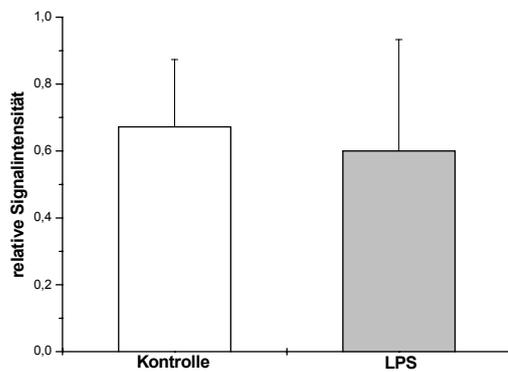
**Abbildung 3-55:** Tropomyosin-2 Signal LPS stimulierter Thrombozyten.



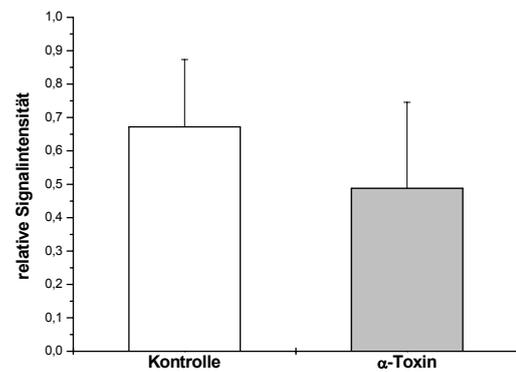
**Abbildung 3-56:** Tropomyosin-2 Signal  $\alpha$ -Toxin stimulierter Thrombozyten.

Unter Toxin Stimulation mit LPS verringert sich die Signalintensität um 12 % und in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten sogar um 26 %, in Bezug auf das Kontrollsignal nicht stimulierter Thrombozyten nach zwölf Stunden in Silber gefärbten Gelen. Die statistische Auswertung ergab jedoch einen nicht signifikanten Unterschied in den Versuchsbedingungen im Vergleich zum Kontrollsignal.

Die Auswertung der zwölf Stunden Phosphothreonin Gele ergab eine minimale Veränderung der  $H^+$  transporting two sector ATPase. Sie katalysiert die Synthese von ATP aus ADP entgegen eines Protonengradienten in der inneren Membran des Mitochondriums. In den LPS stimulierten Thrombozyten sinkt das Phosphothreonin Signal um 11% an. Die Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin führt zur Abnahme des Signals um 28 %.



**Abbildung 3-57:** Phosphothreonin Signal der  $H^+$  transporting two sector ATPase in LPS stimulierten Thrombozyten ( $n \geq 3$ ; 12 h Zeitraum).



**Abbildung 3-58:** Phosphothreonin Signal der  $H^+$  transporting two sector ATPase in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten ( $n \geq 3$ ;  $t = 12$  h).

## 4 Diskussion

### 4.1 Thrombozytenaktivierung

Die Funktion der Thrombozyten im Falle einer Verletzung ist schon seit längerem bekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit mehrfach beschrieben. Allen diesen Funktionen der Thrombozyten in der Primär- und Sekundär-Hämostase geht eine Thrombozytenaktivierung voraus, denn wie in vielen Systemen beruht die Funktion einzelner Elemente auf der Regulation ihrer Aktivität. Das Blutplättchen, welches durch chemische Botenstoffe andere Blutplättchen und Blutzellen aktivieren kann, ist damit in der Lage, selbst diese Regulation zu steuern. Thrombin, ein endogen produziertes Signalpeptid, kann durch Bindung am PAR-Rezeptor ein *outside-in-signalling* steuern, was zu einer Aktivierung des Thrombozyten führt der GPIIb/IIIa-Rezeptor wird funktionalisiert und kann Fibrinogen binden. Durch die Bindung von Fibrinogen kommt es zur Aggregation der Thrombozyten. Die aggregierten Thrombozyten sezernieren wiederum ihren Granulainhalt [16] und aktivieren so weitere im Blut zirkulierende Thrombozyten. Als sicherer Aktivierungsmaker für die Thrombozyten gilt der GPIIb/IIIa-Rezeptor.

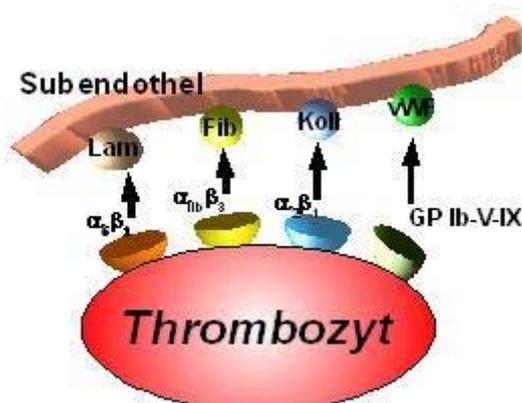


Abbildung 4-1: Thrombozytenoberflächenrezeptoren und ihre Substrate im Subendothel.

Eine Aktivierung kann nicht nur durch endogene Substanzen wie ADP, Thrombin und PAF erfolgen. Es können auch bakterielle Toxine, die in die *Innenwelt* des Körpers gelangen, Thrombozyten aktivieren. Durch Einwirkung von LPS auf die Thrombozyten sind sie in der Lage, durch ihre TLR4 gekoppelten Signalkaskaden gespeicherte mRNA in die entsprechenden Proteine umzuschreiben. Die FACS-Analysen zeigen ebenfalls eine Aktivierung des GPIIb/IIIa über einen Zeitraum von mehr als zwei Stunden. Trotz der Funktionalisierung des GP IIb/IIIa ( $\alpha_{1b}\beta_3$ ) Rezeptors konnte mit LPS im Gegensatz zum  $\alpha$ -Toxin keine Aggregation gemessen werden. Es finden sich auch keine Literaturquellen die eine Aggregation von humanen Thrombozyten belegen. Dies kann zum einen auf die *unzureichende* Aktivierung der Thrombozyten über die Bindung des LPS an dem LPB, gefolgt von einer TLR4 MD-2 Signalkaskade Aktivierung, zu-

rückgeführt werden. Die Aggregation wird jedoch in wenigen Minuten gemessen. In der Durchflusszytometrie wird eine Funktionalisierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors erst nach 30 Minuten messbar. Einen weiteren Hinweis für die Aktivierung der Thrombozyten durch LPS zeigen die Adhäsionsexperimente, in denen LPS stimulierte Thrombozyten eine signifikant erhöhte Adhäsion an Fibrinogen über den Zeitraum von vier Stunden zeigen, im Vergleich zu Thrombin und  $\alpha$ -Toxin. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Angaben aus der Literatur [112] und gibt einen Hinweis darauf, dass Zellen adhären werden können ohne eine signifikante Aktivierung zu erfahren.

Das  $\alpha$ -Toxin des *Staphylococcus aureus* ist ein Exotoxin, welches schon in früheren Experimenten gezeigt hat, dass es die Thrombozyten aktivieren kann. Aufgrund der besonderen porenbildenden Eigenschaften des  $\alpha$ -Toxins sind für die Aktivierung keine speziellen Rezeptoren auf den Thrombozyten notwendig. Der Aktivierungsmechanismus geht auf die Porenbildung in der Thrombozytenmembran und damit auf die Störung des Ionengleichgewichts der Zelle zurück. Dadurch gelangen extrazelluläre Calcium-Ionen in das Zytosol und DAG und Pkl abhängige Signalkaskaden werden aktiviert. Da der Austausch der Ionen durch diese Ionenkanäle unkontrolliert erfolgen kann, ist dieses Aktivierungsmuster nicht reguliert. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin zeigt eine konzentrations-abhängige Aggregation, die durch den Einsatz von Aktivierungsinhibitoren, wie Abciximab, aufgehoben werden kann. So ist es möglich, dass einzelne Thrombozyten durch Porenbildung und einem Calcium-Einstrom aktiviert werden können. Dieser Aktivierung folgt eine Granulasekretion und weiterführend die Aktivierung anderer Thrombozyten. Mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptorblocker Abciximab kann keine Brückenbildung über Fibrinogen erfolgen, damit bleibt jedoch eine messbare Aggregation aus. Die Adhäsion von Thrombozyten an die verschiedenen Matrices konnte durch Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin im Vergleich zur Kontrolle nicht weiter gesteigert werden. Ein Grund dafür kann die Aggregation, der  $\alpha$ -Toxin stimulierten, Thrombozyten sein, die schon nach wenigen Minuten abgeschlossen ist. In den Adhäsionsexperimenten wurden die Zellen vier Stunden auf den Matrixproteinen kultiviert. Hier sind stets Aggregate in den Kulturen makroskopisch erkennbar gewesen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen, dass die maximale Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors bereits nach 30 Minuten abgeschlossen ist. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse kann man zu dem Schluss kommen, dass *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin sofort nach Kontakt mit den Thrombozyten Poren ausbildet. Durch diese Porenbildung werden die Zellen sofort aktiviert. Wohingegen das LPS eine verzögerte Aktivierung der Thrombozyten verursacht. Dort wird das Maximum der GPIIb/IIIa Rezeptoren erst nach einer Stunde im FACS sichtbar. Die unterschiedlichen Aktivierungsmuster, die sowohl rezept-

torabhängig als auch rezeptorunabhängig sein können, sind für das sehr ungleiche Ansprechen der Zellen verantwortlich.

#### **4.2 Proteinexpression Toxin stimulierter Thrombozyten am Beispiel des Bcl-3.**

Die Proteinbiosynthese in Thrombozyten weicht von zellkernhaltigen Zellen ab. Eine Transkription, wie sie im Zellkern stattfindet, konnte in Thrombozyten noch nicht nachgewiesen werden. In Thrombozyten beschränkt sich die Proteinbiosynthese auf die Translation der m-RNA, welche aus den Megakaryozyten stammt. Dabei unterliegt die Translation der RNA in, das entsprechende Peptid einem gewissen Regelkreis. Die Thrombozyten müssen erst eine Strukturveränderung dem *shape change* erfahren, bevor die Proteinbiosynthese anlaufen kann.

Erst durch diese Strukturveränderung gelangen die für die Translation notwendigen Komponenten in Kontakt. Sie befinden sich in den nicht aktivierten, runden Thrombozyten in verschiedenen Zellkompartimenten. Nach dem *shape change* kann der eIF4E an die m-RNA angelagert werden und die Translation läuft an [15]. In verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Bedingungen; Stimulation des PAR-Rezeptors durch Thrombin, Aktivierung über den TLR4 Rezeptor durch LPS und über Zellmembranporen verursacht durch  $\alpha$ -Toxin, konnte keine Expression von Bcl-3 beobachtet werden. Erst mit zusätzlicher Stimulation der Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oder GPVI konnte eine Bcl-3 Expression initiiert werden. Bcl-3 diene in diesem Falle als Muster- oder Beispielprotein, das nach Thrombinstimulation von Thrombozyten exprimiert wird [17, 61].

Erst durch eine Co-Stimulation mit Kollagen, Fibrinogen oder Laminin konnte eine Bcl-3 Expression beobachtet werden. Dies belegt die Aussagen von Pabla et al. [61], Weyrich et al. [77] und Lindemann et al. [15], dass für die Proteinbiosynthese in Thrombozyten Co-Faktoren notwendig sind, die einen *shape change* bewirken.

Im Falle des Kollagens erfolgt eine  $G_i$ -Protein abhängige Aktivierung über das GP VI. Durch dieses *inside out* signaling wird der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa (auch als Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bezeichnet) funktionalisiert und es kann nun lösliches Fibrinogen binden. Die Zelle unterzieht sich einem *shape change*, wohingegen die Thrombozyten direkt an Fibrinogen über ihren GP IIb/IIIa Rezeptor binden. Durch dieses *outside in* signaling wird in der Zellen ein Signalkaskade ausgelöst, die zum *shape change* führt [113]. Weitere Stimulation durch bakterielle Toxine (LPS,  $\alpha$ -Toxin) oder Thrombin konnten die Bcl-3 Expression nur in der Frühphase von 30 Minuten bis vier Stunden steigern. Nach zwölf Stunden sind kaum noch Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsreihen zu erkennen. Vielmehr ist ein Rückgang der Bcl-3 Expression in den Toxin stimulierten

Gruppen sichtbar. Diese verminderte Expression ist möglicherweise auf die toxischen Eigenschaften der Stimulanzien zurück zu führen, die im Falle des  $\alpha$ -Toxins zellzerstörende Eigenschaften besitzt (vgl. 3.6).

