

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Greinacher)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: “A New Role for NAP1L1 in Platelets” –  
Betrachtung der Aktivität eines Nukleosomen-  
organisierenden Proteins in anukleären Zellen

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)  
der  
Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald  
2022

vorgelegt von:  
Martin Freitag  
Geb. am 03.12.1985  
in Meißen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Barbara M. Bröker

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrike Seifert

Ort: Greifswald

Tag der Disputation: 23.09.2022

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis  | vi |
| Abkürzungsverzeichnis  | ix |
| <br>   |    |
| 1 Einleitung .....   | 15 |
| 1.1 Thrombozyten und Thrombopoese.....   | 15 |
| 1.2 Molekularbiologie des Thrombozyten .....                                     | 17 |
| 1.3 Nukleäre Proteine in Thrombozyten .....                                      | 18 |
| 1.4 NAP, NAP1-likes und NAP1L1 .....   | 18 |
| 1.5 NAP1L1 in Thrombozyten - Rolle in Gesundheit und Krankheit.....              | 20 |
| 1.6 NAP1L1 und virale Infektion .....  | 21 |
| 1.7 Bakterielle Infektion und ihr Einfluss auf Thrombozyten .....                | 22 |
| 1.8 Bakterielle Infektion und ihr Einfluss auf den systemischen Stoffwechsel ... | 23 |
| 1.9 Verknüpfung von Metabolismus und Thrombozytenfunktion .....                  | 25 |
| 1.10 Zusammenfassung.....  | 28 |
| 1.11 Zielstellung .....  | 29 |
| 2 Material .....   | 30 |
| 2.1 Antikörper .....   | 30 |
| 2.2 Geräte .....   | 30 |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....                                  | 31 |
| 2.4 Puffer .....   | 37 |
| 2.5 Software .....   | 39 |
| 3 Methoden .....   | 40 |
| 3.1 Thrombozyten-Isolation (PRP-Methode) .....                                   | 40 |
| 3.2 Thrombozyten-Aufreinigung (MACS).....  | 40 |
| 3.3 Isolierung kernhaltiger Zellen aus UCB (Ficoll-Paque-Methode).....           | 41 |
| 3.4 CD34 <sup>+</sup> -HSC-Aufreinigung (MACS) und Kultivierung.....             | 41 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.5    | RNA-Isolation .....   | 42 |
| 3.5.1  | DNase-Behandlung von isolierter RNA .....                               | 43 |
| 3.6    | RT-PCR und Primer .....   | 44 |
| 3.6.1  | Agarosegel-Auftrennung und Analyse .....                                | 47 |
| 3.7    | SDS-PAGE und Western Blot .....   | 47 |
| 3.7.1  | Semiquantitative Western-Blots und Ladungskontrollen .....              | 49 |
| 3.7.2  | Peptide Competition Assay (PCA) .....                                   | 50 |
| 3.8    | Native Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....                              | 51 |
| 3.9    | Probenaufbereitung für Massenspektrometrie (MS) .....                   | 53 |
| 3.9.1  | MS-kompatible Silberfärbung.....  | 53 |
| 3.9.2  | Trypsin In-Gel-Verdau.....  | 53 |
| 3.10   | LC-MS/MS.....   | 54 |
| 3.11   | Fluoreszenz-Mikroskopie .....   | 55 |
| 3.12   | Sanger-Sequenzierung .....  | 57 |
| 4      | Ergebnisse .....  | 58 |
| 4.1    | Nachweis von NAP1L1-mRNA in Thrombozyten.....                           | 58 |
| 4.2    | Nachweis alternativer NAP1L1-mRNA in Thrombozyten.....                  | 59 |
| 4.3    | Alternative NAP1L1-mRNA nach Thrombozyten-Inkubation .....              | 64 |
| 4.4    | Sequenzierung in RT-PCR amplifizierter NAP1L1-cDNA .....                | 65 |
| 4.5    | Alternative NAP1L1-mRNA in Thrombozyten und kernhaltigen Zellen.....    | 71 |
| 4.6    | Alternative NAP1L1-mRNA in Thrombopoese.....                            | 72 |
| 4.7    | Alternative NAP1L1-mRNA nach Thrombozyten-Aktivierung .....             | 73 |
| 4.8    | Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombozyten (WB).....                   | 74 |
| 4.8.1  | NAP1L1-Western Blot in Peptide Competition Assay .....                  | 77 |
| 4.9    | NAP1L1-Isoformen nach Thrombozyten-Kultivierung.....                    | 79 |
| 4.10   | Mikroskopischer Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombozyten (ICC) ..... | 80 |
| 4.11   | Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombopoese .....                       | 85 |
| 4.11.1 | NAP1L1 in Morphogenese der Thrombozyten.....                            | 85 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.11.2 | NAP1L1 in CD34 <sup>+</sup> -HPC und <i>in vitro</i> -Megakaryozyten .....     | 86  |
| 4.12   | NAP1L1 in humanen Thrombozyten im Rahmen von Infektionen .....                 | 94  |
| 4.13   | Native NAP1L1-Co-IP und Identifikation von DLAT (LC-MS/MS).....                | 95  |
| 4.14   | Native NAP1L1-Co-IP und Identifikation von DLAT (WB) .....                     | 100 |
| 4.15   | Nachweis von DLAT-Protein in Thrombozyten (ICC) .....                          | 101 |
| 4.16   | Nachweis von DLAT-Protein in <i>in vitro</i> -Megakaryozyten.....              | 102 |
| 4.17   | Nachweis von NAP1L1 und DLAT in humanen Thrombozyten .....                     | 103 |
| 4.18   | DLAT in humanen Thrombozyten im Rahmen von Infektionen .....                   | 104 |
| 5      | Diskussion.....  | 105 |
| 5.1    | Überblick .....  | 105 |
| 5.2    | NAP1L1-Isoformen .....   | 105 |
| 5.2.1  | Zusammenfassung .....  | 110 |
| 5.3    | Lokalisation von NAP1L1 in CD34 <sup>+</sup> -HPC und humanen Thrombozyten.... | 111 |
| 5.3.1  | Zusammenfassung .....  | 112 |
| 5.4    | Alternative NAP1L1-Transkripte und abgeleitete Proteinstruktur .....           | 113 |
| 5.4.1  | Zusammenfassung .....  | 114 |
| 5.5    | Interaktion von NAP1L1 und DLAT.....   | 114 |
| 5.6    | Alternative Funktionen von NAP1L1 als Transportprotein und Chaperon .          | 115 |
| 5.7    | Expression und Interaktion von NAP1L1 und DLAT in Sepsis und H1N1 .            | 117 |
| 5.8    | Rolle von NAP1L1 und DLAT in Sepsis und H1N1.....                              | 119 |
| 6      | Zusammenfassung und Ausblick .....   | 121 |
| 7      | Literaturverzeichnis .....   | 122 |
| 8      | Veröffentlichung .....   | 140 |
| 9      | Danksagung.....  | 141 |
| 10     | Eidesstattliche Erklärung .....  | 142 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Vergleich der globalen Expression von NAP1L1-6 und sechs typischen Thrombozyten-Proteinen in verschiedenen Geweben bzw. Zellen.....    | 19 |
| <b>Abbildung 2:</b> Expression von NAP1L1 mRNA in Thrombozyten unterschiedlicher Individuen. ....  | 21 |
| <b>Abbildung 3:</b> Prinzip des Peptide Competition Assay .....  | 50 |
| <b>Abbildung 4:</b> Prinzip der nativen Co-Immunopräzipitation .....   | 52 |
| <b>Abbildung 5:</b> Humane Thrombozyten weisen NAP1L1 mRNA auf .....   | 58 |
| <b>Abbildung 6:</b> Positionierung von NAP1L1-Primer-Paar No. I anhand vier exemplarischer mRNA-Targets .....  | 59 |
| <b>Abbildung 7:</b> Humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA auf .....   | 61 |
| <b>Abbildung 8:</b> Positionierung von NAP1L1-Primer-Paar Nr. II anhand vier exemplarischer mRNA-Targets. ....   | 62 |
| <b>Abbildung 9:</b> Humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA vor und nach 24-stündiger Inkubation in einem Zellkulturmedium auf .....            | 64 |
| <b>Abbildung 10:</b> Alternative NAP1L1-Transkripte vor DNA-Sequenzierung.....   | 65 |
| <b>Abbildung 11:</b> Alternative NAP1L1-Transkripte nach DNA-Sequenzierung .....   | 66 |
| <b>Abbildung 12:</b> Sequenzierung der NAP1L1-RT-PCR-Produkte - 600bp-Amplifikat   | 67 |
| <b>Abbildung 13:</b> Sequenzierung der NAP1L1-RT-PCR-Produkte - 400bp-Amplifikat   | 69 |
| <b>Abbildung 14:</b> Humane kernhaltige Zellen (HEK) und humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA auf .....                                      | 71 |
| <b>Abbildung 15:</b> Expression von NAP1L1 mRNA in humanen CD34+-HPC im Rahmen ihrer <i>in vitro</i> Differenzierung zu Megakaryozyten in Zellkultur ..... | 72 |
| <b>Abbildung 16:</b> Expression von alternativen NAP1L1-Transkripten in humanen Thrombozyten nach <i>in vitro</i> -Aktivierung.....                        | 73 |
| <b>Abbildung 17:</b> Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein (mAb) ...  | 74 |
| <b>Abbildung 18:</b> Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein (pAb) ....   | 75 |
| <b>Abbildung 19:</b> NAP1L1-Protein wird in humanen Thrombozyten spezifisch nachgewiesen (PCA).....  | 77 |
| <b>Abbildung 20:</b> Humane Thrombozyten weisen NAP1L1-Protein in drei Isoformen vor und nach 24-stündiger Inkubation in einem Nährmedium auf.....         | 79 |
| <b>Abbildung 21:</b> Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein ubiquitär (ICC).....   | 80 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 22:</b> Spezifität der Fluoreszenzmikroskopie für NAP1L1 in humanen Thrombozyten.....   | 81 |
| <b>Abbildung 23:</b> NAP1L1 ist in humanen Thrombozyten vor und nach 12-stündiger Inkubation ubiquitär verteilt (ICC). .....                                 | 82 |
| <b>Abbildung 24:</b> Vergleich der intrazellulären Lokalisation von NAP1L1 gegenüber dem Granulomer humaner Thrombozyten (ICC) .....                         | 83 |
| <b>Abbildung 25:</b> Peri-granuläre Lokalisation von NAP1L1 in humanen Thrombozyten (ICC).....   | 84 |
| <b>Abbildung 26:</b> NAP1L1 wird während der Plättchen-Morphogenese auf entstehende Thrombozyten verteilt (ICC).....   | 85 |
| <b>Abbildung 27:</b> NAP1L1 wird während der Interphase humaner CD34 <sup>+</sup> -HPC zytoplasmatisch exprimiert (Tag 2).....                               | 86 |
| <b>Abbildung 28:</b> NAP1L1 ist in humanen CD34 <sup>+</sup> -HPC perinukleär und in Assoziation mit dem Translationsapparat lokalisiert (Tag 11).....       | 86 |
| <b>Abbildung 29:</b> NAP1L1 ist in humanen <i>in vitro</i> Megakaryozyten zytoplasmatisch lokalisiert, konzentriert sich jedoch perinukleär (ICC).....       | 87 |
| <b>Abbildung 30:</b> NAP1L1 konzentriert sich bei Zytoskelett-Reorganisation des <i>in vitro</i> Megakaryozyten verstärkt in perinukleärem Muster (ICC)..... | 88 |
| <b>Abbildung 31:</b> Lokalisation von NAP1L1 ist in humanen CD34 <sup>+</sup> -HPC M-Phase abhängig (ICC). .....   | 89 |
| <b>Abbildung 32:</b> NAP1L1 ist in humanen, polyploiden CD34 <sup>+</sup> -HPC vermehrt nachweisbar (ICC).....   | 90 |
| <b>Abbildung 33:</b> NAP1L1 ist im Rahmen der Migration von CD34 <sup>+</sup> -HPC auch in den Zellfortsätzen lokalisiert (ICC).....                         | 90 |
| <b>Abbildung 34:</b> NAP1L1 in den Pseudopodien (Pfeile) eines <i>in vitro</i> Megakaryozyten vor Proplatelet-Formation. ....                                | 91 |
| <b>Abbildung 35:</b> NAP1L1 im desintegrierten <i>in vitro</i> Megakaryozyten mit Zytoplasmabrücke (Pfeil) zu ausgestoßenem Nukleus.....                     | 92 |
| <b>Abbildung 36:</b> NAP1L1 in den entstehenden Proplatelet-Fortsätzen eines <i>in vitro</i> -Megakaryozyten mit Proplatelet-Freisetzung (Pfeile) .....      | 93 |
| <b>Abbildung 37:</b> Expression von NAP1L1 in humanen Thrombozyten in Sepsis und H1N1-Infektion.....   | 94 |
| <b>Abbildung 38:</b> Spezifisches Immunopräzipitat von NAP1L1 in humanen Thrombozyten.....   | 95 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abbildung 39:</b> Nachgewiesene Peptidmassespektren für DLAT.....  | 96  |
| <b>Abbildung 40:</b> LC-MS/MS-Analyse der 70kDa-Bande der nativen NAP1L1-Co-IP .  | 98  |
| <b>Abbildung 41:</b> Analyse der in LC-MS/MS nachgewiesenen (gelb) Anteile an der gesamten Aminosäuresequenz (weiß) von DLAT .....  | 99  |
| <b>Abbildung 42:</b> Nachweis von DLAT im spezifischen Co-Immunopräzipitat von NAP1L1 (WB).....   | 100 |
| <b>Abbildung 43:</b> DLAT ist in humanen Thrombozyten exprimiert (ICC). .....   | 101 |
| <b>Abbildung 44:</b> Nachweis von DLAT ist in <i>in vitro</i> -Megakaryozyten und ihren Proplatelet-Fortsätzen (ICC).....   | 102 |
| <b>Abbildung 45:</b> NAP1L1 und DLAT werden in humanen Thrombozyten gemeinsam exprimiert (ICC). .....   | 103 |
| <b>Abbildung 46:</b> Expression von DLAT in humanen Thrombozyten in Sepsis und H1N1-Infektion.....  | 104 |
| <b>Abbildung 47:</b> Nachweis von NAP1L in WB von Ishimi et al. (1984) .....  | 107 |
| <b>Abbildung 48:</b> Aminosäuresequenz der NAP1L1-Isoformen.....  | 113 |
| <b>Abbildung 49:</b> Elektronen- (links) und Fluoreszenz- (rechts) mikroskopische Darstellung von Mitochondrien in humanen Thrombozyten (von Schwertz H, persönliche Kommunikation) ..... | 114 |



## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| β-ME            | β-Mercaptoethanol  |
| ACD             | Acid, Citrat, Dextrose   |
| ACN             | Acetonitril  |
| ADP             | Adenosindiphosphat   |
| AGC             | Automated Gain Control   |
| APAF-1          | Apoptotic Protease Activating Factor 1   |
| ATP             | Adenosintriphosphat  |
| AUC             | Area Under The Curve   |
| BLAST           | Basic Local Alignment Search Tool  |
| BSA             | Bovine Serum Albumin   |
| Bp              | Base Pair  |
| CCCP            | Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon   |
| CCD             | Charge-Coupled-Device  |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid  |
| CD29            | Cluster of Differentiation 29 (syn. Integrin beta-1, Teil des Kollagen-R/ Gp Ia / IIa) |
| CD34            | Cluster of Differentiation 34  |
| CD40L           | Cluster of Differentiation 40 ligand (syn. CD154)                                      |
| CD42a           | Cluster of Differentiation 42a (syn. Gp IX, Teil des vWF-R/ Gp Ib-IX-V)                |
| CD42b           | Cluster of Differentiation 42b (syn. Gp Ib, Teil des vWF-R/ Gp Ib-IX-V)                |
| CD45            | Cluster of Differentiation 45 (syn. PTPRC/leukocyte common antigen)                    |
| CD61            | Cluster of Differentiation 61 (syn. Gp IIIa/Integrin β3, Teil des Fibrinogen-R)        |

|          |   |
|----------|---|
| CD62P    | Cluster of Differentiation 62 p-Selectin                              |
| cDNA     | Complementary Deoxyribonucleic Acid                                   |
| CFU-GEMM | Colony Forming Unit der Granulo-, Erythro-, Mono-, Megakaryozytopoese |
| DAPI     | 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride                        |
| DIC      | Disseminated Intravasal Coagulation                                   |
| PAGE     | Polyacrylamide Gel Electrophoresis                                    |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid  |
| DMS      | Demarkationsmembransystem   |
| DNA      | Deoxyribonucleic Acid   |
| DNase    | Deoxyribonuclease   |
| dNTPs    | Deoxyribonucleotriphosphate   |
| DTT      | Dithiothreitol  |
| eGFP     | Enhanced Green Fluorescent Protein                                    |
| GAPDH    | Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase                               |
| gDNA     | Genomic Deoxyribonucleic Acid   |
| GP       | Glykoprotein  |
| GLUT     | Glucose Transporter (syn. SLC2A1)                                     |
| ETC      | Electron Transport Chain  |
| FACS     | Fluorescence-Activated Cell Sorting                                   |
| FcR      | Fc-Rezeptor   |
| FITC     | Fluorescein Isothiocyanate  |
| HBSS     | Hanks' Balanced Salt Solution   |
| HEK      | Human Embryonic Kidney cells  |
| HeLa     | Henrietta Lacks-Zellstamm   |
| HIF      | Hypoxia-induced Factor  |
| HIV      | Human Immunodeficiency Virus  |

|          |   |         |
|----------|---|---------|
| h        | hour/Stunde   |         |
| hnRNA    | Heterogeneous Nuclear RNA (syn. Pre-mRNA)                     |         |
| HRP      | Horseradish Peroxidase  |         |
| HPC      | Hematopoetic Progenitor Cells                                 |         |
| HUVEC    | Human Umbilical Vein Endothelial Cells                        |         |
| ICAM-2   | Intercellular adhesion molecule 2 (syn. CD102)                |         |
| IgG      | Immunglobulin G   |         |
| IL       | Interleukin   |         |
| kDa      | Kilodalton  |         |
| KHK      | Koronare Herzkrankheit  |         |
| LC-MS/MS | Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte<br>Massenspektrometrie | Tandem- |
| LED      | Light-Emitting Diodes   |         |
| LPS      | Lipopolysaccharide  |         |
| min      | Minuten   |         |
| miRNAs   | Micro Ribonucleic Acid  |         |
| mRNA     | Messenger Ribonucleic Acid                                    |         |
| mtDNA    | Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid                           |         |
| MW       | Mass Weight   |         |
| NCBI     | National Center for Biotechnology Information                 |         |
| NDM      | Non-fat Dry Milk powder                                       |         |
| MACS     | Magnetic-activated Cell Sorting                               |         |
| MMP      | mitochondriales Membranpotential (syn. $\Delta\psi M$ )       |         |
| MODS     | Multi-Organ Dysfunction Syndrome                              |         |
| MOF      | Multi-Organ Failure   |         |
| MPTP     | Mitochondrial Permeability Transition Pore                    |         |
| M-MLV    | Moloney-Maus-Leukämie-Virus                                   |         |

|           |   |
|-----------|---|
| MT        | Mikrotubuli   |
| NEC-RT    | non-Enzyme-Control Reverse Transcription                                  |
| NTC-RT    | non-Template-Control Reverse Transcription                                |
| NTC-PCR   | non-Template-Control Polymerase Chain Reaction                            |
| OGDC      | $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex                              |
| Oligo DTs | Oligo Deoxyribonucleic Triphosphates                                      |
| ORF       | Open Reading Frame  |
| PAC-1     | Epitop auf aktivierten CD41/CD61-Komplex (gpIIb/IIIa)                     |
| PBS       | Phosphate-Buffered-Saline   |
| PCR       | Polymerase-Chain-Reaction   |
| PDHC      | Pyruvatdehydrogenase-Komplex  |
| PDK       | Pyruvatdehydrogenase-Kinase   |
| PIPES     | Peperazin 1,4 ethansulfonsäure  |
| PF4       | Plättchenfaktor 4 (syn. CXCL4)  |
| PFA       | Paraformaldehyde  |
| PGE1      | Prostaglandin E1  |
| PMSF      | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| poly-(A)  | poly-Adenosin   |
| Plts.     | Platelets/Thrombozyten  |
| PP        | Polypropylen  |
| PSG       | PIPES-Saline-Glucose-Puffer   |
| PSG       | Phosphate-buffered-Saline-Glucose   |
| PRP       | Platelet-rich Plasma  |
| PS        | Phosphatidylserin   |
| PVDF      | Polyvinylidene Difluoride   |
| RANTES    | Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (syn. CCL5) |

|               |  |
|---------------|--|
| RES           | Retikulo-endotheliale System                           |
| RIPA          | Radioimmunoprecipitation Assay (Buffer)                |
| RNA           | Ribonucleic Acid                                       |
| RNase         | Ribonuclease   |
| ROS           | Reactive Oxygen Species                                |
| RT            | Reverse Transkriptase                                  |
| SCF           | Stem Cell Factor                                       |
| sec           | Sekunden   |
| SDS           | Sodium-Dodecyl-Sulfate                                 |
| SIRS          | Systemic Inflammatory Immune Response                  |
| snRNAs        | small nuclear Ribonucleic Acid                         |
| SOD-2         | Superoxid-Dismutase 2                                  |
| TAE           | TRIS-Acetat-EDTA                                       |
| TAF-1 $\beta$ | Template-Activating Factor-I (syn. SET proto-Oncogene) |
| TBS           | Tris-Buffered Saline                                   |
| TF            | Tissue Factor  |
| TNF $\alpha$  | Tumor Necrosis Factor alpha                            |
| TPO           | Thrombopoetin  |
| TTFA          | Thenoyltrifluoroacetone                                |
| TRAP          | Thrombin receptor activating peptide (PAR-1 ligand)    |
| TSC           | Total spectrum count (per proteine)                    |
| TxA2          | Thromboxan-A2  |
| U2OS          | Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells               |
| UCB           | umbilical cord blood                                   |
| UTR           | Untranslated Region                                    |
| UV            | Ultraviolet  |

vgl.

vergleiche

vWF

von-Willebrand-Faktor

WB

Western Blot

## 1 Einleitung

### 1.1 Thrombozyten und Thrombopoese

Seit ihrer Erstbeschreibung durch den Anatom Max Johann S. Schultze im Jahr 1865, einem ehemaligen Studenten der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald, hat sich unser Bild über die ca. eineinhalb bis drei Mikrometer messenden, diskoiden, kernlosen Gebilde des menschlichen Blutes namens Thrombozyten (engl. Platelets - Plättchen) stetig gewandelt<sup>1</sup>. Allein schon die Art ihrer Entstehung aus den polyploiden Megakaryozyten ist immer noch Gegenstand der aktuellen Diskussion. Dabei werden momentan zwei Theorien favorisiert:

- „Proplatelet Formation Theory“: Pseudopodienartige Fortsätze bilden sich ausgehend vom Soma des Megakaryozyten und geben durch dünne Zytoplasmabrücken verbundene „Proplatelets“ in den Blutstrom ab, wo diese sich zu Plättchen formieren<sup>2</sup>. Zusätzlich existiert eine ca. drei bis zehn Mikrometer große Subpopulation an Thrombozyten („Preplatelets“), die zumindest für eine gewisse Zeit die Fähigkeit besitzen, sich aktiv in weitere Plättchen aufzuteilen<sup>3</sup>.
- „Protoplatelet Fragmentation Theory“: Gegen Ende der Entwicklung des Megakaryozyten kommt es zur Ausbildung von „Thrombozyten-Territorien“ innerhalb des Somas und über plötzliche Desintegration der Vorläuferzelle erfolgt die Freisetzung der Plättchen<sup>4</sup>.

In ersterer hätte ein internes Zellmembransystem des Megakaryozyten (DMS) die Aufgabe, die für die enorme Vergrößerung der Gesamtoberfläche notwendigen Membranbestandteile kontinuierlich nachzuliefern<sup>5</sup>. In zweiter Vorstellung wäre das DMS bereits die Anlage der späteren Thrombozyten, die sozusagen „explosionsartig“ auseinanderstreben<sup>4</sup>. *Ex vivo* als auch *in vivo* Daten in Menschen und anderen Säugetieren stützen in der Mehrheit deutlich die These der Entstehung von Thrombozyten via „Proplatelet Formation“<sup>6</sup>. Gleichwohl ist nicht völlig ausgeschlossen, dass in besonderen Situationen auch die Fragmentation stattfindet<sup>7</sup>.

Unstrittig ist, dass die Reifung des Megakaryozyten von der CD34-positiven Stammzelle (HSC) ihren Ausgang nimmt. Über die gemeinsame Vorläuferzelle des myeloischen Entwicklungsweges (CFU-GEMM) bildet sich, unter dem Einfluss diverser Zyto- und Chemokine wie z.B. TPO, IL-3, -6 und -11 sowie dem SCF, über einen Zeitraum von etwa 14 Tagen der Megakaryozyt. Dieser zeigt in der Endphase seiner Entwicklung spezifische Merkmale. Zum einen die bereits erwähnte Polyploidität des Zellkerns (im Schnitt mit einem 16-fachen Chromosomensatz durch drei endomitotische Teilungen), weiterhin die Entwicklung des DMS, eines tubulären Systems (DTS) und ein vom Golgi-Apparat ausgehendes System verschiedener Granula (alpha/α und „dense“/δ Granula). Diese Granula sind vorwiegend mit gerinnungsaktiven Proteinen (vWF, Thrombospondin, Fibrinogen und PF4) sowie niedrigmolekularen Botenstoffen (Serotonin, Noradrenalin, ADP und ATP) beladen. Aufgrund der Beobachtung, dass spezifisch kultivierte Megakaryozyten die Fähigkeit besitzen *in vitro* funktionsfähige Thrombozyten zu generieren und damit nicht zwangsläufig von einer bestimmten Knochenmarksumgebung abhängig sind, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen die Hypothese einer extramedullären Plättchenformation aufgestellt. In der Tat kann anhand diverser experimenteller Daten nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der Endstrecke der Thrombozytopoese *in vivo* auch in der Lunge bzw. dem Blutkreislauf stattfindet<sup>8-10</sup>.

Mit dem Abschluss dieser Entwicklung zirkulieren etwa 150 000 bis 300 000 Plättchen pro Mikroliter im Blut eines menschlichen Erwachsenen. Durch das RES von Leber und Milz werden sie am Ende ihrer ca. zehn Tage währenden Lebensspanne schließlich aus dem Kreislauf entfernt und abgebaut<sup>6</sup>.

Die wichtigste Aufgabe der Thrombozyten besteht in der Aufrechterhaltung der zellulären Blutstillung (Hämostase) im ständigen Zusammenspiel mit Gefäßendothel, und plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Physiologisch stellt die Blutzirkulation ein weitestgehend geschlossenes System dar, in welchem die genannten Akteure sicherstellen, dass es weder zum Austritt des Blutes noch zum Sistieren des Blutflusses kommt. Im Fall einer Gefäßverletzung adhären Thrombozyten zuerst am Ort der Störung der Gefäßintegrität, aggregieren und bilden einen primären Thrombus. Nach Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade mit Ausbildung von



quervernetzten Fibrinfibrillen wird dieser zum festeren, sekundären Thrombus umgewandelt. Im Rahmen der Heilung („restitutio ad integrum“) wird der Thrombus schließlich durch Plasmafaktoren der Fibrinolyse aufgelöst und der Defekt durch Endothel abgedeckt. Wenn dieses System, meist ausgelöst durch entzündliche und/oder degenerative Veränderungen der Gefäßwand, aus dem Gleichgewicht gerät, trägt dies zur Entstehung von Erkrankungen aus dem kardiovaskulärer Formenkreis bei. Diese stellen mit ihren beiden Hauptvertretern, der KHK und dem ischämischen Schlaganfall, in den heutigen Industrieländern nach wie vor die Hauptursachen für Morbidität und Mortalität und verursachen beträchtliche Ausgaben für die Gesundheitssysteme dieser Länder<sup>11</sup>.

### 1.2 Molekularbiologie des Thrombozyten

Bei fehlendem Zellkern, der weiter oben beschriebenen klar umrissenen Funktion, und relative kurzen mittleren Lebensdauer von nur zehn Tagen, lag traditionell der Schluss nahe, die Proteinausstattung der Blutplättchen als relativ statisch und „gerinnungsorientiert“ zu betrachten. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Schluss limitierend und unzutreffend zugleich ist. Thrombozyten sind nicht auf das von ihren Vorläuferzellen mitgegebene Repertoire an Proteinen beschränkt - sie setzen ihre eigenen Akzente: mRNA-splicing, post-translationale Modifikationen, Regulation von Proteindegradation, Aufnahme von Proteinen aus dem Plasma und nicht zuletzt die eigene begrenzte Proteinbiosynthese mittels mitgeführter Megakaryozyten-mRNA ermöglichen ihnen die Reaktion auf vielfältigere Anforderungen im menschlichen Organismus<sup>12</sup>. Diese umfassen Interaktionen mit Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr am Schauplatz der Thrombozytenaktivierung über Membranproteine wie z.B. CD62P, ICAM-2 und CD40L, aber auch via Freisetzung von Chemokinen wie z.B. PF4 und RANTES<sup>13-17</sup>. Zusätzlich können Thrombozyten direkt mit Endothelzellen z.B. via Serotonin, TxA<sub>2</sub>, PAF und IL-1 $\beta$  kommunizieren. Dies führt zur Regulation von Vasokonstriktion und -dilatation, und kann Endothelzellichte und Zell-Zell-Kontakte beeinflussen<sup>18,19</sup>.

Diese Erkenntnisse wirken nur auf den ersten Blick ungewöhnlich. Vergleicht man die Akteure der zellulären Hämostase unterschiedlicher Spezies, zeigt sich das Vorhandensein von kernlosen, funktionell spezialisierten Plättchen als

entwicklungsbiologisch junges Merkmal<sup>20</sup>. Die Vorgänger der Säugetiere zeichnen sich durch multifunktionelle, kernhaltige Zellen aus, die neben ihrer Aufgabe der Hämostase auch umfangreiche Funktionen z.B. im Rahmen der Abwehr von Infektionserregern wahrnehmen. Insofern scheint der teilweise Erhalt von ursprünglichen, komplexen zytologischen, immunologischen und anderen regulatorischen Mechanismen im menschlichen Thrombozyt evolutionär schlüssig<sup>21,22</sup>.

### 1.3 Nukleäre Proteine in Thrombozyten

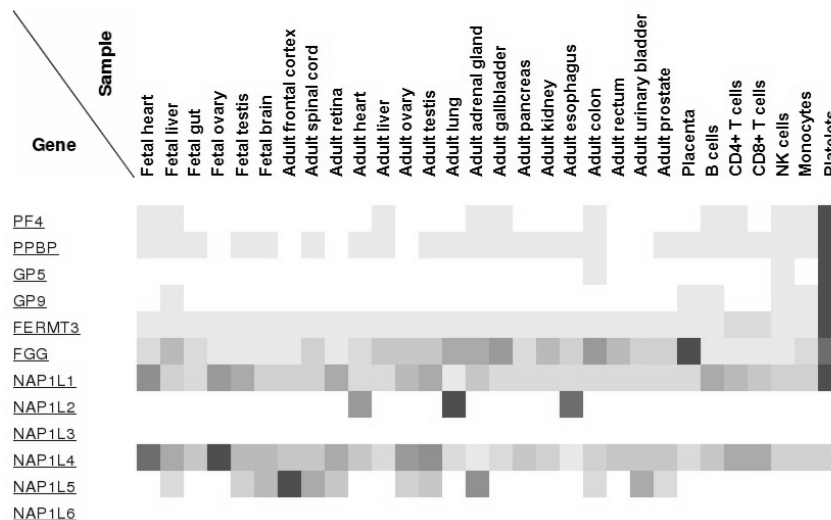
Bei Betrachtung der bislang veröffentlichten Proteome von Thrombozyten fällt auf, dass ein nicht unerheblicher Anteil der identifizierten thrombozytären Proteine klassischerweise mit einer Funktion im menschlichen Zellkern assoziiert wird. So konnten beispielweise in einer Übersichtsarbeit von 2009 insgesamt 1507 Proteine in ruhenden, nicht aktivierten Thrombozyten massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Davon wurden 13% bei nachfolgender Analyse als zum Nukleus zugehörig identifiziert<sup>23</sup>. Diese Beobachtung ist kein Einzelfall, auch andere Autoren berichten erstens, über eine große Überlappung der Proteinausstattung zwischen Plättchen und untersuchten kernhaltigen Zellen (HeLa und U2OS) und beschreiben zweitens, zahlreiche Proteine mit expliziter Zellkern-Funktion<sup>24</sup>. Unter den besonders hervorgehobenen Proteinen sind hnRNA-regulierende-Ribonukleoproteine, Transkriptionsfaktoren und ihre Regulatoren, aber auch Mitglieder der „Nucleosome-Assembly-Protein“- (NAP-) Familie, in diesem Fall NAP1L1, NAP1L4 und NAP1L5<sup>25</sup>, zu nennen.

Angesichts der „Zwitter-Identität“ des Thrombozyten als „kernlose Zelle“ stellt sich die Frage, ob diese Proteine auch hier ihre bekannte Funktion ausüben - und der Plättchenbiologie weitere Facetten hinzugefügt werden müssen - oder aber, ob sie weitere unbekannte Funktionen besitzen, welche u.U. erst unter den besonderen Gegebenheiten der thrombozytären Zellphysiologie zum Tragen kommen. Eine Frage, welche jeweils spezifisch für jedes nukleäre Protein beantwortet werden muss<sup>26</sup>.

### 1.4 NAP, NAP1-likes und NAP1L1

Die „Nucleosome Assembly“-Proteine der NAP-Familie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, die Bildung der kleinsten DNA-Organisationsstruktur, dem Nucleosom,

reversibel zu unterstützen. In dieser Rolle wurde NAP-1 zum ersten Mal 1984 von Ishimi et al. beschrieben<sup>27</sup>. NAP-1 und weitere Proteine der NAP-Familie wurden von der Hefe bis zum Mensch in einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen<sup>28</sup>. Für NAP-1, im Menschen als „NAP-1-like-Proteine-1“, NAP1L1, bezeichnet, sind gegenwärtig 306 orthologe Gene bekannt<sup>29</sup>. In der humanen NAP-Familie werden insgesamt sechs Homologe (NAP1L1 bis NAP1L6) unterschieden. In der Vergangenheit wurden Hinweise auf diverse weitere Funktionen dieses Proteins verfolgt. Zusammenfassend sind dies: Kontrolle des Zellzykluses, Regulation der Transkription über epigenetische Mechanismen, poly-(A)-mRNA-Bindung, und Transport von Histonen durch die Interaktion mit der Im- und Exportmaschinerie des Zellkerns<sup>30,31</sup>. Diese Erkenntnisse variierten stark mit dem jeweils untersuchten Organismus, Gewebe und Methoden. Das etwa 45kDa schwere Protein NAP1L1 (UniProtID: P55209) besteht aus 391 Aminosäuren (AS) und wird ubiquitär im menschlichen Organismus, im Gegensatz zu NAP1L2-6 jedoch verstärkt in Thrombozyten, exprimiert (siehe Abb. 1)<sup>32</sup>.



**Abbildung 1:** Vergleich der globalen Expression von NAP1L1-6 und sechs typischen Thrombozyten-Proteinen in verschiedenen Geweben bzw. Zellen.

MS-basierte Erhebung des humanen Proteoms<sup>32</sup>: Gemittelte, normalisierte Spektrum-Counts wurden für Gen und Gewebe jeweils mittels eines Weiß-Schwarz-Gradienten aufgetragen.