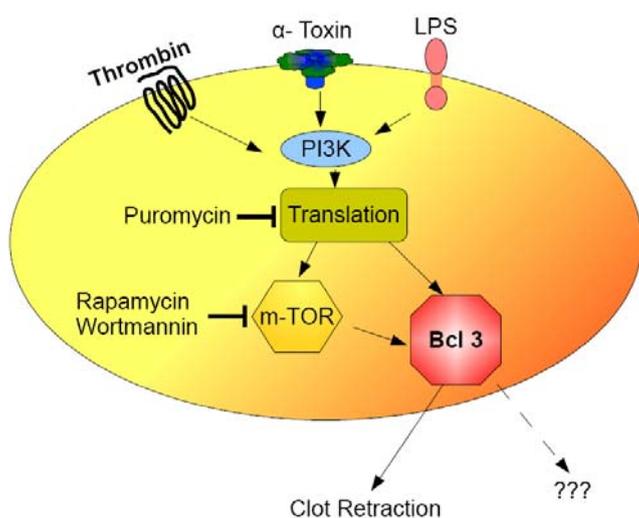
#### 4.2.1 Reduktion durch Translationsinhibitoren

Eine Verringerung der Bcl-3 Expression wurde auch durch den Einsatz geeigneter Translationsinhibitoren erreicht. Dabei wurden drei Inhibitoren eingesetzt, die unterschiedliche Angriffspunkte in der Translation haben (siehe Abbildung 4-2): Puromycin, Rapamycin und Wortmannin. Das Puromycin, als falsches Analogon in der Anelierungsphase der Translation eingebaut, führt zum Abbruch der Aminosäurekette und somit zum Entstehen von Nonsenseptiden. Puromycin zeigt im Vergleich zu den beiden anderen Inhibitoren den größten inhibierenden Effekt auf die Bcl-3 Expression.

Wortmannin und Rapamycin greifen in der Initiationsphase die Translation ein. Rapamycin inhibiert die Translation durch Bindung an das zelleigene m-TOR (mammalian target of rapamycin). Diese Bindung bewirkt eine Hemmung der m-TOR Aktivität. Die Serin/Threonin- Kinase m-TOR gehört in die Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen [63]. Als Bestandteil eines Proteinkomplexes reguliert es unter anderem die Translation. Der durch Rapamycin gehemmte Komplex ist der m-TOR complex 1, bestehend aus m-TOR, Raptor (regulatory associated protein of m-TOR) sowie ein G- Protein  $\beta$ -Untereinheit- ähnliches Protein (G $\beta$ L), auch als mLST8 bezeichnet [64]. Beide, sowohl Raptor als auch mLST8, regulieren die m-TOR abhängige Phosphorylierung der S6 Kinase1 und des 4E-B Protein 1 (4 eukariotischen Bindungsprotein 1) in vivo und in vitro. Rapamycin unterbindet die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Serin 65 und Threonin 70, und somit die Bildung eines funktionsfähigen eIF4F Komplexes [65]. Damit steht ein wichtiger Translationsfaktor nicht zur Verfügung und die Translation kann nicht anlaufen. Wortmannin wirkt inhibierend auf die Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3K), welche über die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) und die Protein Kinase B (PKB) letztendlich auf m-TOR wirkt. Somit wird die 4E-BP1 Phosphorylierung gehemmt. Es können keine eIF4F Komplexe gebildet werden. Als Folge daraus ist die Translation gehemmt.

Der Einsatz der m-TOR Inhibitoren hat gezeigt, dass die Translation von Bcl-3 über m-TOR reguliert wird. Doch konnte durch diese sehr gezielte Inhibierung durch m-TOR die Expression von Bcl-3 nicht vollständig unterbunden werden. Durch diese sehr selektive Inhibierung werden nicht alle Expressionswege unterbunden. In den Puromycinversuchen konnte die Bcl-3 Expression vollständig unterbunden werden. Der Nachteil beim Einsatz von Puromycin ist, dass es die Proteinexpression auch anderer Proteine inhibiert, die nicht über m-TOR reguliert werden. Somit ist eine geregelte Thrombo-

zytenfunktion nicht mehr gewährleistet. Eine Inhibierung einzelner Proteine, die z.B. nur über m-TOR reguliert werden, ist demnach sinnvoll und sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein, um möglichst gezielt in die Regelkreisläufe eingreifen zu können und damit eine eingeschränkt Funktionalität noch erhalten bleibt. So wird in Thrombozyten nicht nur Bcl-3 exprimiert, welches für die *Clot Retraction* verantwortlich ist [77], vielmehr werden Proteine wie TF [14] und IL-1 [18] exprimiert, die wichtige Funktionen in der Inflammation und der Gerinnungskaskade übernehmen. So wird von Thrombozyten auf Stimulation mit Thrombin IL-1 $\beta$  synthetisiert [18], welches dann den Entzündungsprozess aktiviert oder noch verstärkt. In den letzten Jahren wurden einige Proteine gefunden, die neu von Thrombozyten synthetisiert wurden [14, 17, 18]. Die *de novo* Synthese von Tissue Faktor [14] zeigt, dass die Thrombozyten Regulationsmechanismen besitzen, mit denen sie in der Lage sind, selbst die Gerinnung zu aktivieren, indem sie die enthaltene m-RNA für den Tissue Faktor splicen, d.h. funktionalisieren und anschließend die erhaltene Information in das entsprechende Protein übersetzen. Das Protein kann dann ausgeschieden oder auf der Zelloberfläche präsentiert werden und somit weitere Thrombozyten aktivieren. Somit sollte die Funktion der Thrombozyten neu überdacht werden. Sie sind nicht nur einfache unspezifische Zellen, die eine Läsion verschließen, vielmehr sind sie hoch spezialisierte Zellen die auf äußere Reize mit einer gezielten Antwort reagieren. Die Antwort kann die Expression spezieller Proteine sein, aber auch die Sekretion von Substanzen aus den Granula, die ihrerseits wiederum andere Zellen und Zellen des Immunsystems aktivieren können.



**Abbildung 4-2:** Beeinflussung der Bcl-3 Expression mit verschiedenen Translationssinhibitoren.

- Beeinflussung der Aggregatstabilität
- Ausbildung von festen Thromben
- Gefäßokklusion

### 4.3 Identifizierung und Regulation thrombozytärer Proteine

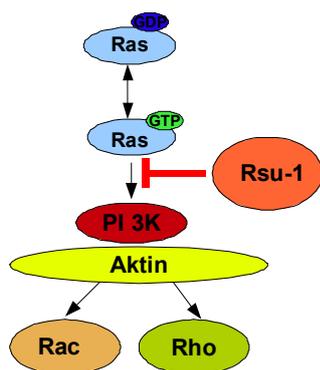
Die 2-D Gelelektrophorese sowie die anschließende massenspektroskopische Analyse der Thrombozyten Proteinlysate haben gezeigt, dass die Thrombozyten nach Toxin Stimulation mehrere Proteine regulieren. Im Anhang sind die veränderten Proteine in den Tabellen 37-42 im Detail aufgeführt. Die folgenden Tabellen sollen eine kleine Übersicht über die Identifizierten Proteine geben.

Silbergele	LPS	$\alpha$ -Toxin	biologischer Effekt
DJ-1*	↓	↓ ↓	Sensor für oxidativen Stress
WD- repeat Protein 1	↓	↓ ↓	induziert den Abbau von Aktinfilamenten
Ras suppressor Protein 1	↑	↑ ↑	steuert die RAS Signalkaskade
SOD	↓	↑	mitochondrial, zerstört Radikale
T- complex Protein 1 subunit beta	↑ ↑	↑	Molekulares Chaperon an der Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt
Triosephosphat isomerase 1 variant	↓	↑	Isomerase in der Fettsäurebiosynthese

**Tabelle 32:** Dargestellt sind die Proteine, die nach vierstündiger Stimulation mit bakteriellen Toxinen eine Veränderung in ihrer Spotintensität (Proteinexpression) aufweisen. Die Pfeile charakterisieren eine Zu- bzw. Abnahme der Signalintensität bezogen auf die Intensität nicht stimulierter Kontrollplättchen.

Das DJ-1 Protein, ein Protein was die Zelle vor oxidativen Stress schützen soll, ist in den Kontroll- als auch in den Toxin stimulierten Thrombozyten vorhanden, doch nimmt mit Toxin-Stimulation die Signalintensität und somit die Konzentration in der Zelle sehr stark ab. In den  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten beträgt die Intensität nur noch 29% vom Ausgangswert, die Zelle ist somit sehr starkem Stress ausgesetzt, was zum Abbau des DJ-1 Proteins führt. Das DJ-1 Protein ist eine atypische peroxiredoxinähnliche Peroxidase die durch Oxidation an Cys 106  $H_2O_2$  reduziert. Diese Reduktion findet meist in den Mitochondrien statt [106]. Ein Verlust der DJ-1 Aktivität führt zu einem Anstieg von  $H_2O_2$  in den Zellen. Es konnte aber nicht eindeutig geklärt werden, wieso kein Anstieg und somit eine Neusynthese vom DJ-1 Protein erfolgt, was zu erwarten gewesen wäre. Doch ein Anstieg an DJ-1 wurde weder unter Toxin noch unter Stimulation von Fibrinogen und Thrombin beobachtet. Dem Zufolge ist die Abnahmen stimula-

tionsbedingt und nicht auf einen toxischen Effekt der bakteriellen Toxine zurück zu führen. Das Ras-suppressor- Protein 1 (Rsu-1) hingegen erfährt unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation eine signifikante Zunahme der Intensität. Rsu-1 blockiert die Ras Transformation und inhibiert so alle nachfolgenden Signalwege über Rho und Rac. Von den drei Rac GTPasen konnte nur die Rac-1 in Thrombozyten nachgewiesen werden [114]. Demnach wird nach vierstündiger Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin 58 % mehr Ras suppressor Protein exprimiert als unter Kontrollbedingungen. Demzufolge werden unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation durch das Rsu-1 alle Rho und Rac Signalwege blockiert.



**Abbildung 4-3: Ras Signalweg:** Hier wird Ras durch Bindung an GTP aktiviert. Das aktivierte Ras reguliert über Phosphoinositol 3 Kinase (PI 3K) und Aktin die GTPasen Rac und Rho. Rac und Rho regulieren verschiedene Thrombozytenfunktion wie *shape change* und Granulasekretion [115]. Rsu-1 blockiert den Ras Signalweg.