PF4 - *Platelet Factor 4*, PPBP - *Platelet basic protein*, GP5 - *Glykoprotein 5*, GP9 - *Glykoprotein 9*, FERMT3 - *Fermitin-3*, FGG - *Fibrinogen gamma chain*

Das zugehörige Gen (NCBI Gene ID: 4673) befindet sich auf Chromosom 12 (12q21.2) in anti-sense Polarität (Basenpaare 76,084958 bis 76,044892) und umfasst 19 Exone.

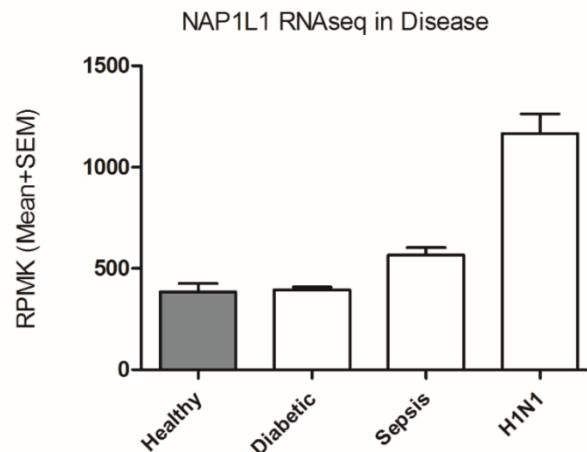
Nach derzeitigem Erkenntnisstand sind drei unterschiedliche mRNAs mit ihren entsprechenden Isoformen bekannt, es sind jedoch aufgrund der spezifischen Sequenz weitere alternative Transkripte denkbar und wurden teilweise als „potential transcripts“ in die NCBI Datenbank aufgenommen.

Eine detaillierte Röntgenstrukturanalyse existiert bis dato nur von NAP1 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (yNAP1, Proteine Data Bank ID: 2ayuA). Dort zeigten sich als Hauptmerkmale die Fähigkeit zur Homodimerisierung („Domain I“) und die durch stark saurer AS-Seitenkettenmotive („Domain II“) vermittelte Eigenschaft, basische Proteine wie z.B. Histone auf chaperon-artige Weise zu binden. Durch die größtenteils konservierte „core sequence“ von AS 74 bis 365, sollten diese Bindungsfähigkeiten allen Mitgliedern der NAP1-Familie zu Eigen sein. Umfangreiche Möglichkeiten der Polyglutamylierung, u.a. am C-terminalen Ende von Domäne II, würde die molekulare Modulation dieses Bindungsverhaltens zulassen<sup>28</sup>.

### **1.5 NAP1L1 in Thrombozyten - Rolle in Gesundheit und Krankheit**

Obwohl Art und Ausmaß der Korrelation zwischen Transkriptom- und Proteomdaten in Thrombozyten Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Debatte sind, wird doch von keiner Seite bestritten, dass die Erkenntnisse aus mRNA-Deep-Sequencing-Experimenten zumindest grundlegende Rückschlüsse auf die Proteinausstattung auch dieser „speziellen“ Zellen geben können<sup>25,33</sup>. In veröffentlichten mRNA-Sequenzierungsuntersuchungen konnte auch NAP1L1-mRNA (NCBI Reference Sequence: NM\_139207.2) detektiert und mit 284,1 RPKM (reads per kilo base of exon model per million mapped reads) (semi-) quantifiziert werden<sup>33</sup>.

Bisher unveröffentlichte Daten derselben Arbeitsgruppe zeigten eine diskrete bis signifikante Zunahme der Häufigkeit des o.g. Transkriptes in Plättchen bei verschiedenen Krankheitszuständen, wie z.B. Diabetes und Sepsis, aber auch bei Infektion mit dem Erreger der „Neuen Grippe/swine flu“, Influenza-Subtyp H1N1 (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2:** Expression von NAP1L1 mRNA in Thrombozyten unterschiedlicher Individuen.

RNA-Deep-sequencing-Analyse. RPMK - reads per kilobase, per million mapped reads. SEM - standard error of the mean. Persönliche, nicht veröffentlichte Kommunikation.

Allerdings lassen die gezeigten Daten keine Rückschlüsse auf die Art oder eine spezifische Funktion während des infektiösen Geschehens zu. Während die klassischen Funktionen des Proteins im Rahmen von Chromatinorganisation, Zellzykluskontrolle und Transkriptionsregulation eine pathophysiologische Beteiligung bei Neoplasien, wie z.B. Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas<sup>34</sup>, nachvollziehbar machen, ist es bis dato unklar worin deren Funktion bei Virusinfektionen oder septischen Krankheitsverläufen in zellkernlosen Thrombozyten bestehen sollte.

## 1.6 NAP1L1 und virale Infektion

In humanen (kernhaltigen) U2OS-Zellen konnte gezeigt werden, dass NAP1L1 als humaner Co-faktor des HIV-transaktivator of transcription (HIV-tat) wirkt, indem es die Translokation von HIV-tat aus dem Zytoplasma in den Zellkern begünstigt<sup>35</sup>. Während einer Infektion mit humanen Papillomaviren, steigert NAP1L1 gemeinsam mit dem Interaktionspartner p300 (Co-Aktivator der Transkription) die Interaktion mit E2, einem viralen Protein, was die Effizienz der Transkription von viralen Genen steigert<sup>36</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NAP1 wie auch des funktionell ähnlichen TAF-1 $\beta$  *in vitro* zum Wiederaufflammen einer latenten EBV-Infektion führen kann, indem es die Expression des viralen Transkriptionsaktivators (BZLF1) steigert<sup>37</sup>. Es erscheint als wahrscheinlich das diese drei Virusentitäten, mit

der Fähigkeit zur ausgeprägten Latenz in der eukaryoten Zelle (HPV und EBV als nukleäres Episom, HIV-rtDNA wird in das Wirtsgenom integriert), NAP1/NAP1L1 nutzen um als integraler Teil der Transkriptionsmaschinerie der Zelle den viralen Lebenszyklus zu unterstützen.

Fest steht außerdem, dass im Rahmen einer Infektion mit dem Influenzasubtyp H1N1 die Thrombozytopenie ( $<150.000/\mu\text{l}$ ) einer, wenn nicht gar *der* prädiktive Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben intensivmedizinisch behandelter Patienten ist<sup>38</sup>. Dabei war die gesteigerte Mortalität in der Thrombozytopenie nicht auf eine erhöhte Rate an Blutungsereignissen zurückzuführen - es kam weder zu schweren Blutungsereignissen, noch waren Transfusionen notwendig. Stattdessen scheinen eine exzessive Thrombin- sowie Virus-Immunkomplex-vermittelte Plättchenaktivierung über Fc $\gamma$ RIIA die Hauptmechanismen zu sein<sup>39</sup>. *Post-mortem* wiesen an H1N1 verstorbene Patienten neben dem unspezifischen diffusen Alveolarschaden eine ungewöhnlich hohe Rate an pulmonalen Emboli und Thromboemboli auf. Ein deutliches Zeichen, dass eine Hyperaggregation und -adhäsion von aktivierten Thrombozyten mit Sequestration in der Lunge ursächlich für den Abfall der Plättchenkonzentration und die Lungenschädigung sein könnte<sup>40</sup>. In Thrombozyten von H1N1-infizierten Patienten wurden initial, im Vergleich zur bakteriellen Pneumonie, nochmals weiter erhöhte Aktivierungsmarker mittels FACS nachgewiesen, welche auch mit der Krankheitsschwere korrelierten<sup>41</sup>.

### 1.7 Bakterielle Infektion und ihr Einfluss auf Thrombozyten

Umfangreiche Störungen der Thrombozytenfunktion (vorwiegend der Aggregation) werden seit längerem auch in der Sepsis beschrieben, ohne dass jedoch jenseits der Vermutung der multifaktoriellen Genese (pH, Temperatur, medikamentös, hormonell und posttraumatisch) detailliertere Vorstellungen über die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse etabliert werden konnten. In aggregometrischen Untersuchungen fiel eine verringerte thrombozytäre Reaktion auf übliche Stimuli (ADP, Kollagen und Noradrenalin) im Rahmen eines durch Sepsis verkomplizierten intensivmedizinischen Krankheitsverlaufes auf. Diese Aggregationseinschränkung besaß einen prognostischen Wert: alle Patienten mit einer Maximalaggregation von unter 20% starben nach dem Beobachtungszeitraum von fünf Tagen<sup>42</sup>. Eine in der

Folge durchgeführte Studie zeigte demgegenüber eine verstärkte Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten (PAC-1-Bindung, Plättchen-Neutrophilen-Adhäsion) in Patienten mit Sepsis, und Sepsis mit Multiorganversagen (MOF/MODS), jedoch fand die Probenentnahme nur einmalig, bei Aufnahme in der Intensivstation statt und wurde im zeitlichen Verlauf nicht wiederholt<sup>43</sup>. Eine weitere Studie fand wiederum eine Verringerung der Aggregation (Stimuli: ADP, TRAP, Kollagen, TxA2 und Arachidonsäure), sowie der Aktivierbarkeit (PAC-1-Bindung nach Aktivierung per TRAP) in neu-diagnostizierter Sepsis gegenüber gesunden Vergleichsprobanden bei unveränderter Expression von Adhäsionsmolekülen und -rezeptoren (CD42a, CD42b, CD36, CD29, P-Selectin). Komplizierende Faktoren wie DIC oder Thrombozytopenie hatten keinen Einfluss auf die Ausprägung dieser Dysfunktion<sup>44</sup>. Aufgrund der prolongierten, aber reversiblen Funktionseinschränkung bei unveränderter Expression der thrombozytären Rezeptoren vermuteten die Autoren „downstream“-gelegene Ursachen (z.B. auch metabolischer Natur)<sup>45</sup>.

### **1.8 Bakterielle Infektion und ihr Einfluss auf den systemischen Stoffwechsel**

Parallel zu den thrombozytären Funktionsstörungen muss die Problematik der Regulation des intrazellulären Energiehaushaltes im Rahmen der systemischen Entzündungsantwort (SIRS), bzw. der Sepsis betrachtet werden. Während durch Katecholamine, Cortisol und Glukagon sowie vielfältige andere Einflussfaktoren (Zytokine etc.) eine Steigerung von Glykogenolyse und hepatischer Glukoneogenese sowie Lipolyse hervorgerufen wird, kommt es gleichzeitig zu einer Verminderung der allgemeinen Glukoseaufnahme in die Zelle (im Sinne einer Insulinresistenz, vergleichbar der des Diabetes mellitus Typ II) und so zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Gleichzeitig findet ein Laktatanstieg durch vermehrte anaerobe Glykolyse (welche im Rahmen des energieaufwendigen Cori-Zyklus in der Leber der Glukoneogenese zugeführt wird) und gesteigerten Proteinkatabolismus im Muskelgewebe statt<sup>46</sup>. Jedoch differiert der Umfang, mit dem diese zirkulierenden Metaboliten genutzt werden können zwischen den einzelnen Zelltypen und auch im Zeitverlauf der Erkrankung und des Intensivstationsaufenthaltes erheblich. Bekanntermaßen wird z.B. die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe durch

verminderten Einbau des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4 in die Zellmembran herabgesetzt<sup>47</sup>. Demgegenüber wird die Expression von GLUT1 z.B. über den HIF in den Endothelzellen der Bluthirnschranke gesteigert<sup>48</sup>.

Bei Betrachtung der metabolischen Gesamtsituation zeigt sich jedoch, dass nicht die Störung der Sauerstoff- und Substratversorgung des Gewebes allein der ausschlaggebende pathophysiologische Faktor im Verlauf der systemischen Entzündungsreaktion ist<sup>46</sup>. Trotz ausreichender Partialdrücke im Gewebe kann es beim septischen Patienten zu einem intrazellulären Sauerstoffminderverbrauch kommen - ein Zustand für den der Begriff der „zytopathischen Hypoxie“ geprägt wurde<sup>49-51</sup>. Dieser Verlust an Stoffwechsellage wird verschiedentlich als Ursache des MOF in der Sepsis angeschuldigt, im Sinne einer „Hibernation“ und der Beschränkung der Zelle auf einen Zustand des Minimalstoffwechsels mittels anaerober Glykolyse<sup>52</sup>. Obwohl die Herabsetzung der mitochondrialen ATP-Gewinnung (Oxidative Phosphorylierung) auch als Schädigung der Enzyme der Atmungskette durch anfallende ROS, wie z.B. freie Hydroxyl-Radikale oder Stickstoffmonoxid, mittels Überbeanspruchung enzymaler Kompensationsmechanismen (Superoxiddismutase, Glutathion etc.) verstanden werden kann<sup>53</sup>, zeigen verschiedene Untersuchungen, dass eine vielfältige aktive Regulation der beteiligten Proteine existiert. Diese Erkenntnisse betreffen die ganz grundsätzliche Frage, ob die Störung der intrazellulären Energiegewinnung während der SIRS/Sepsis, verbunden mit Dysfunktion bzw. Versagen von diversen Organfunktionen (MODS/MOF), Resultat einer *Schädigung aufgrund gesteigerter Anforderungen* an den Stoffwechsel ist, oder nicht eher eine vom Organismus *aktiv vorgenommene Suppression des Metabolismus* mit dem Ziel das Langzeitüberleben durch reduzierte Stoffwechsellage zu sichern<sup>46,54</sup>.

Die oben erwähnte Regulation der Proteinfunktion betrifft z.B. Komplexe der Atmungskette (ETC): *in vitro* Experimente im Tiermodell einer LPS-induzierten Entzündungsreaktion zeigten eine Aktivitätsreduktion des vierten Komplexes der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase) über eine Tyrosinphosphorylierung am katalytischen Zentrum des Enzyms nach Aktivierung des TNF $\alpha$ -Signalweges. Dies zieht eine Verringerung des Protonenflusses über die innere Mitochondrienmembran nach sich und schliesslich zu einer Depolarisierung des elektrochemischen MMP führt.



Ähnliche Regulationswege weiterer Bestandteile des ETC erscheinen nach Ansicht der Autoren wahrscheinlich, konnten aber noch nicht spezifisch nachgewiesen werden<sup>55</sup>.

Über einen anderen Regulationsweg ist hingegen mehr bekannt. In einem *in vivo* Experiment wurden junge, gesunde Probanden mit LPS behandelt, und die LPS-stimulierten Leukozyten zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und ihre mRNA-Expression per Microarray analysiert<sup>56</sup>. Dabei zeigten sich zwei große Änderungen: die Minderexpression von Genen der Translationsmaschinerie (z.B. „EIF-3-genes“ - darunter NAP1L4), und eine Reduktion der Transkripte weiterer Akteure des mitochondrialen Stoffwechsels. Neben den Komplexen I, III und V der ETC waren dies vor allem Bestandteile des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDC), darunter die Untereinheit E2 - Dihydrolipoyl-Transacetylase (DLAT). Dieser Multienzymkomplex gewährleistet die irreversible Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und stellt damit im Kohlenhydratstoffwechsel das unverzichtbare Bindeglied zwischen Glycolyse, Citratcyklus und der Oxidativen Phosphorylierung dar. Schlüssigerweise wurde die hemmend wirkende PDK gleichzeitig vermehrt exprimiert.

Auch wenn diese Ergebnisse erst noch auf Proteinebene nachgewiesen werden müssen, so zeigen sie doch, dass ein Wechsel von aerober hin zu anaerober Glykolyse im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion Teil eines definierten intrazellulären Programms, welches nach Stand der derzeit verfügbaren Daten, zumindest in einigen Zellentypen des menschlichen Körpers aktiv ist. In diesem Zusammenhang ist es lohnenswert zu spekulieren, ob diese Änderungen in Metabolismus und Proteinbiosynthese, die in schwer kranken septischen Patienten oft beobachtete leukozytäre Funktionseinschränkung, erklären kann<sup>56</sup>. Mit dem Wissen der veränderten Thrombozytenfunktion unter septischen Bedingungen, stellt sich weiterhin die Frage, ob diese metabolischen Veränderungen auch auf die Plättchen-Pathophysiologie übertragen werden können.

### **1.9 Verknüpfung von Metabolismus und Thrombozytenfunktion**

Die Messung der Änderungen des mitochondrialen Stoffwechsels in Thrombozyten im Zuge verschiedener pathologischer Zustände wird seit längerem als Modell zum

Rückschluss auf o.g. systemische Umstellungen verwendet. Gründe dafür sind zum einen die relativ einfache und nach Interventionen schnell wiederholbare Isolation der Organellen aus den Blutplättchen, sowie die im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen vereinfachte Gewinnung von mtDNA, z.B. zur Erstellung von zytoplasmatisch hybriden Zelllinien („Cybrids“). Als „Biomarker“ wurden bislang in neurologischen Erkrankungen (z.B. Morbus Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington) jeweils spezifische Muster von Einschränkungen der Atmungskette in Plättchen beobachtet, welche die metabolische Situation in den Zellen des Nervensystems widerspiegeln<sup>57–59</sup>. Im Fall von Trisomie 21 wurde außerdem eine reduzierte Aktivität der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase (IDH), eines Schlüsselenzyms des Citratzyklus, gefunden<sup>60</sup>. Verschiebungen in der Stoffwechselaktivität dieses Enzyms haben tiefeschürfende Änderungen in der Pyruvatverwertung und damit im Gleichgewicht von aerober zu anaerober Glykolyse zur Folge<sup>61</sup>.

Verschiebungen im mitochondrialen Stoffwechsel der Thrombozyten können jedoch auch die Thrombozytenfunktion und Thrombozytenzahl selbst modulieren. Ruhende Plättchen beziehen ihre Energie aus Glykolyse und Oxidativer Phosphorylierung - die Hemmung eines dieser Pfeiler führt zur Kompensation über den anderen („Pasteur-Effekt“) <sup>62</sup>. Die Stimulation des Thrombozyten mittels eines Agonisten (z.B. Thrombin) hat energieverbrauchende Prozesse zur Folge, welche dementsprechend ATP-Verbrauch und Sauerstoffaufnahme steigern<sup>63</sup>. Werden Thrombozyten in *in vitro* Experimenten Hemmstoffen der Atmungskette ausgesetzt, vermindert dies nachgewiesenermaßen Sekretion und Aggregation<sup>64</sup>. Metabolismus und Plättchenfunktion sind auch darüber hinaus verknüpft. Die in der ETC des Mitochondriums formierten ROS wirken als intrazelluläre Botenstoffe bei der kollagen-induzierten Aggregation<sup>65</sup>. Die Wahrscheinlichkeit der Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies orientiert sich dabei am MMP. Je stärker der Elektronenfluss durch die Atmungskette, desto hyperpolarisierter die Zellorganelle, desto mehr ROS-Formation<sup>66</sup>. „Gesunde“ Thrombozyten, welche *in vitro* erhöhten Glukosekonzentrationen ausgesetzt waren, zeigten dementsprechend erhöhte Aggregation nach Stimulation durch Kollagen bei erhöhten ROS-Konzentrationen und hyperpolarisierten MMP. Durch Zugabe des Entkopplers CCCP (führt zu einer

Oxidation ohne Generierung von ATP) sowie des Inhibitors TTFA der Atmungskette konnten MMP, ROS-Formation und Hyperaggregation wieder normalisiert werden<sup>67</sup>. Weiterhin konnte an Thrombozyten von Diabetes-mellitus-Typ-2-Erkrankten deutliche Zeichen erhöhten oxidativen Stresses nachgewiesen werden: Sauerstoffaufnahme und ATP-Synthese waren vermindert, mitochondriale Proteine vermehrt oxidiert und die Expression der SOD-2 gesteigert<sup>68</sup>.

Ein weiterer Weg, auf dem die Mitochondrien die thrombozytäre Funktion beeinflussen können, ist der intrinsische Weg der Apoptose über Cytochrom c, APAF-1 und Caspase 9 (das sog. „Apoptosom“) und damit die Regulation der Lebensspanne. Bekanntermaßen besitzt eine Vielzahl von Aktivatoren der zellulären Gerinnung (z.B. Thrombin, Noradrenalin, Kollagen u.a.) die Eigenschaft in höheren Konzentrationen auch zum vermehrten Untergang von Plättchen zu führen. Gemeinsames Merkmal dieser Agonisten ist, dass sie den Zusammenbruch von MMP induzieren, der Erstmanifestation der mitochondrial eingeleiteten Apoptose<sup>69</sup>. Tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass dafür auch in Thrombozyten die Formation der MPTP und ihre Regulation durch Cyclophilin D entscheidend ist<sup>70</sup>. Diese gesteigerten Apoptoseraten könnten nach Ansicht einiger Autoren zu Erscheinungen wie z.B. Thrombozytopenien im Rahmen von septischen Geschehen, mit teilweise extremer Thrombin-Formation, führen<sup>71</sup>.

Über gesteigerte Cytochrom-c-Generierung in den Plättchen septischer Patienten berichten auch Sjövall et al.<sup>72</sup>. Parallel beobachteten sie in diesen Zellen jedoch eine gesteigerte Gesamtrespirationsrate (Sauerstoffverbrauch pro Zeit und Thrombozyt), welche im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung kontinuierlich zunahm. Die Inkubation mit septischem Plasma führte außerdem zu einer gesteigerten Entkopplung, d.h. einer Oxidation ohne Generierung von ATP, zusätzlich zur ohnehin schon gesteigerten Respirationsrate. Dieser Effekt trat nicht bei Messungen unter Kontrollbedingungen auf. Die Autoren konnten im Gegensatz zu o.g. Studien in ihren Versuchen keine Hinweise auf die Inhibition von Komponenten der ETC, gesteigerte MPTP-Formation, vermehrte ROS-Formation oder auch erhöhter mitochondrialer Biogenese finden. Bemerkenswerterweise zeigten bei Betrachtung der Drei-Monats-Überlebensrate die verstorbenen Patienten gegenüber den Überlebenden eine

deutliche Steigerung der Respirationskapazität<sup>72</sup>. Eine Beobachtung, welche auf eine, in diesen Fällen, gescheiterte Hibernation der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen sein könnte.

Weiterhin geriet in letzter Zeit das MMP von Thrombozyten als prädiktiver Faktor für das Patientenüberleben in den Fokus der intensivmedizinischen Forschung<sup>73</sup>. FACS-basierte Erhebungen des MMP (mittels JC-1) an Thrombozyten aus Sepsis-Kohorten zeigten:

1. Die deutliche Korrelation der mitochondrialen Depolarisation mit der klinischen Erkrankungsschwere (anhand APACHE-II, SAPS-II und SOFA).
2. Die ausgeprägte Depolarisation in der Subgruppe „Schwere Sepsis“ (definiert durch MOF/MODS) gegenüber „Sepsis“ sowie Kontrollgruppe - ab Patientenaufnahme.
3. Die Wiederherstellung des MMP (ergo „Hyperpolarisierung“) in überlebenden Patienten mit „Schwerer Sepsis“.
4. Die Minderexpression von Bcl-xL, einem anti-apoptotischen Protein der intrinsischen Apoptosekaskade - ebenfalls ab Tag 1 der intensivmedizinischen Aufnahme.

Außerdem fiel auch hier eine signifikante Thrombozytopenie (98 000/ $\mu$ l) in schwererkrankten septischen Patienten auf, während die zirkulierenden Plättchen in den Gruppen „Sepsis“ und „Gesunde“ im Normbereich waren<sup>73</sup>.

### **1.10 Zusammenfassung**

Bisherige Daten weisen darauf hin, dass NAP1L1 (neben anderen Proteinen mit nukleärer Funktion) auch in Thrombozyten exprimiert sein könnte. Es ist gegenwärtig unklar, welche Rolle dieses Protein im Rahmen der Thrombozytenphysiologie spielt. Gleichwohl scheint es zumindest auf mRNA-Ebene im Vergleich zu anderen Zellen des menschlichen Körpers in gesteigerter Expression vorhanden zu sein. Zusätzlich machen die im Rahmen von Diabetes mellitus, bakterieller Sepsis und der viralen Infektion mit H1N1 erhobenen Transkriptomdaten eine reaktive Überexpression von NAP1L1 in Plättchen wahrscheinlich. Während die Thrombozyten aus H1N1- und Diabetes-Patienten erhöhte Aktivierungsmarker bzw. Hyperaggregation zeigen,

imponieren jene aus Sepsis-Patienten sowohl durch Hyper- als auch Hypoaggregation. Die im Verlauf der Infektion mit H1N1 beobachtete, gesteigerte Thrombozytenaggregation ist als Thrombin- und FcγRIIA-vermittelt zu betrachten. Ursache für die gleiche Erscheinung im Rahmen einer *in vitro* simulierten „diabetischen“ Stoffwechsellage ist die Modulation der kollagen-vermittelten Aggregation durch ROS bei hyperpolarisiertem MMP. Das septische Krankheitsgeschehen scheint mit einer vermehrten Atmungsketten-Entkopplung, depolarisiertem MMP und gesteigerter Apoptose-Rate der Thrombozyten einherzugehen. Parallel dazu werden in anderen Zellen des Körpers Bestandteile der ETC und vorgelagerter Stoffwechselwege komplex reguliert. Bei Zusammenschau der Vorerkenntnisse fällt auf, dass die Krankheitsbilder bei denen momentan eine Expressionssteigerung von NAP1L1 vermutet werden kann, mit umfangreichen metabolischen Verschiebungen auf mitochondrialer Ebene einhergehen.

### 1.11 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit soll es zuerst sein, mittels verschiedener molekularbiologischer und zellbiologischer Methoden humane Plättchen und ihre Vorläuferzellen auf das Vorkommen von NAP1L1, auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen. Weiterhin soll dessen Expression in bestimmten Krankheitszuständen überprüft werden.

Um eine Vorstellung über die Funktion von NAP1L1 in einer „kernlosen Zelle“ zu entwickeln, wird es außerdem notwendig sein mögliche *in vivo* Interaktionspartner im Plättchen aufzudecken. Diese Grundlagenforschung kann potenziell neue Wege für Diagnostik und Therapie derjenigen Erkrankungen eröffnen, an denen Thrombozyten pathophysiologisch beteiligt sind.

---

## 2 Material

### 2.1 Antikörper

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Monoclonal mouse Ab to NAP1L1 (ab58677)    | Abcam, Cambridge, UK                |
| Polyclonal rabbit Ab to NAP1L1 (ab33076)   | Abcam, Cambridge, UK                |
| Monoclonal mouse Ab to PDC-E2 (ab110333)   | Abcam, Cambridge, UK                |
| goat anti-mouse IgG (H+L) (G-21040)        | Life technologies, CA, USA          |
| goat anti-rabbit IgG (H+L) (G-21234)       | Life technologies, CA, USA          |
| mouse mAb to $\beta$ -Tubulin (T-5293)     | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE       |
| mouse mAb to $\beta$ -Actin (A5316)        | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE       |
| rabbit pAb to DLAT (ab66511)               | Abcam, Cambridge, UK                |
| Alexa Fluor® 488 goat Anti-mouse IgG (H+L) | Life technologies, CA, USA          |
| Alexa Fluor® 546 Phalloidin                | Life technologies, CA, USA          |
| Alexa Fluor® 680 WGA                       | Life technologies, CA, SA           |
| normal mouse IgG                           | Santa Cruz Biotechnologies, TX, USA |
| human NAP1L1 peptide (ab22418)             | Abcam, Cambridge, UK                |

### 2.2 Geräte

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| 2-Gel Tetra and Blotting Modul | Bio-Rad, CA, USA                       |
| AutoMACS® Pro                  | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Absaugsystem Vacusafe™         | Integra Bioscience, Bibertal, DE       |
| Analysewaage                   | Sartorius, Göttingen, DE               |
| CO <sub>2</sub> -Zellinkubator | Binder, Tuttlingen, DE                 |
| EVOS FLoid Bildgebungssystem   | Life technologies, CA, USA             |
| Hemocounter Sysmex K-4500      | Sysmex GmbH, DE                        |

---

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer   | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Metallthermostat                        | Fisher Scientific, MA, USA          |
| myECL™ -Imager                          | Fisher Scientific, MA, USA          |
| nanoACQUITY UPLC®                       | Waters™, MA, USA                    |
| PowerPac™ Basic Power Supply            | Bio-Rad, CA, USA                    |
| Owl™ EasyCast™ B2 System                | Fisher Scientific, MA, USA          |
| pH -Messkette                           | Schott Instruments, Mainz, DE       |
| Pipetten Research® plus                 | Eppendorf, Hamburg, DE              |
| Pipettierhilfe pipetus®                 | Hirschmann, Eberstadt, DE           |
| Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020       | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Spektrophotometer NanoDrop™             | PeqLab Biotechnologie, Erlangen, DE |
| Thermal Cycler Veriti™                  | Applied Biosystems, CA, USA         |
| Thermostat FB15101 Digital Dry Bath     | ThermoFisher, MA, USA               |
| Ultraschall-Wasserbad Sonorex DT 52 H   | Bandelin, Berlin, DE                |
| Vortexmischer Vortex-Genie®             | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Zentrifuge Cytospin™                    | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Zentrifuge Eppendorf™ 5424              | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Zentrifuge Eppendorf™ Minispin          | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Zentrifuge Eppendorf™ Concentrator Plus | Fisher Scientific, MA, USA          |
| Zentrifuge Rotanta RF 460               | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE |

### 2.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| Agarose UltraPure™ | ThermoFisher, MA, USA |
| MS-Micro-Vials     | VWR, PA, USA          |

---

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1,7 ml – low protein binding tubes | Sorenson Bioscience Inc, UT, USA       |
| 5 ml - Falcon™                     | ThermoFisher, MA, USA                  |
| 10 ml - Falcon™                    | ThermoFisher, MA, USA                  |
| 50 ml - Corning™ / Falcon™         | ThermoFisher, MA, USA                  |
| 2-Mercaptoethanol                  | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| 2-Propanol                         | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| Filterpapier Mini Trans-Blot®      | Bio-Rad, CA, USA                       |
| Acetonitril                        | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| Ammoniumbicarbonat                 | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| Albumin Fraktion V, endotoxinarm   | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| AutoMACS® Separation Columns       | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Agarose UltraPure™                 | Life technologies, CA, USA             |
| BenchMark™ Pre-Stained             | Life technologies, CA, USA             |
| Cytofunnel™                        | Fisher Scientific, MA, USA             |
| Chloroform                         | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| CHAPS                              | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| Citronensäure                      | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| Deckgläschen                       | Corning, New York, USA                 |
| DMSO                               | ATCC, Virginia, USA                    |
| dNTP Mix 10 mM                     | Life technologies, CA, USA             |
| DNA-Polymerase Taq                 | Life technologies, CA, USA             |
| Dynabeads™ Protein G               | ThermoFisher, MA, USA                  |
| EGTA                               | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |

---



---

|                                  |                               |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Ethanol 100% unvergällt          | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| Ethanol 70% unvergällt           | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| Essigsäure                       | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| Ficoll-Paque™ PLUS               | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Filter, Nylon, hydrophil, 30 µm  | Merck KGaA, Darmstadt, DE     |
| Formaldehyd                      | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Glucose                          | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Glycerol                         | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Glycin                           | Calbiochem, Darmstadt, DE     |
| HBSS                             | Life technologies, CA, USA    |
| Interleukin-3 (IL-3)             | Life technologies, CA, USA    |
| Pipettenspitzen Art™             | ThermoFisher, MA, USA         |
| Pipettenspitzen 200 µl           | Biozym, Oldendorf, DE         |
| Pipetten, serologisch            | Sarstedt, Nümbrecht, DE       |
| Pipetten zum Transfer LD-PE      | Sarstedt, Nümbrecht, DE       |
| Protein Gels 4–20% Mini-PROTEAN® | Bio-Rad, CA, USA              |
| Perfusor®-Spritzen (PP) 50 mL    | B.Braun Melsungen AG, DE      |
| KCl                              | Merck, Darmstadt, DE          |
| Kaliumhexacyanoferrat (III)      | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| Magic Mark™ XP Western Standard  | Life technologies, CA, USA    |
| Membran PVDF Whatman®            | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Methanol                         | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| 2-Mercaptoethanol                | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| MicroBead Kit CD34                | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| UltraPure                         | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Micro beads CD34, human           | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Micro beads CD45, human           | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Milchpulver                       | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| Mini-PROTEAN® TGX Precast 4-20%   | Bio-Rad, CA, USA                       |
| MgCl                              | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat       | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| NaCl                              | Carl Roth, Karlsruhe, DE               |
| di-Natriumhydrogenphosphat        | Merck, Darmstadt, DE                   |
| Natriumcitrat                     | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| Natriumthiosulfat                 | Merck, Darmstadt, DE                   |
| Natriumcarbonat                   | Merck Millipore, Darmstadt, DE         |
| Objekträger PEN 1.0               | Carl-Zeiss, Jena, DE                   |
| Prostaglandin E1                  | Cayman Chemical, Colorado, USA         |
| Reaktionsgefäße Eppendorf™        | Fisher Scientific, MA, USA             |
| Reaktionsgefäße PCR 0,5 mL        | Bio-Rad, CA, USA                       |
| Reaktionsgefäße RNase free 1,5 mL | Ambion, TX, USA                        |
| Ribonuclease-Inhibitor RNasin®    | Promega, Wisconsin, USA                |
| RNase ZAP™                        | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE          |
| Wasser, hochrein Milli-Q®         | Merck Millipore, Darmstadt, DE         |
| Wasser, Nuclease-frei             | Ambion, CA, USA                        |
| Western Blot Substrate Pierce™    | ThermoFisher, MA, USA                  |

---

|                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Western Blot Stripping Buffer         | ThermoFisher, MA, USA                 |
| Pierce Restore™                       | ThermoFisher, MA, USA                 |
| Medium M199                           | Lonza Group Ltd, Basel, CH            |
| Hematopoietic Media X-VIVO™           | Lonza Group Ltd, Basel, CH            |
| Oligo(dT)-Primer                      | Life technologies, CA, USA            |
| PIPES                                 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE         |
| PMSF                                  | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE         |
| PFA 4% in PBS                         | Morphisto, Frankfurt am Main, DE      |
| PVDF-Membran Whatman® 0,45µm          | Merck Millipore, Darmstadt, DE        |
| Proteasen-Inhibitor Halt™             | Life technologies, CA, USA            |
| RNaseOUT™                             | ThermoFisher, MA, USA                 |
| Salzlösung, Phosphat gepuffert 10x    | Merck Millipore, Darmstadt, DE        |
| Serum (10% normal goat serum)         | Life technologies, CA, USA            |
| SDS                                   | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE         |
| Silbernitrat                          | AppliChem GmbH, Darmstadt, DE         |
| SuperSignal™ West Substrate           | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| SuperScript™ II Reverse Transcriptase | Life technologies, CA, USA            |
| SYBR™ Safe DNA Gel stain              | Life technologies, CA, USA            |
| SCF                                   | Life technologies, CA, USA            |
| TAE 10x                               | Life technologies, CA, USA            |
| Taq DNA Polymerase                    | ThermoFisher, MA, USA                 |
| TPO                                   | ThermoFisher, MA, USA                 |
| TrackIt™ 100 bp DNA ladder            | Life technologies, CA, USA            |

---

|                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| TrackIt™ Cyan/Yellow Loading Buffer | Life technologies, CA, USA    |
| Tris HCl                            | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Trizma® Tris Base                   | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Triton™ X-100                       | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| TRIZOL™                             | Life technologies, CA, USA    |
| TrackIt™ 100 bp DNA Ladder          | Life technologies, CA, USA    |
| Trypsin V5111, seq-Grade            | Promega, Walldorf, DE         |
| TURBO™ DNA-free™ Kit                | ThermoFisher, MA, USA         |
| Tween®                              | Carl Roth, Karlsruhe, DE      |
| Triton-X                            | Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE |
| Universal Magnetic Co-IP Kit        | Acitiv Motif, CA, USA         |
| Wasser, ultrarein ULTREX®           | VWR, Pennsylvania, USA        |
| Zellkulturflaschen                  | BD, New Jersey, USA           |
| Zellfixierungslösung CellFIX™ 10x   | BD, New Jersey, USA           |