- Sekretion
- Integrin Aktivierung
- Metabolismus z.B Calcium
- *shape change*

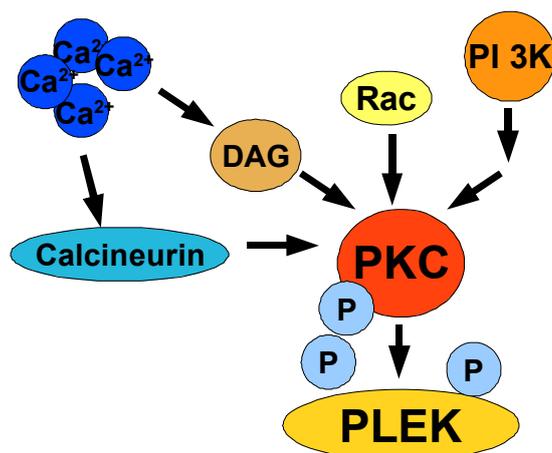
Es Folgt durch Rho und Rac Blockade eine Verringerung des *shape change*. Da Rac-1 die Phospholipase Cy 2 und Phospholipase C $\beta$  aktiviert [114, 116, 117], die den Calciumeinstrom in die Zelle reguliert, werden über einen Calciumeinstrom die Funktionen wie Adhäsion, Sekretion und Thrombusausbildung gesteuert [116]. Rac-1 ist des Weiteren an der Regulation der Lamellopodienformation in Thrombozyten nach Aktivierung und Adhäsion beteiligt [118]. Der Inhibierung von Rac-1 durch Rsu-1 folgt damit eine verminderte Aktivierung der Thrombozyten mit nachfolgendem verminderten *shape change* und Aggregation. Eine Hochregulation des Rsu-1 kann als ein negativer Feedbackmechanismus gesehen werden, denn durch eine erhöhte Rac-1 Aktivität kommt es zum intrazellulären Anstieg von Calciumionen durch Phospholipase Cy 2 und Phospholipase C $\beta$  Aktivierung. Da der Calciumeinstrom in die Zelle durch die  $\alpha$ -Toxinporen unkontrolliert erfolgt, versucht die Zelle durch Inhibierung des Rac Systems dem entgegen zu wirken. Anders dagegen die LPS stimulierten Thrombozyten. Sie zeigen keine Veränderung in der Rsu-1 Protein Expression. Das zeigt, dass LPS die Thrombozyten nicht so stark aktivieren kann wie  $\alpha$ -Toxin.

## Veränderung im Phosphorylierungsmuster thrombozytärer Proteine

Phosphoserin	LPS	$\alpha$ -Toxin	biologischer Effekt
Alpha Enolase	↓ ↓	↓	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann
Phosphothreonin			
PLEK	↑	↑ ↑	Hauptsubstrat der Protein C Kinase
Fumarylacetoacetase	↓	↓ ↓	Hydrolysiert 4 Fumarylacetoacetat in Fumarat und Acetat
Alpha Enolase	↑	↑	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann
Coronin Actin Binding Protein 1C	↑ ↑	↑ ↑ ↑	Funktion in der Signal Transduktion

**Tabelle 33:** zeigt alle Proteinen welche nach vierstündiger Stimulation eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster aufweisen. Dabei wurden Phosphothreonin und Phosphoserin sensitive Antikörper benutzt. Die Pfeile geben Aufschluss darüber, ob unter den jeweiligen Bedingungen die Spotintensität in Bezug auf unstimulierte Thrombozyten zu oder abgenommen hat.

Eine Steigerung der Expression wird ebenfalls beim PLEK Protein beobachtet. Das PLEK Protein oder Pleckstrin 1 (*platelet and leukocyte C kinase substrate*) ist das Hauptsubstrat der Protein Kinase C in Thrombozyten und Leukozyten [108]. Hier wird eine Zunahme der Threonin-Phosphorylierung sowohl unter LPS (21%) als auch unter  $\alpha$ -Toxin (62%) Stimulation erreicht. Eine gesteigerte Threonin-Phosphorylierung führt zu einer Sekretion der Granula [108, 109]. Diese Erkenntnis deckt sich mit den fluoreszenz gefärbten mikroskopischen Aufnahmen, die sowohl unter LPS als auch unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation eine Verschmelzung der Granula mit der Thrombozytenzellmembran zeigen. Diese Verschmelzung ist bei den LPS stimulierten Thrombozyten nicht so stark ausgeprägt wie bei den  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten. Die Phosphorylierung an Serin und Threonin des Pleckstrin wird durch Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat gesteuert, einer Phosphorylierung des Pleckstrin durch eine Aktivierung der PKC (Protein Kinase C) [119, 120]. Die Protein Kinase C gehört in die Familie der Serin/Threonin Kinasen, die für lebenswichtige Zellsignalwege benötigt werden, wie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung. Eine Erhöhte PKC Aktivität führt zur Sekretion der Granulainhalte und Funktionalisierung der Integrine in Thrombozyten [121, 122].



**Abbildung 4-4:** PLEK Phosphorylierung durch PKC, welche durch DAG und Calcium sowie Rac und PI3 Kinase aktiviert wird (P= Phosphat).

Die Protein Kinase C wird durch DAG Diacylglycerol, Calcium sowie Rac in PI 3K (Phosphoinositol 3 Kinase) aktiviert. Demzufolge aktiviert  $\alpha$ -Toxin die PKC durch einen erhöhten Calciuminflux und damit verbunden einer vermehrten DAG Aktivität. Der Aktivierungsmechanismus des LPS ist nicht so eindeutig zu erklären. In der Literatur finden sich verschiedene Quellen die einen Zusammenhang zwischen der LPS- TLR4 vermittelten Aktivierung der PKC Isoform  $\alpha$  und  $\beta$  zeigen [123]. Diese Isoformen aktivieren dann nachfolgend MAPK Kinasen. Damit ist auch eine Aktivierung der PKC vermittelten Phosphorylierung des PLEK durch LPS denkbar. Die erhöhte PKC Aktivität führt zu einer Phosphorylierung von PLEK an Ser 113, Ser 117 und Thr 114. Die genaue Funktion des PLEK-Proteins ist jedoch noch nicht genau aufgeklärt, jedoch werden Interaktionen mit Polyphosphoinositol wie dem PtdIns-4,5-P<sub>2</sub>, beschrieben, welches über die Pleckstrin Homolog Domäne am N-Terminus des Proteins interagiert [124, 125]. Andere Ergebnisse beziehen das Pleckstrin in den Aktin Umbau ein, welches nach Phosphorylierung an dem Rac vermittelten Aktinumbau beteiligt ist [126]. Ein weiteres am Aktin Komplex der Thrombozyten angreifendes Protein ist das Coronin Actin binding Protein.

Das *Coronin Actin binding Protein* ist mit dem Aktin der Thrombozytenzelle verbunden und am Umbau der Zelle, dem so genannten *shape change*, beteiligt. Ein Anstieg dieser Proteins wurde auch bei Patienten mit einer arteriellen Thrombose beobachtet [127]. Unter Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin verdreifacht sich das Signal, unter LPS Stimulation verdoppelt es sich. Hier zeigt sich wieder, dass LPS einen geringeren Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Thrombozyten im Vergleich zum  $\alpha$ -Toxin aufweist. Durch die Aktivitätszunahme des Coronin Actin binding Proteins wird ein Umbau des thrombozytären Aktingerüsts veranlasst. Dabei gehört das Coronin zu den WD-repeat Proteinen [128]. Die genaue Funktion des Coronin Actin binding Proteins ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Ihm wird unter anderem eine Funktion im Vesikeltransport

zugesprochen. Die bedeutsamere Funktion ist jedoch der Einfluss auf das Aktin und damit der Beitrag zum *shape change* von Zellen [129]. Eine massive Änderung im Zytoskelett führt zu einer Veränderung im Expressionsverhalten der Thrombozyten. Denn erst durch den *shape change* sind die Thrombozyten in der Lage Proteine zu exprimieren, da erst dann die Translation initiiert werden kann. Die Regulation in Patienten mit arterieller Thrombose zeigt die klinische Relevanz des Proteins. Dieses Ergebnis stellt aber auch die Relevanz der bakteriellen Toxine bei thrombotischen Ereignissen dar, denn sowohl unter LPS als auch unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation ist ein Anstieg des Coronin Actin binding Proteins beobachtet worden. So wurden nach vierstündiger Stimulation mit bakteriellen Toxinen nicht nur die Proteine reguliert, die im Ergebnisteil besprochen wurden, sondern auch Proteine wie neusynthetisiert oder phosphoryliert. Im Anhang befinden sich alle gefunden und regulierten Proteine. Unter ihnen befinden sich weitere WD-40 Proteine wie das WD-repeat Protein 1. WD-40 repeat Proteine zeichnen sich durch eine Wiederholung von mindestens vier WD Sequenzen aus, wobei die WD Sequenz aus 40-60 Aminosäuren besteht, die am N-Terminus mit einem Glycin/Histidin Dipeptid startet und am C-Terminus mit einem Tryptophan/ Asparaginsäure Dipeptid endet. Das WD- Protein 1 (Wdr1) schneidet die Enden des F-Aktins [130, 131]. Das Wdr1 und das Coronin regulieren die Aktinverteilung und den Umbau des Aktingerüsts in der Zelle. Doch befanden sich nicht nur Proteine die mit Aktin interagieren unter den regulierten thrombozytären Proteinen, vielmehr sind auch Proteine darunter, die speziell bei Zellstress exprimiert werden. Unter anderem auch die Superoxid Dismutase (SOD) die sowohl in ruhenden Thrombozyten als auch in stimulierten exprimiert wurde. Die Ausgangswerte der SOD sind in den Kontrollthrombozyten schon recht hoch, was sicher auch auf die Aktivierung der Thrombozyten bei der Aufarbeitung zurück zu führen ist. Doch unter LPS Stimulation nimmt das SOD Signal um 12% ab und unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation wird es um 7% erhöht. Die Superoxid Dismutase ist ein kupfer- und zinkhaltiges Enzym, welches die Funktion eines Radikalfängers im Organismus ausübt. Es katalysiert die Reaktion



wodurch Peroxi- bzw. freie Sauerstoffradikale rasch abgebaut werden. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird durch Peroxidasen oder Katalasen weiter abgebaut. Die SOD ist somit eine wichtige endogene, antioxidativ wirkende Substanz mit der Fähigkeit, oxidativen Stress zu unterdrücken, indem es in der Zelle die Sauerstoffradikale und Peroxide abbaut. In Thrombozyten ist ein Femtogramm von SOD, welches einem fünftel der Menge in Leukozyten entspricht [132]. Eine Zunahme des Signals lässt auf einen zunehmenden oxidativen Stress bzw. ein vermehrtes Aufkommen des Superoxid Anions in der Zelle schließen. Das Superoxid Anion unterstützt unter anderem die

Thrombozytenaggregation [133, 134] dies würde auch die gesteigert SOD Produktion in  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten erklären die aggregiert sind. Die Abnahme der SOD Konzentration in LPS stimulierten Thrombozyten ist dagegen nicht zu erklären.

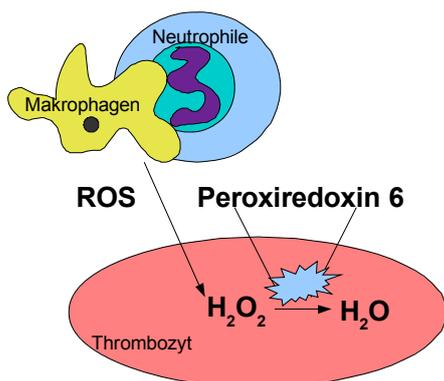
Die durch die SOD-Aktivität produzierten zytotoxischen Peroxidverbindungen könnten durch weitere Redoxproteine abgebaut werden.

### Veränderungen im Proteinmuster nach zwölfstündiger Stimulation

Silbergele	LPS	$\alpha$ -Toxin	Biologischer Effekt
Proteindisulfid Isomerase ER 60 Precursor	↑	↑↑	Protein des ER und der Zellmembran, katalysiert den Umbau von Disulfidbrücken
Alpha Enolase	↓↓	↓	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann
Peroxiredoxin-6	↑	↓	Enzym welches an Redoxreaktionen der Zelle beteiligt ist
Tropomyosin-2	↓	↓↓	Bindet an Aktinfillamente von Muskel- und nicht Muskelzellen

**Tabelle 34:** Dargestellt sind einige der nach zwölf stündiger Stimulation veränderten Proteine. Die Pfeile charakterisieren die Richtung der Veränderung in Bezug zum Signal aus Kontrollthrombozyten.

Ein weiteres interessantes Protein ist das Peroxiredoxin- 6. Es gehört zur Familie der Peroxiredoxine. Diese nutzen die Redoxeigenschaften des Cysteins um Peroxide zu reduzieren. Peroxiredoxine unterstützen die Redoxvorgänge der Zellen unter anderem bei oxidativem Stress.