---

## 2.4 Puffer

### Acid-Citrat-Dextrose-Lösung (ACD) 14%-ig (v/v), pH 5,1

|       |  |
|-------|--|
| 8g    | Citronensäure                            |
| 22,5g | Natriumcitrat                            |
| 2g    | Glucose                                  |
|       | + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 1 Liter |

### PIPES, Saline, Glucose (PSG), pH 6,8

|         |  |
|---------|--|
| 3,464g  | Peperazin 1,4 ethansulfonsäure (5 mM, PIPES) |
| 17g     | NaCl (145 mM)                                |
| 0,6g    | KCl (4 mM)                                   |
| 0,0142g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 µM)     |
| 0,4g    | MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (1 mM)  |
| 2g      | Glucose (5,5 mM)                             |
|         | + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 2 Liter     |

### Phosphate-buffered Saline (PBS), pH 7,4

|       |  |
|-------|--|
| 8g    | NaCl                                       |
| 0,2g  | KCl  |
| 1,15g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>           |
| 0.2g  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>            |
|       | + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 0,8 Liter |
|       | + HCl zu PH 7,4                            |

CD34+ Laufpuffer für MACS, pH 7,2

986ml      PBS  
4ml        EDTA (0,5 M pH 8)  
5g         Album Fraktion V

Tris-acetat (TAE) -Puffer,

4,84g      Tris  
2ml        EDTA (0,5 M pH 8)  
1,14ml    Essigsäure  
            + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 2 Liter

Tris-buffered Saline (TBS)-Puffer, pH 7,4

2,4g        Tris Base (20mM Tris)  
8,76g      NaCl (150mM NaCl)  
            + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 1 Liter

Tris-Glycin-Laufpuffer, pH 8,3

3,03g      Tris Base  
14,4g      Glycin  
1,0g        SDS  
            + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 1 Liter

Tris-Glycin-Transferpuffer, pH 8,6

3,03 g      Trizma® base  
14,4 g      Glycin  
1,0 g        SDS  
            + Wasser, hochrein (Milli-Q®) zu 1 Liter  
            + 20% Methanol vor Benutzung hinzufügen

TBS-Tween Western Blot Blockinglösung

1l            TBS  
0,5ml       Tween 20 (0,05%, v/v)  
25g         Milchpulver (2,5%, w/v)

TBS-Tween Western Blot Waschlösung

1l            TBS  
0,5ml       Tween 20 (0,05%, v/v)

## 2.5 Software

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| SEQUEST®     | Thermo Scientific, MA, USA     |
| Scaffold     | Proteome Software, Oregon, USA |
| PRIMER BLAST | NCBI, Maryland, USA            |
| ImageJ 1.38  | NIH, Maryland, USA             |
| GraphPad     | GraphPad Software, CA, USA     |

### 3 Methoden

#### 3.1 Thrombozyten-Isolation (PRP-Methode)

Für die Gewinnung von Thrombozyten aus PRP wurden jungen, gesunden Spendern (männlich/weiblich) je 100 bis 250 ml venöses Vollblut nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung übereinstimmend der Deklaration von Helsinki<sup>74</sup> entnommen. Die wissenschaftlichen Untersuchungen wurden von den Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultäten der Universität Greifswald und der University of Utah in Salt Lake City genehmigt.

Das Vollblut wurde in 50 ml PP-Perfusorspritzen aufgenommen und die sofortige Gerinnungshemmung erfolgte mit 14%-iger (v/v) ACD-Lösung<sup>75</sup> in Raumtemperatur (21°C). Nach Umfüllung in 50ml PP-Zentrifugenröhrchen unter den sterilen Bedingungen einer Reinraumwerkbank erfolgte die erste Zentrifugation („soft spin“) mit 150 x g für 20 Minuten bei 22°C ohne Abbremsen. Die Dichteunterschiede der Blutbestandteile bewirkten die Auftrennung in Erythrozyten am Boden des Reaktionsgefäßes, ein mit Thrombozyten angereichertes Plasma oberhalb (PRP) und eine Leukozyten-reiche Schicht („buffy coat“) dazwischen. Das PRP wird daraufhin ohne die Erzeugung von Turbulenzen und unter wiederum sterilen Bedingungen vorsichtig abpipettiert und der Rest des Blutes verworfen. Zur Minimierung einer Autoaktivierung wurden nun 10 µl Prostaglandin E<sub>1</sub> je 50 ml PRP zugegeben<sup>62,76</sup>. Danach erfolgte die zweite Zentrifugation („hard spin“) mit 475 x g für 20 Minuten bei 22°C ohne Abbremsen zur Herstellung eines Thrombozyten-Pellets. Darauf folgte die Entfernung des Überstandes und eine Resuspension der Plättchen in 10 ml warmen (37°C) PSG unter erneuter Zugabe von 10 µl PGE<sub>1</sub> sowie wiederum unter Reinraumbedingungen.

#### 3.2 Thrombozyten-Aufreinigung (MACS)

Für die definitive Aufreinigung des Plättchenisolates<sup>77</sup> wurde die MACS-Methode genutzt<sup>78</sup>. Um die *in-vitro*-Aktivierung von Thrombozyten durch Selektion über für sie spezifischen Antigene wie z.B. CD61 zu vermeiden, wurden stattdessen kernhaltige Zellen über den Oberflächenmarker CD45 markiert und nachfolgend depletiert („no-



touch“-Technik)<sup>79,80</sup>. Die Markierung wurde mit anti-CD45 beschichteten Microbeads bewerkstelligt, je 3 µl Microbeads pro Milliliter initial gewonnenen PRPs<sup>77</sup>. Die Inkubation der Beads mit der PSG-Thrombozyten-Suspension fand bei Raumtemperatur und leichter Rotation für 20 Minuten statt. Nach der magnetischen Depletion der markierten kernhaltigen Zellen mit dem autoMACS®Pro Separator und Zugabe von zusätzlichen 10µl PGE<sub>1</sub> wurde eine weitere Zentrifugation mit 475 x g für 20 Minuten bei 22°C zur erneuten Pelletierung der Thrombozyten vorgenommen. Danach wurde der Überstand (PSG) verworfen, und die Plättchen in eine Suspension in 10 ml Medium M199 überführt.

Zur Konzentrationsbestimmung der Plättchen nach dem Prinzip der elektronischen Impedanzmessung („coulter principle“)<sup>81</sup> wurden jeweils 100 µl M199-Suspension für die Messung im Sysmex Hemocounter entnommen. Daraufhin erfolgte je nach Fragestellung die Verdünnung auf  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^7$  Plättchen pro mL M199-Medium und die Lagerung im Zellkulturschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C oder die sofortige Weiterverwendung.

### **3.3 Isolierung kernhaltiger Zellen aus UCB (Ficoll-Paque-Methode)**

Nachgeburtlich wurde das Nabelschnurblut mehrerer junger, gesunder Spenderinnen nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung entnommen und mit ACD antikoaguliert. Nach Aufteilung in 50mL-Röhrchen (15 mL Blut/Röhrchen) wurde das antikoagulierte Blut 1:1 mit MACS-Laufpuffer verdünnt. Danach erfolgte die Gabe von 15ml Ficoll-Paque™ in die Lösung. Nach der ersten Zentrifugation mit 400 x g für 30 Minuten bei 22°C ohne Abbremsen bildete sich eine mononukleäre Zellschicht, welche vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieses Gemisch kernhaltiger Zellen wurde erneut mit MACS-Laufpuffer versetzt (50mL). Danach erfolgte die zweite Zentrifugation mit 625 x g für 10 Minuten bei 22° C ohne Abbremsen. Der Überstand wurde abpipettiert und übrig gebliebene Pellet erneut gelöst (in 5 mL Laufpuffer).

### **3.4 CD34<sup>+</sup>-HSC-Aufreinigung (MACS) und Kultivierung**

Für die letztendliche Aufreinigung der CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgte die Inkubation des o.g. Zellgemisches mit je 300 µL einer FcR-Blocking-Reagens und den CD34-MicroBeads

bei 4°C für 30 Minuten. Danach wurden überschüssige MicroBeads entfernt, indem die Probe erneut mit 50mL Laufpuffer versetzt und bei 22° C für 10 Minuten und 625x g ohne Abbremsen zentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die erneute Lösung der Zellen in 3 mL Laufpuffer, diese wurden gefiltert (30 µm) und dabei in ein 15 ml Röhrchen überführt. Über den autoMACS®Pro Separator wurden die CD34<sup>+</sup>-markierten Zellen zweimalig positiv selektioniert und danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die hematopoietischen Progenitorzellen (HPC) in X-VIVO™ Medium mit Stammzellfaktoren gelöst (1 ml mit je 0,4 µl SCF, 0,5 µl TPO, 1,0 µl IL-3). Für die weitere Kultivierung wurde das Gemisch auf eine 24-well-Platte gegeben und inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 14 Tagen differenziert, die Gabe von IL-3 erfolgte bis zum fünften Tag.

### 3.5 RNA-Isolation

Zur Gewinnung von RNA aus Thrombozyten bzw. CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde die 1987 zuerst von Chomczynski und Sacchi beschriebene saure Guanidiniumthiocyanat–Phenol–Chloroform (AGPC) Extraktionsmethode<sup>82,83</sup> mit geringfügigen Modifikationen genutzt.

Je 1x 10<sup>9</sup> der aus dem venösen Vollblut gesunder Probanden gewonnenen Plättchen wurden bei 4 Minuten, 22°C und 13 000 x g aus dem Medium abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes, wurde jedes Pellet mit 1ml einer Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (TRIzol™) bis zur vollständigen Homogenisierung der Lösung lysiert. Diese Proben wurden bei -80°C für maximal einen Monat bis zur eigentlichen Isolation aufbewahrt.

Nach dem Auftauen wurde die gelagerte TRIzol™-Lösung bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten inkubiert und danach mit je 0,2 ml Chloroform versetzt. Die Proben wurden für 30 Sekunden manuell geschüttelt, gefolgt von einem weiteren Inkubationsschritt bei 21°C für drei Minuten. Darauf wurde für 15 Minuten bei 5°C und 12 000 x g bis zur Phasenaufftrennung zentrifugiert. Nach Auftrennung in eine obere, wässrige Phase (RNA), eine untere organische Phenol- und Chloroform-Phase (DNA und Proteine) sowie eine weiße Interphase wurde die obere Phase vorsichtig

abpipettiert und in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung der RNA wurden je 0,5 ml 2-Propanol zur wässrigen RNA-Lösung zugegeben und durch manuelles Invertieren vermischt. Danach wurde wiederum bei 21°C für zehn Minuten inkubiert und bei 5°C, 10 Minuten und 12 000 x g abzentrifugiert. Als Resultat der Löslichkeitsverringung der Nucleinsäurekomponente im Gemisch bildete sich ein weißes RNA-Pellet an der Seite des Reaktionsgefäßes.

Nach der vorsichtigen Entfernung des Überstandes erfolgte die Zugabe von 1 ml 75%-iger Ethanol Lösung. Danach wurde mit Vortexer gemischt und zweimalig für fünf Minuten bei 5°C und 7500 x g zentrifugiert, um das RNA-Pellet von Guanidiniumthiocyanat-Rückständen zu befreien. Die Ethanol-Lösung wurde dann entfernt und die RNA bei Raumluft bis zur Transparenz des Pellet getrocknet (nach ca. 10 Minuten). Ab hier wurden alle weiteren Reaktionsschritte bei 0°C auf Eis durchgeführt. Das RNA-Pellet wurde in je 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für zehn Minuten auf Eis belassen. Nach der spektrophotometrischen Analyse der Proben bei Wellenlängen von 260 bzw. 280 nm zur Bestimmung ihres RNA-Gehalts (NanoDrop 1000) wurden diese bei -80°C eingefroren.

### 3.5.1 DNase-Behandlung von isolierter RNA

Aus CD34<sup>+</sup>-Zellen isolierte RNA, wie auch Thrombozyten-RNA, wurde zusätzlich mit DNase behandelt, um eine eventuelle Kontamination von Downstream-Anwendungen (z.B. RT-PCR) durch gDNA auszuschließen. Hierfür wurde das TURBO-DNA-free™-Kit mit einem rekombinanten DNase I-Derivat genutzt. Die Proben wurden aus der Lagerung bei -80°C genommen, auf Eis gelagert und zu einer vom Hersteller vorgegebenen Konzentration von 10 µg Nucleinsäure/ 50 µl Reaktionsvolumen mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe des DNase-Puffers und der TURBO™-DNase. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 5 µl eines Kationenchelatorgemischs (TURBO™-DNase Inactivation Agent) zum Abstoppen hinzugegeben und für 5 min bei RT unter ständiger Durchmischung belassen. Um diesen Inaktivator wieder aus dem RNA-Gemisch zu entfernen, wurde nachfolgend für 1,5 min bei 10,000 x g zentrifugiert der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die so behandelte RNA wurde entweder auf Eis sofort weiterverwendet oder wiederum bei -80°C eingelagert. Vor

Durchführung von RT-PCR-Experimenten wurde die Herstellerangabe beachtet, dass die DNase behandelte RNA nicht mehr als 40% Volumenanteil (8 µl) des RT-PCR-Reaktionsgemisches ausmachen sollte, um den Ablauf der RT- bzw. Polymerase-Reaktion nicht durch potenzielle Chelatorenreste zu gefährden.

### 3.6 RT-PCR und Primer

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA mittels einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase)<sup>84–86</sup> kombiniert mit den Vorteilen der Polymerase-Kettenreaktion<sup>87–89</sup>, ermöglicht es RNA hochsensitiv nachzuweisen und zu analysieren (RT-PCR). In Empfindlichkeit und Schnelligkeit ist diese RNA-Analysemethode anderen, wie z.B. Northern Blot oder In-situ-Hybridisierung weit überlegen – theoretisch ist der Nachweis von bis zu einer einzigen, ursprünglichen RNA-Kopie möglich<sup>90,91</sup>. Praktisch kann mit der in dieser Arbeit verwendeten Reversen Transkriptase eine untere Nachweisgrenze von etwa 1000 RNA-Kopien erreicht werden<sup>92</sup>.

Reverse-Transkriptase-Schritt und Amplifikations-Schritt wurden zweistufig („two-step“) in getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dadurch können für beide Enzyme optimale Reaktionsbedingungen gewährleistet werden. Als Reverse Transkriptase (RT) wurde SuperScriptII™ verwendet. Es handelt sich hierbei um eine rekombinant hergestellte und gentechnisch veränderte RT des M-MLV<sup>93</sup>.

Die isolierte RNA wurde nach NanoDrop™ -Messung auf 1 µg/ml normalisiert. Für je 1 µg isolierte RNA wurden unter Verwendung eines Master-Mix pro Reaktionsgefäß zunächst je 1 µl Desoxy-Nukleosidtriphosphat-Mix und 1 µl oligo-Desoxythymidin-Primer zugesetzt und mit Nuclease-freiem Wasser zu 12 µl aufgefüllt. Die Hybridisierung des oligo-dT-Primers am poly-Adenosin-Nucleotid-Schwanz (poly-A-Schwanz) erfolgte bei 65°C für 5 Minuten, danach wurde eine fünfminütige Inkubation auf Eis durchgeführt.

Unter Verwendung eines zweiten Master-Mix wurde dann die cDNA-Synthese gestartet. Hierbei wurden pro Reaktionsgefäß je 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl RNaseOUT und 1 µl SuperScript-II-RT eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 50 Minuten bei 42°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten RT, danach wurde

die Reaktion mit einem Denaturierungsschritt von zehn Minuten bei 70°C beendet. Die resultierende cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren und stand nun einer sequenzspezifischen Amplifikation per PCR zur Verfügung.

Diese erfolgte mit einer rekombinanten Taq-DNA-Polymerase (Taq-Pol), ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammend<sup>94</sup>. Für jeden Reaktionsansatz wurden je 17,1 µl Nuklease-freies Wasser, 2,5 µl 10x PCR-Puffer (ohne Mg<sup>2+</sup>), 0,75 µl 50mM MgCl, 0,5 µl 10mM dNTP-Mix, je 1 µl forward/reverse-Primer in einer Verdünnung von 10 µM und 0,15 µl Taq-Pol sowie 2 µl cDNA verwendet.

Die sequenzspezifischen Primer wurden mit Hilfe des Primer-BLAST-Algorithmus (NCBI) entworfen<sup>95-97</sup>.

### **NAP1L1-Primer-Paar-No. I:**

|                     |                             |
|---------------------|-----------------------------|
| NAP1L1_1012_forward | AGT GAA GTT CTC AGA TGC TGG |
| NAP1L1_1259_reverse | CAC GTC CCT TGT GTT TCT GC  |

### **NAP1L1-Primer-Paar-No. II:**

|                     |                               |
|---------------------|-------------------------------|
| NAP1L1_460_forward  | AGT CGC CGA TAT TTG GAG TTC T |
| NAP1L1_1047_reverse | TCC TGA ACC ATA TCA CTG AGC A |

### **β2-Mikroglobulin (B2M)-Ladungskontrolle**

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| B2M_34_forward  | AGC TGA CAG CAT TCG GGC       |
| B2M_333_reverse | GTG GGG GTG AAT TCA GTG TAG T |

Nach Lösung der gefriergetrockneten Primer in 300 µl Nuclease-freiem Wasser und spektrophotometrischer Absorptionsmessung bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrop 1000, erfolgte die Kalkulation der Molarität mittels OligoCalc-Software und Verdünnung auf 10µM<sup>98,99</sup>. Für die PCR-Schritte wurde der Veriti 60-well Thermal Cycler genutzt.

Je nach Primerpaar und kalkuliertem(n) Amplifikationsprodukt(en) mit folgender Temperaturabfolge:

### **NAP1L1-Referenz-PCR (Nr. I):**

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 2min  | 94°C                     |
| 30sec | 94°C                     |
| 30sec | <b>60°C</b>   <u>30x</u> |
| 45sec | 72°C                     |
| 10min | 72°C                     |
| ∞min  | 4°C                      |

### **NAP1L1-Alternativ-Transkripte-PCR (Nr. II):**

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 2min  | 94°C                     |
| 30sec | 94°C                     |
| 30sec | <b>58°C</b>   <u>35x</u> |
| 45sec | 72°C                     |
| 10min | 72°C                     |
| ∞min  | 4°C                      |

### **B2M-Ladungskontrolle-PCR:**

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 2min  | 94°C                     |
| 30sec | 95°C                     |
| 30sec | <b>57°C</b>   <u>30x</u> |
| 30sec | 72°C                     |
| 10min | 72°C                     |
| ∞ min | 4°C                      |

### 3.6.1 Agarosegel-Auftrennung und Analyse

Nach dieser Amplifikation und dem Abstoppen bei 4°C auf Eis, erfolgt die Aufnahme der Proben (je 25 µl) in 5 µl sechsfach konzentriertem TrackIt™ Cyan/Yellow Loading Buffer.

Die Analyse der Produkte gelang auf dem Weg der klassischen Agarose-Zonen-Gelelektrophorese in einem TAE-Puffersystem (Owl B2 Mini-Gel-Cast) <sup>100,101</sup>.

Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 100V und einer je nach gewünschter Auflösung variierenden Agarosekonzentration (1,5-4%, UltraPure™ Agarose). Zur Färbung wurde anstatt des Ethidiumbromid der ursprünglichen Methode ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff aus der Gruppe der Cyanine verwendet (SYBR™ Safe). Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das myECL-Imager-System mit einer CCD-Kamera und einer UV-Lichtquelle (306 nm) verwendet. Als Kontrollen zum Ausschluss endogener und/ oder exogener genomischer DNA-Kontamination (gDNA) sowie von Querkontaminationen durch bereits amplifizierte cDNA wurden für den RT-Schritt eine „non-enzymatic-control“ (NEC-RT) sowie eine „no-template-control“ (NTC-RT) verwendet, d.h. Reverse Transkriptase und RNA wurden jeweils in einem parallelen Reaktionsansatz durch das gleiche Volumen Nuclease-freies Wasser ersetzt und mit den anderen Proben mitgeführt. Zusätzlich wurde in den PCR-Schritt eine „no-template-control“ (NTC-PCR) implementiert, bei dem wiederum statt 2µl cDNA Nuclease-freies Wasser verwendet wurde<sup>102</sup>.

### 3.7 SDS-PAGE und Western Blot

Nach der bereits geschilderten Thrombozyten-Isolation (s. Kapitel 3.1) und der Normalisierung der Thrombozytenzahl auf  $1 \times 10^8$  bzw.  $1 \times 10^9$  Plättchen pro mL Medium (M199) wurde der Überstand entfernt und das verbliebene Pellet mit je 100 µl Tris-HCl-SDS (nach *Laemmli*) /  $1 \times 10^9$  Plättchen oder je 100µl RIPA/  $1 \times 10^9$  Plättchen und einem Protease-Inhibitor-Gemisch (Halt™) bei RT vollständig homogenisiert und dann bei -80°C eingefroren.

Am nächsten Tag erfolgte eine Ultraschallbehandlung für 5 Minuten bei 240W, 35kHz und 4°C im Wasserbad, danach wurden je 50 µl Proteinlysate mit 5% (v/v) β-ME versetzt, die anderen 50 µl nicht-reduziert belassen. Wiederrum wurde bei -80°C

eingefroren. Für die Denaturierung des Proteingemisches wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Je Probe wurden  $1 \times 10^8$  Plättchenlysate (5 µl) in 20 µl Tris-HCL-SDS Probenpuffer gegeben. RIPA-Zelllysate wurde wie o.g. in SDS denaturiert. Nachfolgend wurde mit Hilfe der DISC-PAGE, nach Molekülradius aufgetrennt<sup>103–107</sup>.

Es wurden vorgefertigte 4-20% Gradientengele (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast 4-20%) mit einem Tris-HCl-SDS-Probenpuffer (nach *Laemmli*) und einem Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer verwendet. Als MW-Standard wurde MagicMark™ XP Standard genutzt.

Nach Elektrophorese für eine Stunde bei 100V, wurden die Gele entnommen um die Protein-Auftrennung mit dem myECL-Imager-System unter UV-Beleuchtung (306 nm) zu dokumentieren<sup>108</sup>. Alternativ erfolgte die Färbung der Gele mit entweder MS-kompatibler-Silberfärbung (s. Kap. 3.9.1) oder Coomassie-Färbung<sup>109</sup>.

Nach erfolgter SDS-PAGE Protein-Auftrennung erfolgte die Aktivierung der PVDF-Blotting-Membran mit Methanol für zwei Minuten, gefolgt von der Äquibrillierung von Gel und Membran in Western-Transferpuffer für fünf Minuten. Die Proteinübertragung per Western-Blot gelang bei 100V für 75 Minuten im Mini-Protean-3-System in Tris-Glycin-Transferpuffer (nach *Towbin*)<sup>110</sup>, gefolgt von einer erneuten Bildgebung im myECL®-System um die Effektivität des Transfers auf die Membran zu überprüfen.

Nach dieser Kontrolle wurde die geblottete PVDF-Membran bei 4°C schüttelnd für vier Stunden in einer TBS-Tween-Blocking-Lösung (TBS-T, 0,05%) zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen belassen. Zum immunologischen Nachweis der Zielproteine wurden die primären Antikörper z.B. gegen NAP1L1 nach dem Waschen der Membran im Verhältnis 1:1000 in die o.g. Blocking-Lösung gegeben und über Nacht (12-14h) inkubiert. Danach wurde die Membran jeweils dreimal für 20 Minuten erneut in Blocking-Lösung gewaschen. Als Sekundärantikörper dienten HRP-konjugierte Antikörper gegen IgG-Fc der Hostspezies des Primärantikörpers: goat anti-mouse IgG (Heavy + Light Chain/ H+L) bzw. goat anti-rabbit IgG (H+L) in einem Gemisch von 1:5000. Die Membran wurde für zwei Stunden bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert. Auch danach schlossen sich in der Folge mehrere



Waschschritte an (3x kurz in Blocking-Lösung, 1x 30 Minuten in TBS-T (0,05%) und 3x 10 Minuten TBS).

Für die Nachweisreaktion wurde Pierce ECL Western Blotting Substrate den Herstellerangaben folgend verwendet. Die Membran wurde mit einem CCD-System (myECL-Imager) ohne AGC und im Interactive Chemi Modus zur Verhinderung einer Überbelichtung dokumentiert.

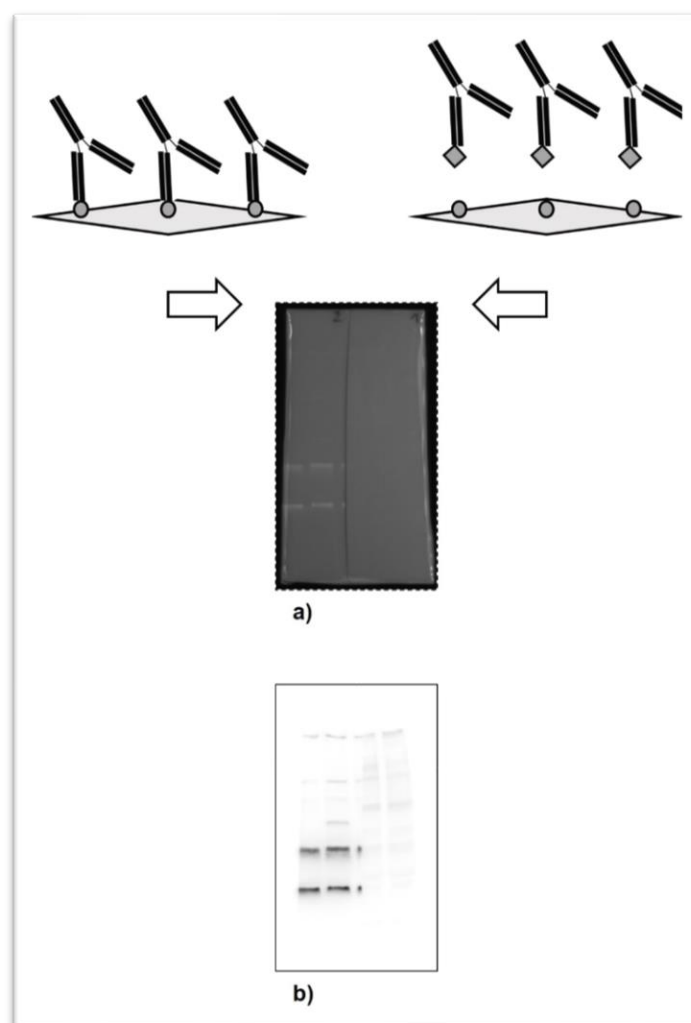
Für den Nachweis von Ladungskontrollen auf der gleichen Membran erfolgte die Entfernung gebundenen Antikörper mit Western Blot Stripping Buffer nach Herstellerprotokoll, woraufhin die Membran für eine erneute Antikörper-vermittelte Proteindetektion verwendet werden kann.

### 3.7.1 Semiquantitative Western-Blots und Ladungskontrollen

Die dokumentierten Western-Blot Membranen wurden mittels semiautomatisierter Bildanalysen unter Verwendung von ImageJ 1.38 analysiert. Die optische Dichte der detektierten Proteinbanden wurde densitometrisch erhoben, und in mathematischer Form als „area under the curve“ (AUC) ausgedrückt. Die vergleichend statistischen Auswertung erfolgten mittels GraphPad<sup>111</sup>.

### 3.7.2 Peptide Competition Assay (PCA)

Zum Nachweis der Spezifität der Immunodetektion wurde der primäre polyklonale Antikörper gegen NAP1L1 vor der Inkubation mit der PVDF-Membran mit 40 µg seines immunogenen Peptides (human NAP1L1 peptide) oder dem äquivalenten Volumen ohne Peptid für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde eine Membran eines angefertigten identischen Membranpaares mit Antikörper und die andere mit Antikörper/Peptid-Gemisch inkubiert (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Prinzip des Peptide Competition Assay

NAP1L1-WB desselben Thrombozyten-Spenders inkubiert mit pAb gegen NAP1L1 (linke Seite) und mit pAb gegen NAP1L1/NAP1L1-Peptid. *a)* PVDF-Membran-Paar, *b)* pAb gegen NAP1L1 auf beiden Membranen, rechts mit Peptid, links ohne das Antikörper-blockierende Peptid.

---

### 3.8 Native Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Thrombozyten für die Co-IP-Experimente wurden auf die bereits beschriebene Art und Weise isoliert und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  pro mL Medium (M199) verdünnt. Für die folgenden Co-IP-Experimente wurde das Universal Magnetic Co-IP Kit mit modifizierten Beads genutzt<sup>112</sup>.

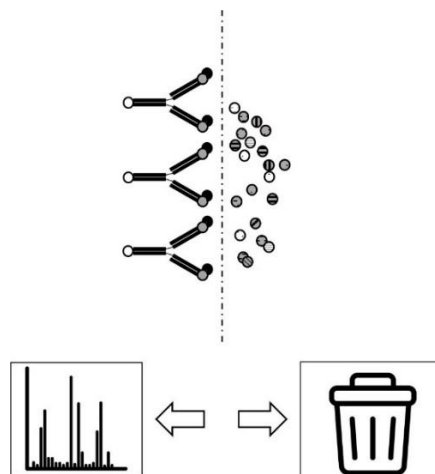
Das Zellkulturmedium wurde nach o.g. Zentrifugation abgenommen und das entstandene Pellet in vier Milliliter eines 4°C kalten PBS/Inhibitor-Mix (inkl. Deacetylase-Inhibitor 1% v/v, Phosphatase-Inhibitor 0.05% v/v) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation mit 4600 x g für 10 Minuten bei 21°C ohne Abbremsen wurde der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis behalten.

Für die Proteinextraktion wurde das Pellet in je 300 µl Lysepuffer pro  $1 \times 10^8$  Plättchen bei 4°C auf Eis bis zur völligen Homogenisierung gemischt, für je 10 s auf dem Vortexer geschüttelt und daraufhin für 30 min belassen. Um einer Proteolyse während dieser Zeit entgegenzuwirken, wurde auch der Lysepuffer mit einem Kit-eigenen Inhibitorgemisch nach Herstellerangaben versetzt (Deacetylase-Inhibitor 1% v/v, Phosphatase-Inhibitor 5% v/v, PMSF 0,5% v/v, Protease Inhibitor Cocktail 0.5% v/v) und der Reaktionsansatz auf Eis gelagert. Nach Ablauf der 30 Minuten, wurde erneut auf dem Vortexer für 10 s gemischt und im nächsten Schritt bei 20,000 x g für 10min zentrifugiert, um grobe Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und entweder bei 80°C gelagert oder sofort der Immunopräzipitation zugeführt. Alle weiteren Co-IP-Schritte wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden je 50 µl Protein G Beads in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit Magnet fixiert, das Lösungsmittel entfernt und die Beads zweimal mit je 200 µl PBS mit 0.02% (v/v) Tween-20 gewaschen. Daraufhin wurden die ebenfalls in je 200 µl PBS mit 0.02% (v/v) Tween-20 gelösten Pulldown-Antikörper zu den Beads hinzugefügt (spezifisch: 7.5 µg murine mAb gegen NAP1L1, unspezifisch: 7.5 µg IgG-Gemisch aus der Maus) und zur Bindung der Antikörper durch die Protein G Beads für 30min unter langsamer Rotation belassen. Nun wurden die Beads-Antikörper-Komplexe per Magnet fixiert, der Überstand entfernt und wiederum mit PBS/Tween gewaschen. Die bead-gekoppelten Antikörper wurden bis zum eigentlichen Pulldown bei 4°C auf Eis gelagert.

Vom vorbehandelten Plättchenlysat wurden 180 µl per Präzipitationsreaktionsansatz bei 4°C entnommen (ca.  $6 \times 10^8$  Thrombozyten), in ein gekühltes Reaktionsgefäß gegeben und mit ebenfalls gekühltem kit-eigenen Co-IP-Puffer (50mM NaCl, 0.1% IGEPAL CA-630, Deacetylase-Inhibitor 1% v/v, Phosphatase-Inhibitor 5% v/v, PMSF 0,5% v/v, Protease Inhibitor Cocktail 0.5% v/v) auf 500 µl aufgefüllt und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Danach wurden die gekoppelten Antikörper wieder per Magnet fixiert, der Überstand entfernt und stattdessen das Proteingemisch in Co-IP-Puffer hinzugegeben. Nach wiederrum vorsichtiger Durchmischung wurde der Ansatz unter Rotation bei 4°C für 4h belassen.

Nach der Beendigung der immunvermittelten Präzipitation wurden die Antigen-Antikörper-Bead-Komplexe per Magnet fixiert, viermal mit 500 µl Co-IP-Puffer gewaschen und der Puffer jeweils nach magnetischer Fixierung der Komplexe entfernt. Nach den Waschsritten konnten die Antigen-Antikörper-Bead-Komplexe mit reduzierendem SDS-PAGE-Ladepuffer (nach *Laemmli*) in Lösung gebracht werden. Diese wurde zur Proteindenaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach letztmaliger magnetischer Fixierung der Beads wurden 25 µl des Ladepuffers, welcher nun die Antigen-Antikörper-Komplexe enthielt, abpipettiert. Die Proben wurden entweder bei -80°C eingelagert oder sofort per SDS-PAGE auf die bereits beschriebene Art und Weise aufgetrennt.



**Abbildung 4:** Prinzip der nativen Co-Immunopräzipitation

*Links:* spezifisches Immunopräzipitat mit Antikörper gegen NAP1L1 (grauer Kreis), magnetischen Protein G -Beads (weißer Kreis) und potenziellen Interaktionspartner(n) (schwarzer Kreis) von NAP1L1 *Rechts:* verbleibendes, unspezifisches Proteingemisch aus humanen Thrombozyten

### **3.9 Probenaufbereitung für Massenspektrometrie (MS)**

#### 3.9.1 MS-kompatible Silberfärbung

Nach Abschluss der SDS-Elektrophorese wurden die Mini-Gele entweder über Nacht bei 4°C gelagert, oder aber sofort mit der Silberfärbung begonnen. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine im Gel zuerst in je 500 ml einer Lösung aus 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure und destilliertem Wasser für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter leichter Agitation fixiert. Danach wurde für je zweimal 20 Minuten mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Als nächstes erfolgte die Sensitivierung in 0.02% (w/v) Natriumthiosulfat für exakt eine Minute, gefolgt von drei kurzen Spülungen in destilliertem Wasser. Jetzt folgte die eigentliche Färbung in 0.2% (w/v) Silbernitrat und 37% (v/v) Formaldehyd für 20 Minuten. Danach wurde zweimal wiederrum kurz in destilliertem Wasser gewaschen und die Färbung mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0.005% (w/v) Natriumthiosulfat und 37% Formaldehyd unter leichter Agitation für ca. zwei Minuten entwickelt, bis die Proteinbanden deutlich und unterscheidbar zu erkennen waren. Nach Entfernung der Entwicklungslösung wurde die Reaktion durch Zugabe von 1% (w/v) Glycin-Lösung für 30min gestoppt. Alle Lösungen wurden jeweils am Tag der Färbung neu angesetzt.