**Abbildung 4-5:** Funktion des Peroxiredoxin-6. Es katalysiert die Reduktion von Peroxiden zu Wasser

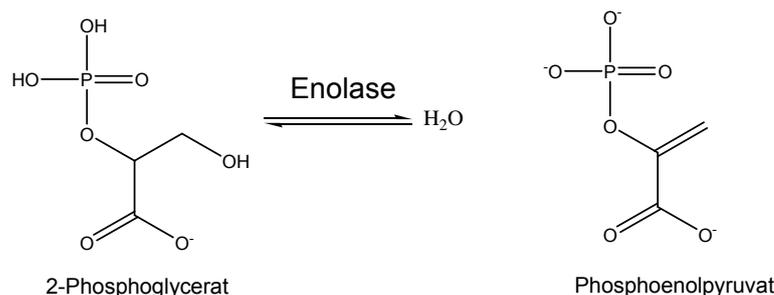
Das Peroxiredoxin-6 ist ein bifunktionales Protein, mit sowohl Glutathion- Peroxidase als auch Phospholipase  $A_2$  Eigenschaften [110]. In LPS stimulierten Thrombozyten wird eine vermehrte Expression beobachtet, was auf einen erhöhten oxidativen Stress nach zwölf Stunden Stimulation schließen lässt. Unter zwölfstündiger  $\alpha$ -Toxin Stimulation, nimmt das Signal jedoch sehr stark ab. Die verminderte Synthese lässt auf einen Ausfall der Thrombozyten Proteinsynthese schließen. Nach zwölf Stunden Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin machen sich dessen toxische Effekte bemerkbar oder zeigt sich vielmehr,

dass durch die Toxin Einwirkung der oxidative Stress so stark angestiegen ist, dass die Peroxiverbindungen nicht mehr adäquat abgebaut werden können und die Zelle zerstören.

Phosphoserin	LPS	$\alpha$ -Toxin	biologische Effekte
Alpha Enolase	↑	↑ ↑	multifunktionelles Enzym was auch als Rezeptor für Plasminogen fungieren kann
Phosphothreonin			
H <sup>+</sup> -transporting two sector ATPase	↑	↓	Mitochondrium Produziert ATP aus ADP unter Protonengradient

**Tabelle 35:** Die Tabelle zeigt Proteine die nach zwölf Stunden Stimulation eine Veränderung ihres Phosphorylierungs-Musters aufweisen. Dabei wurde mit Phosphoserin und Phosphothreonin sensitiven Antikörpern gearbeitet. Die Pfeile geben an, ob das Signal stärker oder schwächer als unter Kontrollbedingungen ist.

Ein weiteres Protein, welches sowohl unter den regulierten Proteinen der vier Stunden als auch in den zwölf Stunden Experimenten zu finden ist, ist die alpha Enolase (ENO1). Die ENO's sind in den meisten Zellen vertreten und an der Glykolyse beteiligt (siehe Abbildung 4-6). Weiterhin reagieren sie unter hypoxischen Bedingungen als Stress-Proteine, welche eine zunehmende Regulation erfahren. Die alpha Enolase wird auch auf der Zellmembran präsentiert und kann dort als Rezeptor für Plasminogen dienen [135, 136].



**Abbildung 4-6:** Enolase katalysierte Umsetzung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphopyruvat

In den verschiedenen Experimenten erfährt die alpha Enolase sehr unterschiedliche Regulationen die keinen Trend erkennen lassen. Doch kann der alpha Enolase durch ihre plasminogenen Bindungseigenschaft ein Beitrag an inflammatorischen Prozessen und der Immunantwort zugesprochen werden. Diese Eigenschaften konnten zwar in Thrombozyten nicht nachgewiesen werden, doch sind sie für aktivierte T und B Zellen belegt [136].

In der massenspektroskopischen Auswertung sind weitere Proteine aufgeführt, auf die nicht näher eingegangen werden soll. So z.B. die unterschiedlichen Fibrinogen Untereinheiten die reguliert wurden aber bei denen eine Zuordnung, zu in Thrombozyten gespeicherten Fibrinogen und als adhäsive Matrix dienendes Fibrinogen sehr schwer möglich ist. Auch wurde auf einige andere Proteine wie, H<sup>+</sup> transporting two sector ATPase ein mitochondriales Protein sowie dem AF212303 eine Glutathion abhängige Thiol-Transferase im Zytosol nicht weiter eingegangen. Zum weiteren die Fumarylaceto-acetase, die die Hydrolyse von 4 Fumarylacetoacetat in Fumarat und Acetat katalysiert, ein weiteres Protein der Glykolyse. Die Triosephosphate isomeras 1 variante, eine Isomerasase in der Fettsäure- Biosynthese wird auch nicht näher besprochen. Sowie der T-complex protein 1 subunit beta ein molekulares Chaparon welches an der Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt ist und das Tropomyosin 2, welches an Aktinfillamente von Muskel- und Nichtmuskelzellen bindet. Sie stellen damit weitere am Aktinumbau beteiligte Proteine dar, die durch den Toxin Einfluss reguliert werden.

Unter Berücksichtigung der gesammelten Ergebnisse, zeigen Thrombozyten ein geregeltes Antwortsystem auf bakterielle Reize. Dabei können die Antwortreaktionen, abhängig von der Konzentration und der Art des Toxins, unterschiedlich ausfallen. Während das LPS die Thrombozyten nur sehr moderat aktiviert, kann das Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Toxin die Thrombozyten zur Aggregation bringen. Die Aktivierung äußert sich dabei auch sehr unterschiedlich. Zum einen in einer vermehrten Adhäsion an verschiedene Matrizes wie im Fall von LPS und Fibrinogen, zum anderen in einer Funktionalisierung von thrombozytären Rezeptoren. Doch zeigen die Thrombozyten nach Aktivierung eine erhöhte Stresssituation, die sich auch in den massenspektroskopischen Ergebnissen widerspiegelt, in dem eine vermehrte Expression von SOD und Peroxiredoxin 6 auftritt, welches zum ersten Mal in den Thrombozyten beschrieben wurde. Auch zeigen die Ergebnisse, dass die aktivierten Thrombozyten Proteine regulieren, die am Aktinumbau beteiligt sind. Der Aktinumbau ist Voraussetzung für die Proteinexpression in Thrombozyten. Mit der signalabhängigen Proteinsynthese von Bcl-3 konnten die Einflüsse der bakteriellen Toxine auf das Translationsverhalten der Blutplättchen nachgewiesen werden. Diese wiederum belegen, dass die Translation in Thrombozyten durch Inhibitoren kontrolliert werden können.

Doch nicht nur das, vielmehr rückt die klinische Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit in den Vordergrund. Diese zeigen, dass bakterielle Toxine wie sie in septischen Patienten vorkommen nicht nur das Immunsystem aktivieren, welches dann durch Zytokin- und Chemokinfreisetzung weitere Zellen aktiviert, sondern vielmehr, dass die bakteriellen Toxine direkt auf Zielzellen, wie die Thrombozyten, einwirken. Der Thrombozyt reagiert darauf mit einer geregelten Proteinexpression sowie einer Sekre-

tion der Thrombozyten Granula. Deren Inhaltsstoffe können wiederum andere Zellen des Immunsystems beeinflussen. Die Antwort der Thrombozyten kann dabei sehr unterschiedlich ausfallen, wie die Unterschiede zwischen LPS und  $\alpha$ -Toxin zeigen. Das LPS ist nicht in dem Maße zur Aktivierung der Thrombozyten fähig wie das porenbildende  $\alpha$ -Toxin, das zur Aggregation von Thrombozyten führt, und so einen Gefäßverschluss induzieren kann. Im klinischen Alltag findet man im septischen Patienten eine Mischinfektion mit unterschiedlichsten Bakterien, die wie schon gezeigt eine unterschiedliche Thrombozytenaktivierung verursachen. Im Rahmen der Therapie sollten neben antibiotischen Medikamenten vermehrt auch Thrombozytenfunktionshemmer eingesetzt werden. Die durch Hemmung der thrombozytären Cox z.B. durch Aspirin sowie die GP IIb/IIIa Funktionalisierung vermittelt durch ADP Aktivierung (Thienopyridine) oder Substanzen die die GP-Aktivierung (Abciximab) inhibieren und so die Funktion der Thrombozyten einschränken. Doch führt der Einsatz von Thrombozytenfunktionshemmern zum Verlust der Funktionalität, was nicht immer gewünscht ist. Die Medikamente sollten besser gezielt an den Regulationspunkten angreifen. Dabei wären verschiedene Ansatzpunkte denkbar. Die Adhäsion an der subendothelialen Matrix der Thrombozyten führt meist zu deren Aktivierung durch Inhibitoren, die gezielt in die Präsentation der Adhäsionsproteine eingreifen, kann dieser Weg der Aktivierung unterbunden werden.

Auch der Einsatz von Splicing-Inhibitoren wäre ein möglicher Ansatz, um die Thrombozytenaktivierung zu unterbinden. Wie gezeigt werden konnte verfügen Thrombozyten über einen Splicingapparat, der es ermöglicht, RNA zu schneiden und spezielle Proteine zu exprimieren. Auch stellen die Translationsinhibitoren, wie in dieser Arbeit am Beispiel von Bcl-3 gezeigt, eine Alternative mit der gezielt Proteine gehemmt werden können dar ohne einen totalen Funktionsausfall nach sich zu ziehen.