#### 3.9.2 Trypsin In-Gel-Verdau

Mittels Silberfärbung identifizierbare Proteinbanden welche sich nur im spezifischen Immunpräzipitat (mAb gegen NAP1L1) zeigten, wurden mit Hilfe eines sterilen Skalpell und Maßnahmen zur Minimierung etwaiger Protein-Kontamination (Sicherheitswerkbank, sterile Handschuhe) aus den 1D-SDS-PAGE-Minigelen herausgelöst und in kleine Stückchen aufgeteilt. Auf der entsprechenden Höhe der Proteinbanden wurde auch aus dem unspezifischen Präzipitat (mouse IgG) ein Gelstück derselben Größe als Negativkontrolle entnommen und im Folgenden parallel behandelt. Zuerst wurden 30 µl einer Lösung mit 30mM Kaliumhexacyanidoferrat-III- sowie 100mM Natriumthiosulfat zugegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die vollständige Entfärbung eingetreten war (ca. 15min). Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 10 min erfolgte die Zugabe von 200mM Ammoniumbicarbonat in 50% (v/v) ACN für 15min. Die anschließende vollständige

Dehydrierung mit 100% ACN gelang in zwei jeweils 15-minütigen Schritten wiederum bei 37°C und unter konstantem Schütteln. Danach wurde das überschüssige ACN vorsichtig entfernt und die Trypsin-Lösung (10 ng/µl) auf die Gelstückchen aufgebracht und bei 37°C für ca. 12h inkubiert. Um die Peptide am nächsten Tag aus dem Gel heraus zu lösen, wurde dieses in 0.1%-iger (v/v) Essigsäure gelöst und für 30 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Gelbestandteile der Lösung wurden daraufhin durch Zentrifugation mit 10.000 x g für zwei Minuten abgeschieden und der Überstand in die Massenspektrometrie-Micro-Vials geladen. Nach nochmaliger Lösung der im Reaktionsgefäß verbliebenen Gelstücke mit 50% (v/v) ACN und 0.05% Essigsäure wurde die Zentrifugation wiederholt und der Überstand wiederum in die Probenröhrchen für die Massenspektrometrie übertragen. Die Überstände mit den gelösten Peptiden wurden dann per Vakuumzentrifuge für ca. 2 h konzentriert, bis das Probenvolumen auf unter 5 µl abgesunken war. Danach wurde dieses in 0.05% (v/v) Essigsäure und 2% (v/v) ACN aufgenommen und durch die Massenspektrometrie analysiert. Für Lösungen und Reaktionen wurde ausschließlich ultrareines Wasser (ULTREX®) sowie „low-protein-binding“-Tubes verwendet.

### 3.10 LC-MS/MS

Die technische Durchführung der LC-MS/MS und Bereitstellung der Daten erfolgte durch Hr. Dr. Steil und Fr. Bartels vom Institut für funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald.

Nachfolgende Angaben dienen der Skizzierung der grundlegenden Versuchsanordnung und Analyseparameter zur besseren Vergleichbarkeit<sup>113</sup>.

Zur Analyse der gewonnenen Peptidextrakte wurde die Flüssigkeitschromatographie- (LC), Elektronenspray-Ionisation- (ESI), Tandem-Massenspektrometrie- (MS/MS) Methode verwendet<sup>114,115</sup>. Für die Identifikation der Peptide aus den gewonnenen Massenspektren wurde SEQUEST<sup>116</sup> genutzt. Die Datenanalyse erfolgte über Scaffold (v.27 r.11) und dessen Peptide/Proteine Prophet Algorithmus<sup>117</sup>. Die verwendete Proteindatenbank war Uni-PROT/SWISS-PROT<sup>118</sup> (human\_v2014\_02). Eine Peptididentifikation wurde berücksichtigt bei einer positiven Vorhersagewahrscheinlichkeit von >95% laut Peptide Prophet mit Scaffold-

Massekorrektur. Eine Proteinidentifizierung wurde akzeptiert mit mindestens zwei zugehörigen Peptiden sowie einer von Protein Prophet kalkulierten Wahrscheinlichkeit von mehr als 99% eine „false discovery rate“ (FDR) von 0% zu erreichen. Jede Proteinbande aus dem spezifischen Co-Immunopräzipitat und ihre zugehörige Negativkontrolle wurde nach dem Trypsin-In-Gel-Verdau separat mit einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer, gekoppelt mit einem nano-Acquity Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (UPLC), analysiert. Für die UPLC wurde das Peptidgemisch mittels der sog. „trap column“ (Säulenchemie: C18, Länge: 2 cm, ID: 180 µm, Partikelgröße: 5 µm, Waters) entsalzt und darauf mit der sog. „reversed phase“ (RP-) Analysensäule (Säulenchemie: C18, Länge: 10 cm, ID: 100 µm, Partikelgröße: 1.7 µm, Waters) mit einer Flussrate von 400 nL/min weiter aufgetrennt. Die gebundenen Peptide wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten von 1–5% Puffer B in 2 min, 5–25% B in 63 min, 25–60% in 25 min, und 60–99% B in 2 min (Puffer A: 2% ACN in 0.1% Essigsäure; Puffer B: ACN in 0.1% Essigsäure) von der Säule gelöst. Darauf folgte die Ionisierung mit ESI bei 1.6 kV und einer Temperatur von 275 °C.

Die Spektren ( $m/z$  300-1700) der Präkursor-Ionen (MS1) wurden in einem Orbitrap (AGC target value  $1 \times 10^6$ , resolution 30 K, isolation width  $m/z - 1$  and activation time 10 ms) aufgefangen, während die MS2-Spektren der 20 häufigsten Ionen in einem LTQ im Daten-abhängigen Modus (DDA)<sup>119</sup> mit einer Dissoziationsenergie (CID) von 35% erzeugt worden. Um eine wiederholte MS/MS-Fragmentierung zu vermeiden, wurde „Dynamic exclusion“ (repeat count 1, repeat duration 30 s, exclusion list size 500, and exclusion duration 60 s) verwendet und das minimale Ionensignal für MS/MS war 2000. Nur Präkursor-Ionen mit einer Ladung von +2 oder +3 wurden weiter fragmentiert.

### 3.11 Fluoreszenz-Mikroskopie

Thrombozyten wurden aus Vollblut, wie bereits beschrieben, zu einer finalen Konzentration von  $1 \times 10^8$  pro mL Medium (M199) isoliert, je nach Fragestellung vorbehandelt oder im Verhältnis 1:1 in PBS mit 4% (v/v) PFA bei 4°C sofort fixiert. Je 90 µl dieser Lösung wurde für je eine Probe benutzt. Die Präparation der Plättchen auf dem Deckglas („cover slip“), erfolgte per Zentrifugation im CytoSpin™ bei 750 rpm für 5 Minuten für verbesserte Zellmorphologie und ein einheitliches Fluoreszenzsignal<sup>120</sup>.

Danach wurden die auf das Deckglas zentrifugierten Thrombozyten dreimal mit PBS gewaschen, jeweils unter vorsichtiger Aspiration der Spülflüssigkeit. Gefolgt von der Permeabilisation in PBS mit 0,1% (v/v) Triton-X über 10 Minuten bei 21°C. Die nun fixierten und permeabilisierten Thrombozyten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 10%-igen Serum aus der Ziege blockiert.

Anschließend wurden die Proben mit dem monoklonalen, spezifischen Antikörper (murine mAb to NAP1L1) in einer Konzentration von 0,1 µg mAb/ 1 ml goat serum bei 4°C für 12 Stunden inkubiert. Mit der jeweils zugehörigen Negativkontrolle, einem murinen IgG-Gemisch wurde genauso verfahren. Nach dieser primären Antikörperinkubation wurde wiederrum dreimal mit PBS gewaschen.

Ein mit dem Fluorophor Alexa Fluor® (Exzitationsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum: 519 nm, grün) gekoppelter Antikörper gegen murines IgG diente als sekundärer Antikörper und wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 10% normal goat serum für eine Stunde bei RT und Dunkelheit mit den Proben inkubiert<sup>121</sup>. Danach folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit PBS.

Als letzter Schritt wurde filamentäres Aktin (f-Aktin) in Plättchen mittels Phalloidin in PBS 1:40 verdünnt aufgebracht und für 30 Minuten bei RT und Dunkelheit inkubiert. Wiederrum erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS.

Für die nun folgende Mikroskopie wurde ein digitales (CCD), invertiertes, Epi-Fluoreszenzweitfeldmikroskop mit LED-Lichtquelle verwendet (EVOS® FLoid)<sup>122,123</sup>.

Die Abgrenzung der Bindung des spezifischen, primären Antikörpers (bzw. seines Paratops) an NAP1L1 gegenüber einer unspezifischen Wechselwirkung der Immunglobuline (IG) und/oder Autofluoreszenz wurde durch parallele Inkubation der Proben mit IG von identischer Konzentration (0,1µg/µl), Spezies und Isotyp (IgG) gewährleistet – „Isotype-Control“. Abschätzung von intrazellulärer Lokalisation und Verteilung von mAb gegen NAP1L1 wurde gewährleistet durch erwähntes sequenzielles Anfärben von f-Aktin - „Cytoskeletal Costaining“.

Je Probe wurden jeweils drei unabhängiger Felder mikroskopiert und jede Wellenlänge einzeln mit dem monochromatischen 16-bit CCD-Sensor des EVOS® FL Auto erfasst. Die Bildaufnahmeeinstellungen für LED-Intensität, CCD-gain bzw. -exposure der IgG-



Kontrolle waren jeweils identisch mit denen des spezifischen Antikörpers. Für die Post-Pseudofärbung und das Erstellen von Überlagerungsbildern („merge“) wurde GIMP 2.1 genutzt. Anpassungen in Helligkeit und Kontrast wurden immer gleichartig für das komplette Bild und die zugehörige Negativkontrolle vorgenommen<sup>124,125</sup>.

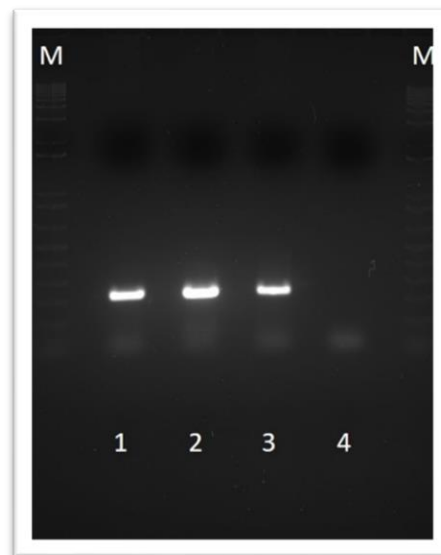
### **3.12 Sanger-Sequenzierung**

Die Durchführung der cDNA-Sequenzierung der RT-PCRs auf dem Weg der automatisierten Kettenabbruchmethode nach Sanger<sup>126,127</sup> erfolgte durch die GATC Biotech AG.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von NAP1L1-mRNA in Thrombozyten

In einem ersten Schritt sollte der Nachweis von NAP1L1-mRNA in aus Plättchen isolierter RNA erfolgen. Die RNA-Isolierung, RT-Schritt und NAP1L1-sequenzspezifische PCR-Amplifikation wurden wie beschrieben durchgeführt. Dabei wurde zunächst NAP1L1-Primer-Paar-No. I verwendet. Diese NAP1L1-RT-PCR wies NAP1L1-mRNA ausnahmslos in den Thrombozyten aller untersuchten Spender nach (s. Abbildung 5).



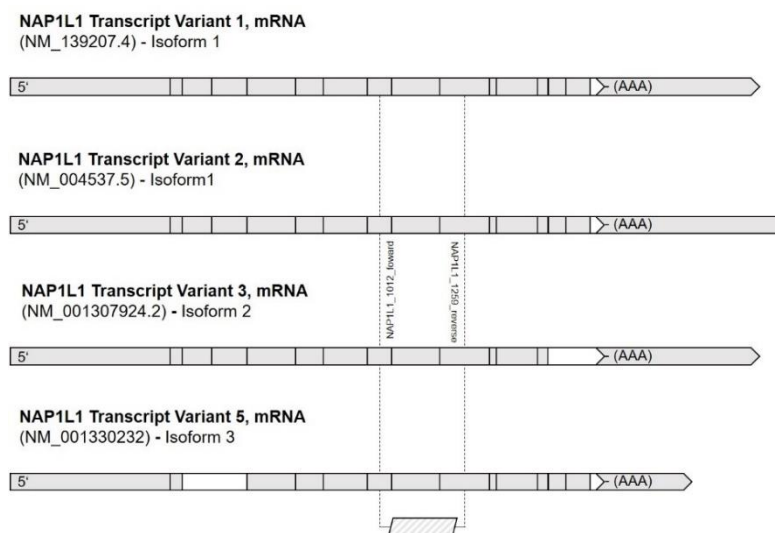
**Abbildung 5:** Humane Thrombozyten weisen NAP1L1 mRNA auf

NAP1L1-RT-PCR von drei unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern (1-3) mit jeweils Amplifikat der erwarteten Länge von ca. 250bp. (M) Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker, (4) Non-template-control (NTC)-PCR

NAP1L1-mRNA ist die Voraussetzung ein aktives und funktionelles Protein NAP1L1 zu erhalten und dieses Ergebnis bildet die Grundlage die Expression und Funktion von NAP1L1 in Thrombozyten zu untersuchen.

## 4.2 Nachweis alternativer NAP1L1-mRNA in Thrombozyten

Seit der Entdeckung des alternativen Spleißens<sup>128</sup> ist es allgemein akzeptiert, dass die „Ein-Gen-ein-Protein“-Hypothese für eukaryote Zellen nur eingeschränkt gültig ist. Alternative mRNA-Produkte fügen den ca. 20 000 humanen Protein-codierenden Genen weitere Diversität hinzu. In der Vergangenheit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Megakaryozyten und sogar Thrombozyten die Fähigkeit haben auf diesem Wege alternative Transkripte zu erzeugen<sup>77</sup>. Die Analyse mittels Primer BLAST<sup>95</sup> zeigte, dass die mit NAP1L1-Primer-Paar Nr. 1 (NAP1L1\_1012\_forward + NAP1L1\_1259\_reverse) durchgeführten RT-PCRs insgesamt neun Targets amplifizierten, alle mit einem Amplifikationsprodukt der Länge von 248bp (in Abbildung 6, *grau-weiß* dargestellt).



**Abbildung 6:** Positionierung von NAP1L1-Primer-Paar No. 1 anhand vier exemplarischer mRNA-Targets

(*grau*): Exone, (*weiß*): gespleißte Exone, (*grau-weiß*): cDNA-Amplifikationsprodukt, (*-AAA*): poly-(A)-Schwanz

Tabelle 1 gibt einen Überblick über diejenigen Transkripte, welche mit dem verwendeten Primer-Set detektierbar sind.

**Tabelle 1:** NAP1L1-RT-PCR Nr. I - nachweisbare mRNA

| Transkript-Variante | NCBI Accession | NCBI Isoform                       | NCBI Accession |
|---------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| NAP1L1 mRNA 1       | NM_139207.4    | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa  | NP_631946.1    |
| NAP1L1 mRNA 2       | NM_004537.6    | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa  | NP_004528.1    |
| NAP1L1 mRNA 3       | NM_001307924.2 | NAP1L1 Isoform 2,<br>calc. 44 kDa  | NP_001294853.1 |
| NAP1L1 mRNA 4       | NM_001330231.1 | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa  | NP_001317160.1 |
| NAP1L1 mRNA 5       | NM_001330232.1 | NAP1L1 Isoform 3,<br>calc. 38 kDa  | NP_001317161.1 |
| NAP1L1 mRNA X2      | XM_011538393.2 | NAP1L1 Isoform X1,<br>calc. 45 kDa | XP_011536695.1 |
| NAP1L1 mRNA X3      | XM_017019338.1 | NAP1L1 Isoform X1,<br>calc. 45 kDa | XP_016874827.1 |
| NAP1L1 mRNA X8      | XM_017019339.1 | NAP1L1 Isoform X2,<br>calc. 38 kDa | XP_016874828.1 |
| NAP1L1 mRNA X9      | XM_017019340.1 | NAP1L1 Isoform X2,<br>calc. 38 kDa | XP_016874829.1 |

Um festzustellen, ob auch NAP1L1 in humanen Thrombozyten in Form von alternativen Transkripten vorliegt, wurde ein RT-PCR-Design entworfen, welche diese selektiver nachweisen konnte.

Dazu wurden PCR-Primer verwendet welche die Unterscheidung von einzelnen NAP1L1-mRNAs anhand der Länge ihres Amplifikationsprodukts in der Gelelektrophorese zuließen, NAP1L1-Primer-Paar Nr. II (NAP1L1\_385\_forward + NAP1L1\_972\_reverse). Die Analyse mittels Primer BLAST<sup>95</sup> zeigte, dass das Design dieser Primer-Kombination potentiell insgesamt sechs alternative Ziel-mRNAs amplifizierte, davon vier mit der Länge von 588 Basenpaaren und zwei mit einer Länge von 399 Basenpaaren (s. Tabelle 2 und Tabelle 3).