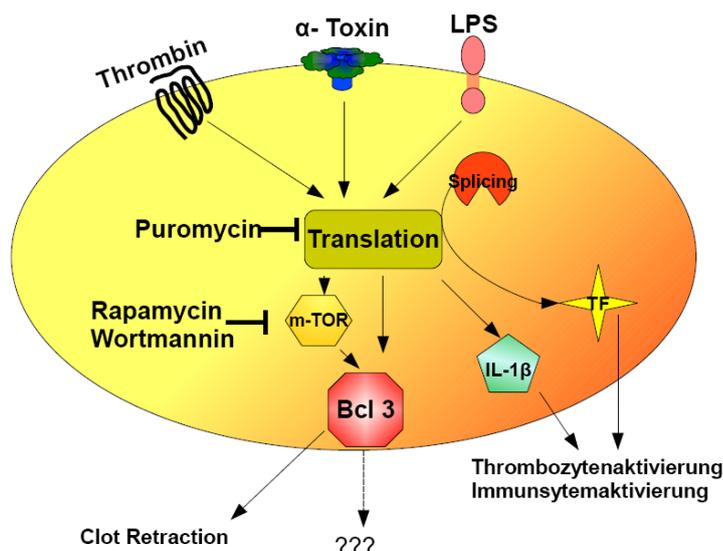
## 5 Zusammenfassung

Die Sepsis sowie Endokarditis sind gekennzeichnet durch eine veränderte Thrombozytenfunktion, die meist direkt oder indirekt auf Interaktion mit eingedrungenen Bakterien zurück zu führen ist. Solche Interaktionen beschreiben sich durch Bindung von Bakterien und Plättchen, welche sowohl direkt über bakterielle Oberflächenproteine (TLR-4) als auch indirekt durch Bindung über Plasmaproteine geschehen können. Doch führen solche Interaktionen meist zu einer Plättchenaktivierung und damit zu einer Thrombusbildung. So kann gleichsam ein Thrombus auf Herzklappen zur Herzinsuffizienz oder zur Ausbildung von septischen Embolien beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der bakteriellen Toxine LPS und *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin auf die Thrombozytenaktivierung sowie Proteinexpression untersucht. Dabei wurden verschiedene Methoden von Aggregationsmessungen über FACS-Analysen und Western Blot, im besonderem auch Proteom-Analysen, durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Thrombozyten durch LPS und  $\alpha$ -Toxin auf unterschiedliche Weise aktiviert werden können. Eine LPS-Stimulation führt zu einer vermehrten Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen. Das *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin verursacht, im Gegensatz zum LPS, eine konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation im Bereich von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  bis zu 10  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Toxin. Beide Toxine sind weiterhin in der Lage den GP IIb/IIIa Rezeptor zu aktivieren. Schon nach einer dreißigminütigen  $\alpha$ -Toxin Stimulation wird der GP IIb/IIIa maximal aktiviert. Jedoch erst nach vier Stunden der LPS-Stimulation wird eine moderate GP IIb/IIIa Rezeptoraktivierung erreicht. In den *Western Blot* Analysen zeigten beide Toxine eine Steigerung der Expression des Bcl-3 Proteins, das bereits in Thrombin stimulierten Thrombozyten charakterisiert werden konnte. Das Bcl-3 wird für die *Clot Retraction* der Thrombozyten verantwortlich gemacht. Damit wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen einer thrombozytären Proteinexpression und einer Stimulation mit bakteriellen Toxinen beschrieben. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Translationsinhibitoren die Proteinexpression in Toxin stimulierten Thrombozyten charakterisiert werden. Dabei zeigte sich Puromycin als stärkster Translationsinhibitor, gefolgt von Rapamycin und Wortmannin. Der Einsatz von Rapamycin und Wortmannin bestätigt die Erkenntnis, dass die Bcl-3 Translation über m-TOR reguliert wird. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte unter verschiedenen Bedingungen die zellzerstörende Eigenschaft des  $\alpha$ -Toxins nachgewiesen werden. Wobei das  $\alpha$ -Toxin, im Gegensatz zum LPS, eine Verschmelzung der Thrombozytengranula mit der Zellmembran zeigte und damit einer Sekretion der Granula stattfinden kann. Auch das Aktingerüst  $\alpha$ -Toxin stimulierter Thrombozyten, ist stärker umgebaut als es bei LPS stimulierten Thrombozyten beobachtet wurde. Die Proteom-Analyse der Thrombozyten zeigt erstmalig, dass die Thrombozyten nicht nur nach Toxin-Stimulation Proteine exprimieren, sondern auch die vorhandenen Proteine aktivieren (phosphorylieren) und deaktivieren. Nach vier Stunden konnte ein verstärkte Zunahme der Threonin-Phosphorylierung unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation an PLEK beobachtet werden. Eine gesteigerte Threonin-Phosphorylierung führt zu einer Sekretion der Granula. Die Phosphorylierung an Serin und Threonin des PLEK wird durch Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat gesteuert, einer Phosphorylierung des PLEK durch eine Aktivierung der PKC (Protein Kinase C). Die Protein Kinase C gehört in die Familie der Serin/Threonin Kinasen, die für lebenswichtige Zellsignalwege benötigt werden, wie die Aktivierung,

Proliferation und Differenzierung. Eine erhöhte PKC Aktivität führt zur Sekretion der Granulainhalte und Funktionalisierung der Integrine in Thrombozyten. Ein weiteres Protein ist das *Coronin Actin binding Protein*, welches mit dem Aktin der Thrombozytenzelle verbunden und am Umbau der Zelle, dem so genannten *shape change*, beteiligt ist. Ein Anstieg dieses Proteins wurde auch bei Patienten mit einer arteriellen Thrombose beobachtet. Unter Stimulation mit  $\alpha$ -Toxin verdreifacht sich das Signal, unter LPS Stimulation verdoppelt es sich. Durch die Aktivitätszunahme des Coronin Actin binding Proteins wird ein Umbau des thrombozytären Aktingerüsts veranlasst. Eine massive Änderung im Zytoskelett führt zu einer Veränderung im Expressionsverhalten der Thrombozyten. Denn erst durch den *shape change* sind die Thrombozyten in der Lage, Proteine zu exprimieren, da erst dann die Translation initiiert werden kann. Die Regulation bei Patienten mit arterieller Thrombose zeigt die klinische Relevanz des Proteins. Dieses Ergebnis stellt aber auch die Relevanz der bakteriellen Toxine bei thrombotischen Ereignissen dar, denn sowohl unter LPS als auch unter  $\alpha$ -Toxin Stimulation ist ein Anstieg des Coronin Actin binding Proteins beobachtet worden.

Anhand der massenspektroskopischen Analyse konnten zahlreiche Proteine, die am Aktinumbau beteiligt sind, charakterisiert werden. Doch nicht nur Proteine, die mit Aktin interagieren, konnten in Thrombozyten identifiziert werden. Auch wurden Proteine reguliert, die ein Indiz für oxidativen Stress sind wie SOD und Peroxiredoxin 6. Das Peroxiredoxin 6 wird in dieser Arbeit zum ersten Mal in Thrombozyten beschrieben, dieses Protein ist an Redoxvorgängen in der Zelle beteiligt. Es besitzt bifunktionale Funktionen, mit sowohl Glutathion- Peroxidase als auch Phospholipase A<sub>2</sub> Eigenschaften. Bemerkenswert ist, dass die mit  $\alpha$ -Toxin stimulierten Thrombozyten stärker reguliert werden, als Thrombozyten, die durch andere Substanzen stimuliert wurden. Es haben sich in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede in den Aktivierungsfähigkeiten der Toxine gezeigt. Gemeinsam ist aber allen getesteten Toxinen, dass sie in der Lage sind, Thrombozyten zu aktivieren. Durch die Sekretion der Granula scheinen die aktivierten Thrombozyten ihrerseits inflammatorische Prozesse zu unterstützen und durch vermehrte Aggregatbildung zur Störung der Mikrozirkulation beizutragen. Damit tragen die aktivierten Thrombozyten zur klinischen Manifestation einer schweren Sepsis bei.



**Abbildung 5-1 Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse:**

Sowohl Thrombin als auch bakterielle Toxine, wie das  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* und das LPS, können Thrombozyten dahingehend stimulieren, dass sie Proteine, wie Bcl-3 synthetisieren. Dabei nutzen die Thrombozyten die gespeicherte m-RNA und translatieren diese in die entsprechenden Proteine. Die Translation in Thrombozyten kann durch bekannte Translationssinhibitoren unterbunden werden. Die Synthese von Bcl-3 kann gezielter durch Inhibitoren wie Rapamycin und Wortmannin inhibiert werden, da die Translation über m-TOR verläuft. Damit besteht die Möglichkeit gezielt in die Proteinbiosynthese des Bcl-3 einzugreifen. Weiterhin nach Stimulation mit Thrombin neu synthetisierten Proteinen sind das Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und der Tissue Factor (TF), wobei die TF RNA erst geschnitten werden muss, um in das Protein umgeschrieben werden zu können. Alle drei Proteine haben direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung und somit auf eine Thrombusbildung. Dabei ist weiter zu klären, ob das Bcl-3 nur eine Funktion in der *Clot Retraction* hat oder ihm nicht noch andere Funktionen zu gesprochen werden können.

Alles in allem hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass Thrombozyten nicht nur einfache kernlose Zellen sind, die bei einer Gefäßverletzung als „Dichtmasse“ benutzt werden können. Vielmehr sind Thrombozyten hoch spezialisierte Zellen, die auf einen körpereigenen als auch körperfremden Stimulus eine gezielte Antwort in Form von Proteinsynthese und Proteinfunktionalisierung haben.

## 6 Ausblick

Bei Erkrankungen, wie der Sepsis oder auch der Endokarditis liegen meist Mischinfektionen mit verschiedenen Bakterien und Toxinen vor. Die unterschiedlichsten Toxine sind, wie in dieser Arbeit gezeigt, in der Lage Thrombozyten zu aktivieren und, wie  $\alpha$ -Toxin, sogar zu aggregieren. Diese Bakterien-Thrombozytenaggregate können zum Verschluss von Blutgefäßen führen und die Erkrankung weiter verschlimmern. Daher sollte zu einer antibiotischen Therapie auch die Thrombozytenaktivierung gehemmt werden. Dies kann zum einen durch Aktivierungsinhibitoren, wie Abciximab, Thienopy-

ridine oder Acetylsalicylsäure, erfolgen. Eine gezielte Inhibierung spezieller Proteine könnte, wie am Beispiel von Bcl-3 gezeigt, einen größeren therapeutischen Nutzen haben.

Dass Thrombozyten zur Proteinsynthese fähig sind, weiß man schon seit mehr als 40 Jahren. Doch ist der Mechanismus der Kontrolle und der Regulation noch nicht im Detail geklärt. Zu den Proteinen, die von Thrombozyten synthetisiert werden, gehören neben dem Bcl-3, IL-1 $\beta$  und der TF, sowie eine Vielzahl noch unbekannter Proteine, deren Charakterisierung noch aussteht. Dabei könnte die Methode der Proteomanalyse hilfreich sein, denn durch sie ist es möglich, mehrere tausend Proteine zu identifizieren. Weiterhin können durch den Einsatz von Translationsinhibitoren die Auswirkungen auf das Proteom analysiert werden. Zukünftig wird man sich weiter mit den Signalwegen sowie der Kontrolle des pre- mRNA *splicing* und der mRNA Translation kernloser Zellen, insbesondere der Thrombozyten, auseinandersetzen müssen. So wurde von Dittrich et al. gezeigt, dass die 3'-UTRs (3' Un-Translatierten Regionen) der Thrombozyten mRNA länger und komplexer sind als kernhaltiger Zellen [137]. Zudem konnte Rosenwald et al. [138] die Expression von eIF4E und eIF-2 $\alpha$  in Thrombozyten nachweisen. Diese beiden Proteine sind essentiell für den Transport der Initiator t-RNA an die 40 S Untereinheit der Ribosomen und stellen damit die Voraussetzung für eine Proteinsynthese in den Plättchen dar. Neuere Ergebnisse von Thon und Devine [139] konnten des Weiteren klar zeigen, dass Thrombozyten ihren Translationsapparat nutzen, um das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  während der Lagerung neu zu synthetisieren. Die gesamte mRNA für  $\alpha_{IIb}\beta_3$  konnte während der Lagerung von über zehn Tagen nachgewiesen werden, die Translation der Nachricht in das entsprechende Protein wurde anhand der Einlagerung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in die Sequenz mit nachfolgender Immunpräzipitation des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Proteins durchgeführt. Diese und andere Untersuchungen belegen eindeutig, dass Thrombozyten die Fähigkeit zur kontinuierlichen Proteinsynthese während ihrer kurzen Lebenszeit haben. Damit wurde gezeigt, welche Mechanismen der Proteinsynthese in Thrombozyten zugrunde liegen und welche Auswirkungen diese Proteinsynthese auf den Phänotyp und die Funktion der Plättchen hat. Durch ein gezieltes Eingreifen in die Proteintranslation mittels Translations- oder *splicing*-Inhibitoren können genau definierte Proteine reguliert werden, die durch eine Über- oder Unterfunktion zu einer Thrombozytenaktivierung führen können. Dieser Aktivierung kann dann eine Aggregation mit Thrombusbildung folgen. Eine Thrombusbildung in der Mikrozirkulation kann zu einem Gefäßverschluss und damit zu sehr schweren Krankheitsverläufen führen. Eine Durchführbarkeit der gezielten Steuerung der Proteinregulation in Thrombozyten *in vivo* sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein. Ein sehr spannendes Feld stellen dabei die Einflüsse der Statine auf Thrombozyten dar, die heutzutage in der

täglichen Praxis weit verbreitet sind. Dabei wäre zu klären ob und wie die Statine die Thrombozytenfunktion beeinflussen und wie sie mit Toxinen und toxinaktivierten Thrombozyten wechselwirken. Doch nicht nur die Einwirkungen von exogenen Faktoren auf die Thrombozyten sollte untersucht werden, auch die Thrombozyten selbst mit ihren verschiedenen Granula und noch nicht genauer charakterisierten Inhaltstoffen sollte weiter betrachtet werden, insbesondere der TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), der das Zellwachstum und die Immunantwort verstärkt. Bei T-Zell-Leukämie, Glioblastom u.a. wird eine Überexpression nachweisbar. Die Fragen die man sich dabei stellen sollte sind: wird der TGF $\beta$  in Thrombozyten synthetisiert oder nur gespeichert und stammt aus eigentlich den Megakaryozyten, wie kann man das Freisetzen von TGF $\beta$  aus Thrombozyten kontrollieren. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob es noch weitere Faktoren gibt, die eine Immunantwort modulieren und aus Thrombozyten stammen, welche Mechanismen liegen der Freisetzung und der Synthese zugrunde.

Die Thrombozyten bieten als kernlose Zellen ein ideales Model, um direkte Einflüsse auf translationkontrollierte Prozesse zu untersuchen und mögliche Signalwege zu etablieren. Damit stellen die Thrombozyten ein interessantes Forschungsobjekt dar das es weiter zu entdecken gilt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen, *alpha-toxin of Staphylococcus aureus*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1991. **55**(4): p. 733-751.
2. Petti, C.A. and V.G. Fowler, *Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis*. Cardiology Clinics, 2003. **21**(2): p. 219-233.
3. Levi, M., et al., *Infection and inflammation and the coagulation system*. Cardiovascular Research, 2003. **60**(1): p. 26-39.
4. Schottmüller, H., *Wesen und Behandlung der Sepsis*. Verhandl. d. 31 Deutschen Kongress für Innere Medizin, 1914. **31**: p. 257-280.
5. K. Reinhart, F.M.B., H.-G. Bone, H. Gerlach, M. Gründling, G. Kreymann, P. Kujath, G. Marggraf, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, C. Peckelsen, C. Putensen, F. Stüber, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, N. Weiler, T. Welte und K. Werdan, *Diagnose und Therapie der Sepsis*. Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2006. **43**(5): p. 369-384.
6. Schuster, H. and U. Müller-Werdan, *Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen in Sepsis und MODS*. 2005, Berlin, Heidelberg: Springer.
7. Jean-Baptiste, E., *Cellular Mechanisms in Sepsis*. J Intensive Care Med, 2007. **22**(2): p. 63-72.
8. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-891.
9. Hartwig, J. and J. Italiano, *The birth of the platelet*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(7): p. 1580-1586.
10. Behnke, O. and A. Forer, *From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream*. Eur J Haematol Suppl., 1998. **61**: p. 3-23.
11. Denis, M.M., et al., *Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets*. Cell, 2005. **122**(3): p. 379-391.
12. Bentfeld-Barker, M.E. and D.F. Bainton, *Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets*. Blood, 1982. **59**(3): p. 472-481.
13. White, J.G. and J.M. Gerrard, *The Ultrastructure of Defective Human Platelets*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1978. **21**(2): p. 109-128.
14. Schwertz, H., et al., *Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets*. J. Exp. Med., 2006. **203**(11): p. 2433-2440.

15. Lindemann, S., et al., *Integrins Regulate the Intracellular Distribution of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Platelets. A Checkpoint for translational control.* J. Biol. Chem., 2001. **276**(36): p. 33947-33951.
16. Gawaz, M., *Das Blutplättchen.* 1999, Stuttgart: Thieme.
17. Weyrich, A.S., et al., *Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets.* PNAS, 1998. **95**(10): p. 5556-5561.
18. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1{beta} synthesis.* J. Cell Biol., 2001. **154**(3): p. 485-490.
19. Cognasse, F., et al., *Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets.* Immunol Cell Biol, 2005. **83**(2): p. 196-198.
20. Shiraki, R., et al., *Expression of Toll-like receptors on human platelets.* Thrombosis Research, 2004. **113**(6): p. 379-385.
21. Andrews, R.K. and M.C. Berndt, *Platelet physiology and thrombosis.* Thrombosis Research, 2004. **114**(5-6): p. 447-453.
22. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis.* Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-1234.
23. Nieuwenhuis, H.K., et al., *Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia.* Nature, 1985. **318**(6045): p. 470-472.
24. Khoshnoodi, J., et al., *Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers.* J. Biol. Chem., 2006. **281**(50): p. 38117-38121.
25. Galt, S.W., et al., *Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 by Monocytes Adherent to Collagen and Platelets.* Circ Res, 2001. **89**(6): p. 509-516.
26. Santoro, S.A., et al., *Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation.* Cell Regulation, 1991. **2**(11): p. 905-913.
27. Doolittle, R.F., *Fibrinogen and Fibrin.* Annual Review of Biochemistry, 1984. **53**(1): p. 195-229.
28. Kloczewiak, M., et al., *Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain.* Biochemistry, 1984. **23**(8): p. 1767-1774.

29. Plow, E.F., et al., *The Effect of Arg-Gly-Asp-Containing Peptides on Fibrinogen and Von Willebrand Factor Binding to Platelets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(23): p. 8057-8061.
30. Law, D.A., L. Nannizzi-Alaimo, and D.R. Phillips, *Outside-in Integrin Signal Transduction*. J. Biol. Chem., 1996. **271**(18): p. 10811-10815.
31. Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, *Integrin Signaling: The Platelet Paradigm*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2645-2657.
32. Ma, Y.Q., J. Qin, and E.F. Plow, *Platelet integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3: activation mechanisms*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(7): p. 1345-1352.
33. Kasirer-Friede, A., M.L. Kahn, and S.J. Shattil, *Platelet integrins and immunoreceptors*. Immunological Reviews, 2007. **218**(1): p. 247-264.
34. Schoenwaelder, S.M., et al., *Calpain Cleavage of Focal Adhesion Proteins Regulates the CytoSkeletal Attachment of Integrin alpha IIb beta 3 (Platelet Glycoprotein IIb/IIIa) and the Cellular Retraction of Fibrin Clots*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(3): p. 1694-1702.
35. Wonerow, P., et al., *A Critical Role for Phospholipase C $\gamma$ 2 in  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated Platelet Spreading*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(39): p. 37520-37529.
36. Izaguirre, G., et al., *The CytoSkeletal/Non-muscle Isoform of alpha -Actinin Is Phosphorylated on Its Actin-binding Domain by the Focal Adhesion Kinase*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(31): p. 28676-28685.
37. Nigatu, A., et al., *Megakaryocytic cells synthesize and platelets secrete alpha5-laminins, and the endothelial laminin isoform laminin 10 (alpha5 beta1 gamma1) strongly promotes adhesion but not activation of platelets*. Thromb Haemost., 2006. **95**: p. 85-93.
38. Inoue, O., et al., *Laminin stimulates spreading of platelets through integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-dependent activation of GPVI*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1405-1412.
39. Davey, M.G. and E.F. Lüscher, *Actions of Thrombin and other Coagulant and Proteolytic Enzymes on Blood Platelets*. Nature, 1967. **216**: p. 857-858.
40. Coughlin, S.R., *Protease-Activated Receptors and Platelet Function*. Thromb Haemost., 1999. **82**(2): p. 353-56.
41. O'Brien, J.P., et al., *Protease activated receptors: theme and variations*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1570-81.
42. Martorell, L., et al., *Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis*. Thromb Haemost., 2008. **99**(2): p. 305-315.

- 
43. Vu, T.-K.H., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-1068.
  44. Coughlin, S.R. and E. Camerer, *PARticipation in inflammation*. J.Clin.Invest, 2003. **111**: p. 25-27.
  45. Brass, L.F., et al., *Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus*. J. Biol. Chem., 1992. **267**(20): p. 13795-13798.
  46. Hung, D.T., et al., *Cloned Platelet Thrombin Receptor is necessary for Thrombin - induced Platelet Activation*. J.Clin Invest, 1992. **89**: p. 1350-53.
  47. Kahn, M., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. J.Clin Invest, 1999. **103**: p. 879-87.
  48. Bernatowicz, M.S., et al., *Development of Potent Thrombin Receptor Antagonist Peptides*. J. Med. Chem., 1996. **39**(25): p. 4879-4887.
  49. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J.Thromb. Haemost, 2005. **3**: p. 1800-14.
  50. Brass, L.F., et al., *Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(4): p. 2943-2952.
  51. Shapiro, M.J., et al., *Protease-activated Receptors 1 and 4 Are Shut Off with Distinct Kinetics after Activation by Thrombin*. JBC, 2000. **275**(33): p. 25216-21.
  52. Offermanns, S., et al., *G Proteins of the G12 Family are Activated Via Thromboxane A2 and Thrombin Receptors in Human Platelets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(2): p. 504-508.
  53. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-Activated Receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-282.
  54. Steinhoff, M., et al., *Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response*. Endocr Rev, 2005. **26**(1): p. 1-43.
  55. 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. 745-754.

- 
56. Taylor, S.J., et al., *Activation of the [beta]1 isozyme of phospholipase C by [alpha] subunits of the Gq class of G proteins*. *Nature*, 1991. **350**(6318): p. 516-518.
  57. Sambrano, G.R., et al., *Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets*. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(10): p. 6819-6823.
  58. Booyse, F.M. and M.E. Rafelson, *Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets*. *Bochem Biophys Acta*, 1967. **145**(1): p. 188-190.
  59. Lindemann, S. and M. Gawaz, *The Active Platelet: Translation and Protein Synthesis in an Anucleate Cell*. *Semin Thromb Hemost*, 2007. **33**: p. 144-150.
  60. Gingras, A.-C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 INITIATION FACTORS: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation*. *Annual Review of Biochemistry*, 1999. **68**(1): p. 913-963.
  61. Pabla, R., et al., *Integrin-dependent Control of Translation: Engagement of Integrin alpha IIb beta 3 Regulates Synthesis of Proteins in Activated Human Platelets*. *J. Cell Biol.*, 1999. **144**(1): p. 175-184.
  62. Sehgal, S.N., *Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action*. *Transplantation Proceedings*, 2003. **35**(3, Supplement 1): p. S7-S14.
  63. Yonezawa, K., *mTOR signaling pathway*. *Hepatology Research*, 2004. **30**(Supplement 1): p. 9-13.
  64. Loewith, R., et al., *Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control*. *Molecular Cell*, 2002. **10**(3): p. 457-468.
  65. Tee, A.R. and J. Blenis, *mTOR, translational control and human disease*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005. **16**(1): p. 29-37.
  66. Hentze, M.W., *eIF4G--A Multipurpose Ribosome Adapter?* *Science*, 1997. **275**(5299): p. 500-501.
  67. Jefferies, H.B., et al., *Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k*. *EMBO J*, 1997. **16**: p. 3693-3704.
  68. Dufner, A. and G. Thomas, *Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation*. *Experimental Cell Research*, 1999. **253**(1): p. 100-109.
  69. Pearson, R.B., et al., *The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain*. *EMBO J*, 1995. **14**(21): p. 5279-5287.

- 
70. Buerke, M., et al., *Intramural delivery of Sirolimus prevents vascular remodeling following balloon injury*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2007. **1764**(1): p. 5-15.
  71. Wymann, M.P., et al., *Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*. *Mol. Cell. Biol.*, 1996. **16**(4): p. 1722-1733.
  72. von Manteuffel, S.R., et al., *4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(9): p. 4076-4080.
  73. Gingras, A.-C., et al., *4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway*. *Genes Dev.*, 1998. **12**(4): p. 502-513.
  74. Franke, T.F., et al., *PI3K/Akt and apoptosis: size matters*. *Oncogene*. **22**(56): p. 8983-8998.
  75. Ohno, H., G. Takimoto, and T.W. McKeithan, *The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control*. *Cell*, 1990. **60**(6): p. 991-997.
  76. Lenardo, M. and U. Siebenlist, *Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF- $\kappa$ B transactivating factor*. *Immunology Today*, 1994. **15**(4): p. 145-147.
  77. Weyrich, A.S., et al., *mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets*. *Blood*, 2007. **109**(5): p. 1975-1983.
  78. Gray, G.S. and M. Kehoe, *Primary sequence of the alpha-toxin gene from Staphylococcus aureus wood 46*. *Infect. Immun.*, 1984. **46**(2): p. 615-618.
  79. Gouaux, E., *alpha-Hemolysin from Staphylococcus aureus: An Archetype of beta-Barrel, Channel-Forming Toxins*. *Journal of Structural Biology*, 1998. **121**(2): p. 110-122.
  80. Suttorp, N. and E. Habben, *Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca<sup>2+</sup> in polymorphonuclear leukocytes*. *Infect. Immun.*, 1988. **56**(9): p. 2228-2234.
  81. Bhakdi, S., et al., *Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins*. *Arch Microbiol*, 1996. **165**: p. 73-79.
  82. Johnson, J.D., et al., *Agonist-specific Ca<sup>2+</sup> signaling systems, composed of multiple intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, regulate gonadotropin secretion*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000. **170**(1-2): p. 15-29.
  83. Bhakdi, S., et al., *Staphylococcal alpha-toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets*. *J. Exp. Med.*, 1988. **168**(2): p. 527-542.

- 
84. Manohar, M., et al., *Platelet Damaging Factor, a Fifth Activity of Staphylococcal {alpha}-Toxin*. J. Bacteriol., 1967. **94**(1): p. 224-231.
  85. Klinger, M.H.F. and W. Jelkmann, *Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2002. **22**(9): p. 913-922.
  86. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus Infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-532.
  87. Hamburger, S.A. and R.P. McEver, *GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils*. Blood, 1990. **75**(3): p. 550-554.
  88. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson, *Platelet Collagen Receptors*. Thrombosis and Haemostasis, 2001. **86**(1): p. 189-97.
  89. Ill, C.R., E. Engvall, and E. Ruoslahti, *Adhesion of platelets to laminin in the absence of activation*. J. Cell Biol., 1984. **99**(6): p. 2140-2145.
  90. Samara, W.M. and P.A. Gurbel, *The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease*. Coronary Artery Disease, 2003. **14**((1)): p. 65-79
  91. Popov, N., et al., *Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates*. Acta Biol Med Ger., 1975. **34**(9): p. 1141-6.
  92. Lottspeich, F., *Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(17): p. 2476-2492.
  93. Rabilloud, T., *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses*. Electrophoresis, 1996. **17**: p. 813-829.
  94. Dunn, M.J. and S.J. Bradd, *Separation and analysis of membrane proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*. Methods of Molecular Biology, 1993. **19**: p. 203-210.
  95. Görg, A., W. Postel, and S. Gunther, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1988. **9**: p. 531-46
  96. Wilm, M., G. Neubauer, and M. Mann, *Parent ion scans of unseparated peptide mixtures*. Analytical Chemistry 1996. **68**: p. 527-33.
  97. Born, G., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. Nature, 1962. **9**(194): p. 927-9.
  98. Wilfinger, W.M., K. Chomczynski, P., *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity*. BioTechniques, 1997. **22**(3): p. 474-6.

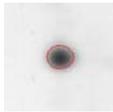
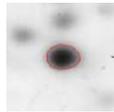
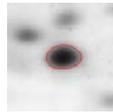
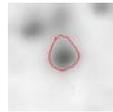
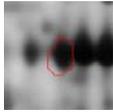
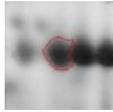
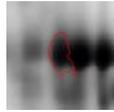
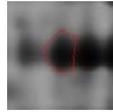
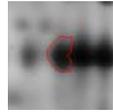
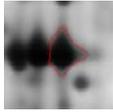
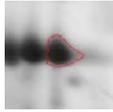
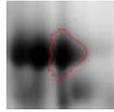
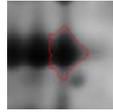
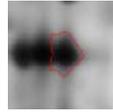
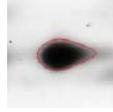
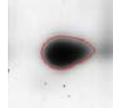
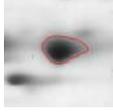
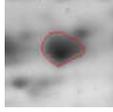
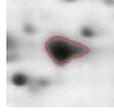
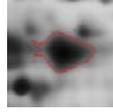
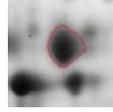
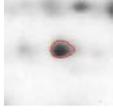
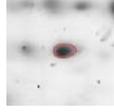
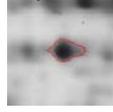
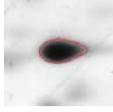
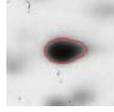
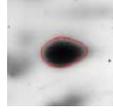
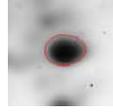
- 
99. Masek, M., et al., *The Effect of Staphylococcal  $\alpha$ -Toxin on Blood Platelets*. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path., 1969. **262**: p. 419-427.
  100. Siegel, I. and S. Cohen, *Action of Staphylococcal toxin on human platelets*. J.Infect. Dis, 1964. **114**: p. 488.
  101. Tandon, N.N., et al., *Interaction of human platelets with laminin and identification of the 67 kDa laminin receptor on platelets*. Biochim.J., 1991(274): p. 533-542.
  102. Shattil, S.J., et al., *Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation*. J Biol Chem, 1985. **260**: p. 11107-11114.
  103. Mitsuaki Yanagida, Y.M.K.Y.M.T.T.I.N.T., *Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins detected by anti-phosphoThyrosine antibody on two-dimensional-gels of fibroblast cell lysates after tumor necrosis factor-alpha stimulation*. Electrophoresis, 2000. **21**(9): p. 1890-1898.
  104. Gevaert, K., et al., *A fast and convenient MALDI-MS based proteomic approach: identification of components scaffolded by the actin cytoskeleton of activated human thrombocytes*. Journal of Biotechnology, 2000. **78**(3): p. 259-269.
  105. Garcia, A., et al., *Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2088-2095.
  106. Andres-Mateos, E., et al., *DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(37): p. 14807-14812.
  107. Yokota, T., et al., *Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **312**(4): p. 1342-1348.
  108. Tyers, M., et al., *Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets*. Nature, 1988. **333**(6172): p. 470-473.
  109. Nishizuka, Y., *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion*. Nature, 1984. **308**: p. 693-98.
  110. Manevich, Y., et al., *Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding*. J. Lipid Res., 2007. **48**(10): p. 2306-2318.
  111. Cohen, I. and C. Cohen, *A tropomyosin-like protein from human platelets*. Journal of Molecular Biology, 1972. **68**(2): p. 383-7.

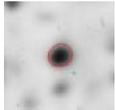
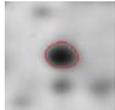
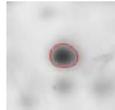
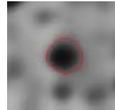
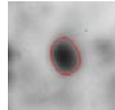
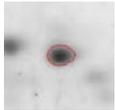
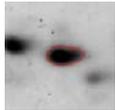
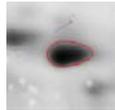
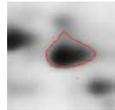
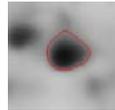
- 
112. Andonegui, G., et al., *Platelets express functional Toll-like receptor-4*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2417-2423.
  113. Offermanns, S., *Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors*. *Circ Res*, 2006. **99**(12): p. 1293-1304.
  114. McCarty, O.J.T., et al., *Rac1 Is Essential for Platelet Lamellipodia Formation and Aggregate Stability under Flow*. *J. Biol. Chem.*, 2005. **280**(47): p. 39474-39484.
  115. Scita, G., et al., *Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs*. *The EMBO Journal*, 2000. **19**(11): p. 2393-98.
  116. Pleines, I., et al., *Rac1 is essential for phospholipase C- $\psi$  2 activation in platelets*. *Pflügers Arch- Eur J Physiol*. 2008.
  117. Miranti, C.K., et al., *Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1*. *Current Biology*, 1998. **8**(24): p. 1289-99.
  118. Qui, R., et al., *An essential role for Rac in Ras transformation*. *Nature*, 1995. **374**: p. 457-59.
  119. Zhang, J., et al., *Phosphatidylinositol(3, 4, 5) -Trisphosphate Stimulates Phosphorylation of Pleckstrin in Human Platelets*. *J. Biol. Chem.*, 1995. **270**(39): p. 22807-22810.
  120. Abrams, C.S., et al., *Protein Kinase C Regulates Pleckstrin by Phosphorylation of Sites Adjacent to the N-terminal Pleckstrin Homology Domain*. *J. Biol. Chem.*, 1995. **270**(40): p. 23317-23321.
  121. 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. 644-653.
  122. Yacoub, D., et al., *Essential Role of Protein Kinase C{delta} in Platelet Signaling, {alpha}IIb{beta}3 Activation, and Thromboxane A2 Release*. *J. Biol. Chem.*, 2006. **281**(40): p. 30024-30035.
  123. Asehnoune, K., et al., *Involvement of PKC{alpha}/[beta] in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF- $\kappa$ B*. *Cellular Signalling*, 2005. **17**(3): p. 385-394.
  124. Toker, A., et al., *Phosphorylation of the Platelet p47 Phosphoprotein Is Mediated by the Lipid Products of Phosphoinositide 3-Kinase*. *J. Biol. Chem.*, 1995. **270**(49): p. 29525-29531.
  125. Touhara, K., et al., *Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains*. *J. Biol. Chem.*, 1994. **269**(14): p. 10217-10220.

- 
126. Ma, A.D. and C.S. Abrams, *Pleckstrin Induces CytoSkeletal Reorganization via a Rac-dependent Pathway*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(40): p. 28730-28735.
  127. Arias-Salgado, E.G., et al., *Variations in platelet protein associated with arterial thrombosis*. Thrombosis Research, 2008. **122**(5): p. 640-647.
  128. Li, D. and R. Roberts, *WD- repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001. **58**: p. 2085-2097.
  129. Vasily Rybakin, C.S.C., *Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoSkeleton and membrane trafficking*. BioEssays, 2005. **27**(6): p. 625-632.
  130. Kato, A., et al., *Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells*. Biochem J, 2008. **414**(2): p. 261-270.
  131. Balcer, H.I., et al., *Coordinated Regulation of Actin Filament Turnover by a High-Molecular-Weight Srv2/CAP Complex, Cofilin, Profilin, and Aip1*. Current Biology, 2003. **13**(24): p. 2159-2169.
  132. Freedman, J.E., *Oxidative Stress and Platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s11-16.
  133. Handin, R.I., R. Karabin, and G.J. Boxer, *Enhancement of platelet function by superoxide anion*. J.Clin Invest, 1977. **59**(5): p. 959-965.
  134. Bressler, N.M., M.J. Broekman, and A.J. Marcus, *Concurrent studies of oxygen consumption and aggregation in stimulated human platelets*. Blood, 1979. **53**(2): p. 167-178.
  135. Pancholi, V., *Mulifunctional  $\alpha$ -enolase:its role in diseases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001. **58**: p. 902-920.
  136. Liu, K.-J. and N.Y. Shih, *The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells*. Journal of Cancer Molecules, 2007. **3**(2): p. 45-48.
  137. Dittrich, M., et al., *Analysis of SAGE data in human platelets: features of the transcriptome in an anucleate cell*. Thromb Haemost., 2006. **95**: p. 643-51.
  138. Rosenwald, I.B., et al., *Expression of Translation Initiation Factors eIF-4E and eIF-2 $\alpha$  and a Potential Physiologic Role of Continuous Protein Synthesis in Human Platelets*. Thrombosis and Haemostasis 2001. **85**( 1): p. 142-151.
  139. Thon, J. and D. Devine, *Transltion of glycoprotein IIIa in stored blood platelets*. Transfusion 2007. **47**: p. 2260-70.

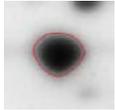
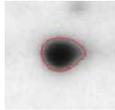
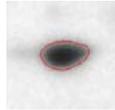
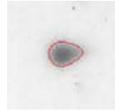
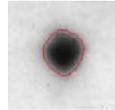
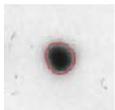
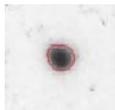
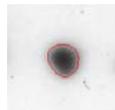
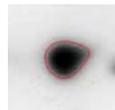
## 8 Anhang

### Identifizierte Proteine

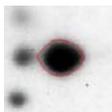
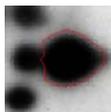
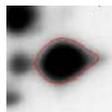
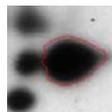
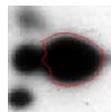
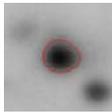
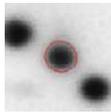
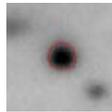
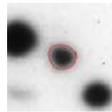
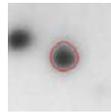
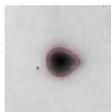
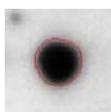
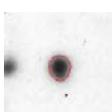
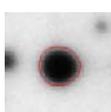
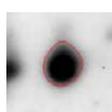
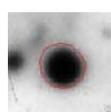
Silbergel Spot ID	Protein-name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrolle	Fibrinogen	Thrombin	LPS	$\alpha$ -Toxin
68368	DJ-1 Protein	19,83	6,7	<b>0,618</b> 	<b>0,355</b> 	<b>0,363</b> 	<b>0,338</b> 	<b>0,178</b> 
68364	WD repeat protein 1	66,02	6,9	<b>0,390</b> 	<b>0,362</b> 	<b>0,324</b> 	<b>0,319</b> 	<b>0,223</b> 
68361	WD repeat protein 1	66,02	6,9	<b>0,433</b> 	<b>0,461</b> 	<b>0,370</b> 	<b>0,433</b> 	<b>0,322</b> 
68365	Superoxid-Dismutase	24,71	7,9	<b>0,970</b> 	<b>0,856</b> 	<b>0,946</b> 	<b>0,858</b> 	<b>1,046</b> 
68353	Fibrinogen beta chain	55,9	7,5	<b>0,774</b> 	<b>0,612</b> 	<b>0,722</b> 	<b>0,693</b> 	<b>0,841</b> 
68363	T-complex protein 1 subunit beta	57,32	6,5	<b>0,176</b> 	<b>0,257</b> 	<b>0,202</b> 	<b>0,273</b> 	<b>0,205</b> 
68334	Triose-phosphate isomerase 1 variant	26,69	7,6	<b>0,641</b> 	<b>0,636</b> 	<b>0,660</b> 	<b>0,603</b> 	<b>0,758</b> 

68356	Ras sup- pressor protein 1	31,39	7,2	<b>0,332</b>	<b>0,315</b>	<b>0,305</b>	<b>0,324</b>	<b>0,467</b>
								
68350	Ras sup- pressor protein 1	31,39	7,8	<b>0,522</b>	<b>0,633</b>	<b>0,473</b>	<b>0,517</b>	<b>0,822</b>
								

**Tabelle 36:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

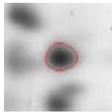
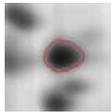
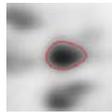
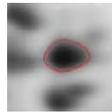
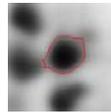
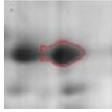
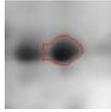
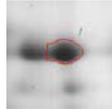
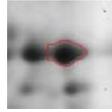
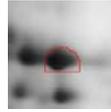
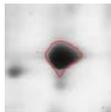
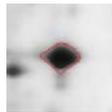
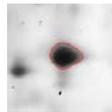
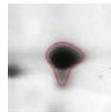
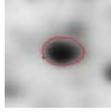
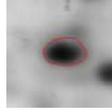
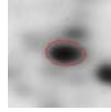
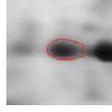
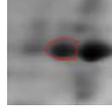
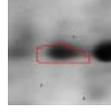
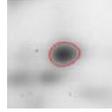
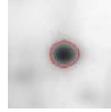
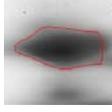
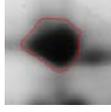
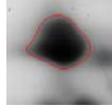
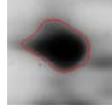
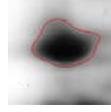
Phos- pho- serin Spot ID	Protein- name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrol- le	Fibri- nogen	Throm- bin	LPS	α- Toxin
71751	Alpha Enolase	47,04	7,6	<b>1,022</b>	<b>0,713</b>	<b>0,729</b>	<b>0,534</b>	<b>0,628</b>
								
71750	Alpha Enolase	47,04	7,3	<b>0,522</b>	<b>0,346</b>	<b>0,403</b>	<b>0,245</b>	<b>0,542</b>
								

**Tabelle 37:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

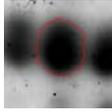
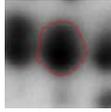
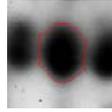
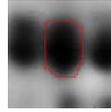
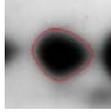
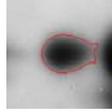
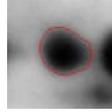
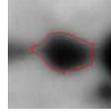
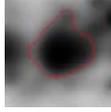
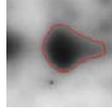
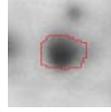
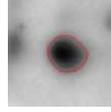
Phospho-threonin Spot ID	Protein-name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrolle	Fibrinogen	Thrombin	LPS	$\alpha$ -Toxin
38474	PLEK Protein (Platelet p47 protein)	62,09	6,0	<b>0,829</b> 	<b>1,135</b> 	<b>1,160</b> 	<b>1,009</b> 	<b>1,349</b> 
63113	Ras suppressor protein 1	31,39	7,8	<b>0,388</b> 	<b>0,283</b> 	<b>0,471</b> 	<b>0,213</b> 	<b>0,348</b> 
38472	Fumarylacetoacetase	46,34	6,9	<b>0,887</b> 	<b>0,831</b> 	<b>0,705</b> 	<b>0,589</b> 	<b>0,543</b> 
38477	Alpha Enolase	47,04	7,3	<b>0,394</b> 	<b>0,793</b> 	<b>0,212</b> 	<b>0,545</b> 	<b>0,653</b> 
38469	Coronin Actin binding Protein 1C	56,34	6,9	<b>0,223</b> 	<b>0,588</b> 	<b>0,726</b> 	<b>0,491</b> 	<b>0,737</b> 

**Tabelle 38:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

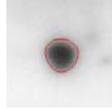
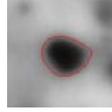
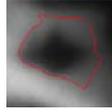
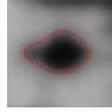
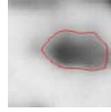
**Proteine Liste der nach zwölf Stunden signifikant veränderten Proteine**

Silbergel Spot ID	Protein-name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrolle	Fibrinogen	Thrombin	LPS	$\alpha$ -Toxin
64601	AF212303	27,55	5,5	<b>0,540</b> 	<b>0,753</b> 	<b>0,723</b> 	<b>0,689</b> 	<b>0,766</b> 
72619	Protein-disulfid-isomerase ER 60 precursor	56,8	5,7	<b>0,432</b> 	<b>0,462</b> 	<b>0,543</b> 	<b>0,524</b> 	<b>0,722</b> 
56686	Alpha Enolase	47,04	7,3	<b>0,793</b> 	<b>0,679</b> 	<b>0,654</b> 	<b>0,620</b> 	<b>0,771</b> 
64598	Peroxiredoxin-6	24,88	6,3	<b>0,623</b> 	<b>0,682</b> 	<b>0,589</b> 	<b>0,703</b> 	<b>0,490</b> 
72763	Protein-disulfid-isomerase ER 60 precursor	56,76	5,7	<b>0,574</b> 	<b>0,542</b> 	<b>0,404</b> 	<b>0,359</b> 	<b>0,589</b> 
5662	AF212303	27,55	5,9	<b>0,160</b> 	<b>0,332</b> 	<b>0,250</b> 	<b>0,322</b> 	<b>0,372</b> 
64600	Tropomyosin 2	32,79	4,2	<b>2,352</b> 	<b>1,697</b> 	<b>1,782</b> 	<b>1,993</b> 	<b>1,671</b> 

**Tabelle 39:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

Phosphoserin Spot ID	Protein-name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrolle	Fibrinogen	Thrombin	LPS	$\alpha$ -Toxin
64739	Fibrinogen gamma A chain precursor	49,5	5,6	<b>1,168</b> 	<b>0,914</b> 	<b>0,826</b> 	<b>1,111</b> 	<b>1,571</b> 
55613	Fibrinogen beta chain	55,9	6,8	<b>0,405</b> 	<b>1,318</b> 	<b>0,577</b> 	<b>0,868</b> 	<b>0,597</b> 
64942	Fibrinogen beta chain	55,9	6,9	<b>0,563</b> 	<b>0,829</b> 	<b>0,743</b> 	<b>0,367</b> 	<b>0,465</b> 
64667	Alpha Enolase	47,04	7,0	<b>0,125</b> 	<b>0,260</b> 	<b>0,258</b> 	<b>0,258</b> 	<b>0,463</b> 

**Tabelle 40:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

Phospho- threonin Spot ID	Protein- name	MG (kDa)	pI (pH)	Kontrol- le	Fibri- nogen	Throm- bin	LPS	$\alpha$ - Toxin
57848	Alpha Enolase	47,04	7,0	<b>0,462</b> 	<b>0,236</b> 	<b>0,391</b> 	<b>0,449</b> 	<b>0,279</b> 
57877	Alpha Enolase	47,04	7,3	<b>0,388</b> 	<b>0,337</b> 	<b>0,713</b> 	<b>0,442</b> 	<b>0,369</b> 
578381	H <sup>+</sup> trans- porting two sec- tor AT- Pase (mito- chon- drial)	56,52	4,8	<b>0,640</b> 	<b>1,096</b> 	<b>1,518</b> 	<b>0,978</b> 	<b>0,607</b> 

**Tabelle 41:** Änderungen der Proteinexpression ausgedrückt in folgenden Werten: molekulare Masse (MG), pI (Wert des isoelektrischen Punktes in pH-Einheiten), relative Expression der Proteine.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof.Dr.med. M. Buerke bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat und durch viele Gespräche immer neue Ansätze aufzeigte. Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof.Dr.med. K. Werdan für die Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Klinik. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. A. Langner bedanken, der die Betreuung am Institut für Pharmazie übernahm. An dieser Stelle möchte ich mich nochmals bei Dr. med. H. Schwertz, Dr. med. S. Lindemann und A. Weyrich bedanken, die durch ihre kritischen Fragen und Anregungen mir immer neue Denkanstöße gegeben haben. Auch der guten Seele im Labor, Frau Schulz, gilt ein großes Dankeschön, die mir immer beratend zur Seite stand und zu jeder Zeit die richtigen Worte fand. Aber auch Ihr, Ihr zahllosen Blutspender, bei euch wollte ich mich bedanken ohne euch wäre diese Arbeit wohl nicht fertig geworden.

## Lebenslauf

**Name:** Sebastian Schubert

**Geburtsdatum:** 28.01.1981

**Adresse:** Weidaweg 4, 06122 Halle

**Geburtsort:** Wippra /Harz

**Eltern:** Ingrid Schubert, geb. Wald  
Siegfried Schubert

**Schulischer Werdegang:**

1987 – 1991 Grundschohle am Markt, Hettstedt

1991 – 1999 Novalis Gymnasium, Hettstedt

**Beruflicher Werdegang:**

Oktober 2000 – Oktober 2004 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg

März 2001 Famulatur Stephanus Apotheke, Halle (Saale)

August 2001 Famulatur Krankenhausapotheke der Kreiskliniken Aschersleben- Staßfurt, Aschersleben

November 2004 - April 2005 Diplomand am Institut für Pharmazeutischen Chemie der Martin-Luther- Universität Halle/Wittenberg im Labor von Prof. Dr. H. Richter  
Thema: „Beiträge zur Synthese und Charakterisierung biophiler siliciumhaltiger Lipide mit unterschiedlichen Spacervarianten.“

Mai 2005 – November 2005 Pharmaziepraktikum Süd-Apotheke, Halle (Saale)

Dezember 2005 Approbation als Apotheker

seit Dezember 2005 Promotionsstudent an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Direktor: Prof. Dr. med. K. Werdan  
  
Thema: Einfluss bakterieller Toxine auf die Aktivierung und *de novo* Proteinsynthese in humanen Thrombozyten unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Michael Buerke.

Halle (Saale), den 07.05.2009

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass zu keinem Zeitpunkte, diese oder eine weitere Arbeit an einer anderen Universität eingereicht wurde.

Halle (Saale), den 07.05.2009