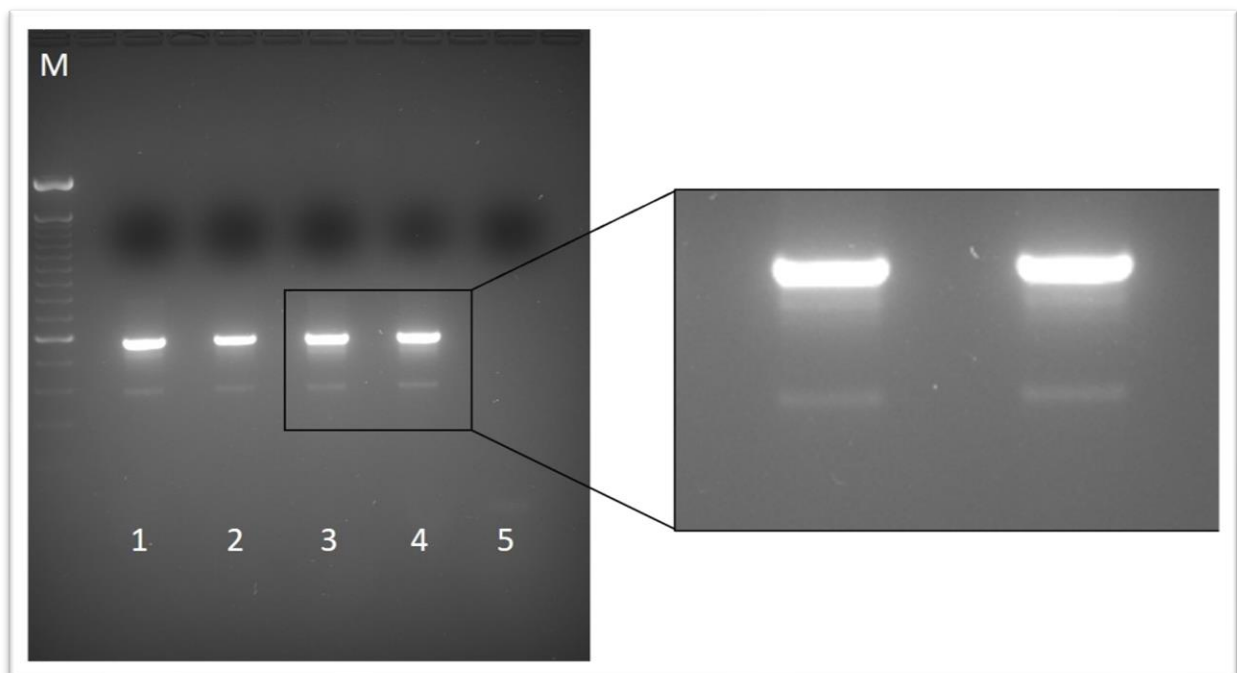
**Tabelle 2:** NAP1L1-RT-PCR Nr. II – nachweisbare mRNA mit Amplifikationsprodukt von 588 bp

| Transkript-Variante | NCBI Accession | NCBI Isoform                      | NCBI Accession |
|---------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| NAP1L1 mRNA 1       | NM_139207.4    | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa | NP_631946.1    |
| NAP1L1 mRNA 2       | NM_004537.6    | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa | NP_004528.1    |
| NAP1L1 mRNA 3       | NM_001307924.2 | NAP1L1 Isoform 2,<br>calc. 44 kDa | NP_001294853.1 |
| NAP1L1 mRNA 4       | NM_001330231.1 | NAP1L1 Isoform 1,<br>calc. 45 kDa | NP_001317160.1 |

**Tabelle 3:** NAP1L1-RT-PCR Nr. II – nachweisbare mRNA mit Amplifikationsprodukt von 399 bp

| Transkript-Variante | NCBI Accession | NCBI Isoform                       | NCBI Accession |
|---------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| NAP1L1 mRNA 5       | NM_001330232.1 | NAP1L1 Isoform 3,<br>calc. 38 kDa  | NP_001317161.1 |
| NAP1L1 mRNA X9      | XM_017019340.1 | NAP1L1 Isoform X2,<br>calc. 38 kDa | XP_016874829.1 |

Tatsächlich konnten mit Hilfe dieses zweiten RT-PCR-Ansatzes NAP1L1-mRNAs-Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Länge in humanen Thrombozyten nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein Haupt-Amplifikationsprodukt einer Länge von knapp 600 Basenpaaren, sowie zwei kürzere cDNA-Produkte von ca. 500 bp und 400 bp (s. Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA auf

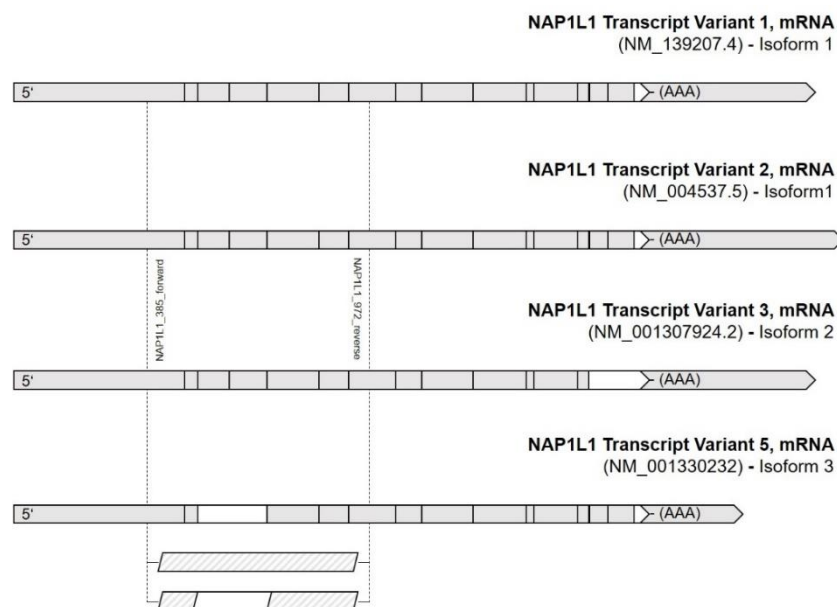
NAP1L1-RT-PCR von zwei unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation (1 + 3) und nach 24-stündiger Inkubation der Thrombozyten (2 + 4), sowie Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker (M) und NTC-RT (5).

Dieses Experiment erbringt zum einen den erstmaligen Nachweis von alternativen NAP1L1-mRNA-Produkten in humanen Thrombozyten und dient weiterhin zur Validierung detektierter NAP1L1-Isoformen auf Proteinebene (s. Kapitel 4.8).

Es ist weiterhin ein weiterer Baustein des „modernen“ Verständnis der Molekularbiologie des Thrombozyten, dass diese durch Megakaryozyten mit einer umfangreichen Ausstattung von mRNA entlassen werden, was wiederum diverse Möglichkeiten der post-transkriptionellen Modifikationen zulässt<sup>77,129–132</sup>.

Abbildung 8 zeigt analog zur Abbildung 6 die Bindungspositionen der Primer-Oligonukleotide von NAP1L1-Primer-Paar Nr. II anhand vier exemplarisch ausgewählter mRNA-Spezies und verdeutlicht die entsprechende Verkürzung des PCR-Produktes (in *grau-weiß* dargestellt), wenn Exone fehlen, welche sich innerhalb der amplifizierten Region befinden (z.B. die Exone 3 und 4 im Fall der mRNA-Variante 5).

NAP1L1-RT-PCR Nr. II wurde nach den Beobachtungen im Western Blot (s. Kapitel 4.8) speziell entworfen, um zu einer 38kDa-NAP1L1-Isoform zugehörige mRNA nachzuweisen, was hiermit gelang. Jedoch ist z.B. eine Unterscheidung zwischen NAP1L1 mRNA 5 und NAP1L1 mRNA X9 mit differentiell gespleißter Sequenz am 5' bzw. 3'-Ende dadurch nicht möglich.



**Abbildung 8:** Positionierung von NAP1L1-Primer-Paar Nr. II anhand vier exemplarischer mRNA-Targets.

(grau): Exone (weiß): gespleißte Exone (grau-weiß): cDNA-Amplifikationsprodukt

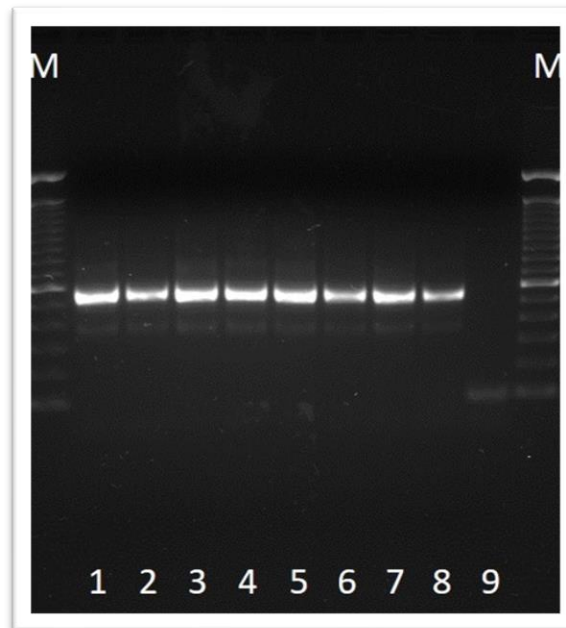
(-AAA): poly-(A)-Schwanz

Die NAP1L1 Transkript Variante 5 unterscheidet sich dabei von X9 durch ein jeweils deutlich verkürzte 5'- und 3'- Untranslated Region (UTR) und geringfügig verkürzte Sequenz in Exon 15, ebenfalls UTR. Die jeweiligen Translationsprodukte (38kDa) sind jedoch untereinander komplett homolog<sup>133</sup>. Während die beiden erstgenannten cDNA-Produkte (588 bzw. 399 bp-Produkt) gut voneinander abgrenzbar waren, erschien noch ein drittes, in seiner Größe intermediäres, Amplifikationsprodukt (s. Abbildung 7, Ausschnitt rechts).

Es könnte sich hierbei um den Nachweis der NAP1L1 Transkript Variante X6 (XR\_001748716.1) handeln, bei der das Ende des ersten Exons, und damit der Bindungsregion des Forward-Primers, gegenüber den anderen Transkripten verändert ist, was zu einer unvollständigen, oder reduzierten Bindung des Oligonukleotids führen könnte. Da dieser Primer sich an einer Intron-Exon-Junction befindet, führt dies zu einer entsprechenden Verkürzung des PCR-Produkts. NAP1L1 Transkript Variante 6 kodiert für eine, *in situ* kalkulierte, 40kDa-schwere NAP1L1-Isoform.

### 4.3 Alternative NAP1L1-mRNA nach Thrombozyten-Inkubation

Erneut wurden RNA-Isolierung, RT-Schritt und sequenzspezifische PCR-Amplifikation wie beschrieben durchgeführt, jedoch wurde ein Teil der Thrombozyten des jeweiligen Spenders im Vorfeld der RNA-Isolation für 24 Stunden im M199-Zellkulturmedium wie beschrieben inkubiert.



**Abbildung 9:** Humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA vor und nach 24-stündiger Inkubation in einem Zellkulturmedium auf

NAP1L1-RT-PCR von vier unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern vor (1 + 3 + 5 + 7) und nach Inkubation (2 + 4 + 6 + 8), (M) Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker, (9) Non-template-control (NTC)

Erneut wies dieses Experiment alternative Transkripte von NAP1L1 nach. In der gleichen Zusammensetzung wie vor der 24-stündigen Inkubation: einem Hauptamplifikationsprodukt von ca. 600 bp -Länge, einem kürzeren mit ca. 400 bp -Länge und einem etwas schlechter abgrenzbaren Produkt von ca. 500 Basenpaaren.

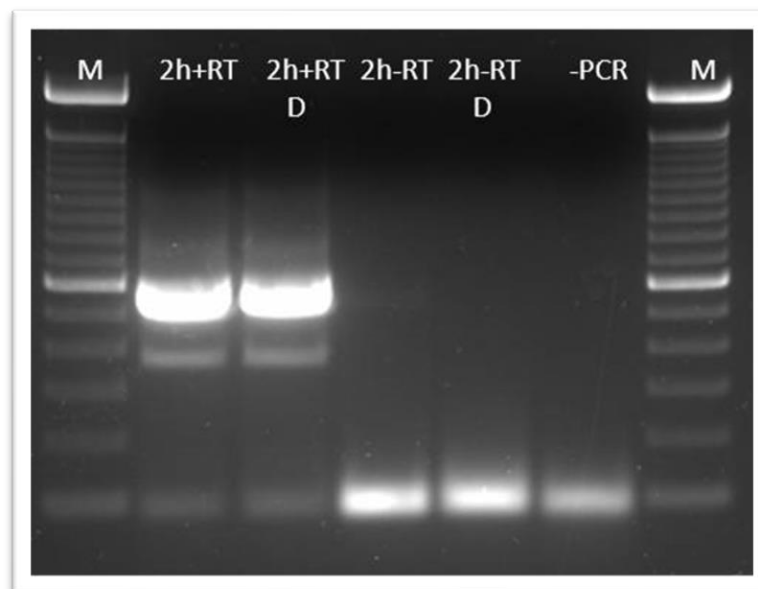
Im Gegensatz zu anderen Splicing-Vorgängen<sup>77</sup>, scheint dieser also nicht vorrangig in den Plättchen selbst, sondern ihren Vorläuferzellen stattzufinden. Eine Degradation der alternativen NAP1L1-mRNA war nicht nachzuweisen.



#### 4.4 Sequenzierung in RT-PCR amplifizierter NAP1L1-cDNA

Der Nachweis der vorgenannten RT-PCR-Amplifikationsprodukte ist bereits hochspezifisch für den Nachweis einer (oder mehrere) mRNAs. Zur definitiven Abklärung der Spezifität der RT-PCR-Reaktion<sup>134</sup> wurde zusätzlich eine externe Sequenzierung der Basenabfolge mittels der Didesoxymethode nach Sanger<sup>126</sup> (syn.: Kettenabbruch-Synthese) durchgeführt (GATC Biotech).

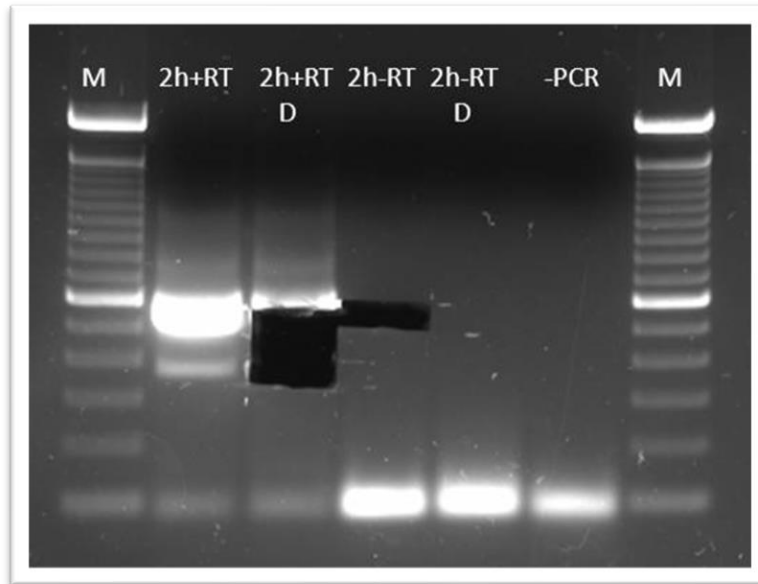
Nach erneuter Durchführung der beschriebenen RT-PCR-Reaktion mit NAP1L1-Primer-Paar Nr. II inklusive DNase-Behandlung der isolierten RNA wurden die Amplifikationsprodukte erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Alternative NAP1L1-Transkripte vor DNA-Sequenzierung

NAP1L1-RT-PCR eines individuellen Thrombozyten-Spenders nach zwei-stündiger Inkubation der Thrombozyten (2h+RT), NAP1L1-RT-PCR desselben Spenders mit DNase-Behandlung der isolierten RNA (2h+RT D), no-RT-Control (NRT, 2h-RT), no-RT-Control (NRT) mit DNase-Behandlung (2h-RT D) no-Template-Control (NTC) (-PCR) und Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker (jeweils M).

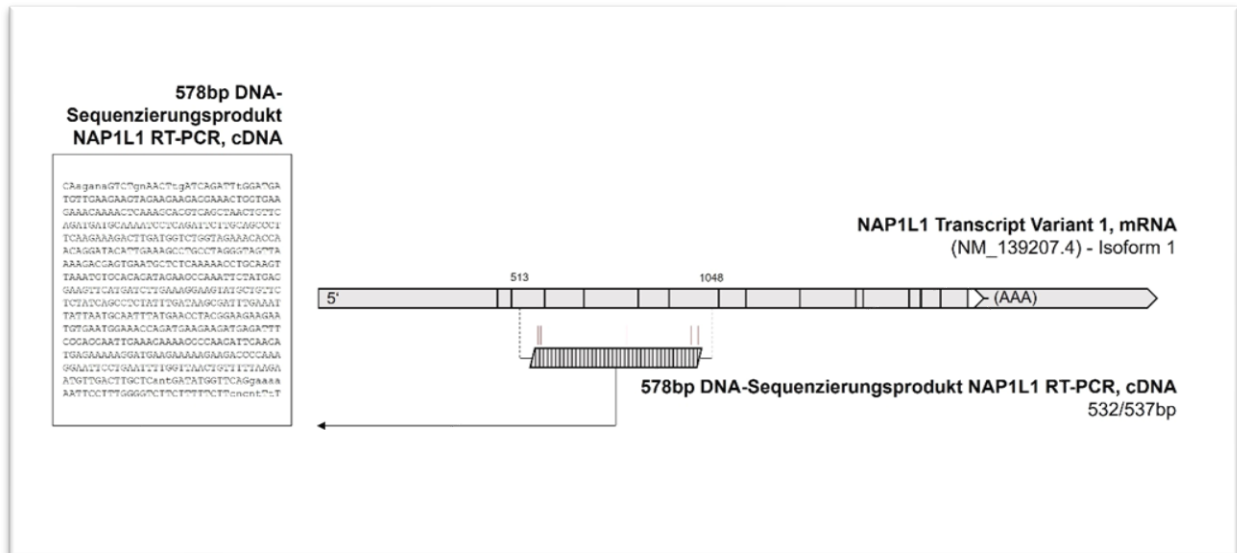
Die RT-PCR-Produkte der Länge von ca. 600 bp, ca. 500 bp und von ca. 400 Basenpaaren und eine Negativkontrolle aus der no-Reverse-Transkriptase-(NRT)-Reaktion wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Agarose-Gel geschnitten und zur Sequenzierung eingeschickt (s. Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Alternative NAP1L1-Transkripte nach DNA-Sequenzierung

NAP1L1-RT-PCR eines individuellen Thrombozyten-Spenders nach zwei-stündiger Inkubation der Thrombozyten (2h+RT), NAP1L1-RT-PCR desselben Spenders mit DNase-Behandlung der isolierten RNA (2h+RT D), no-RT-Control (NRT, 2h-RT), no-RT-Control (NRT) mit DNase-Behandlung (2h-RT D) no-Template-Control (NTC) (-PCR) und Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker (jeweils M).

Das Sequenzierungsprodukt der oberen Bande hatte eine Gesamtlänge von 578 Basenpaaren (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Sequenzierung der NAP1L1-RT-PCR-Produkte - 600bp-Amplifikat

Basensequenz des Sequenzierungsproduktes (Kasten links) und Alignment zur NAP1L1-mRNA mit Sequenzidentität von Position 513 bis 1048 (rechts). Misaligned bzw. Unaligned Basen sind gekennzeichnet (rote Striche).

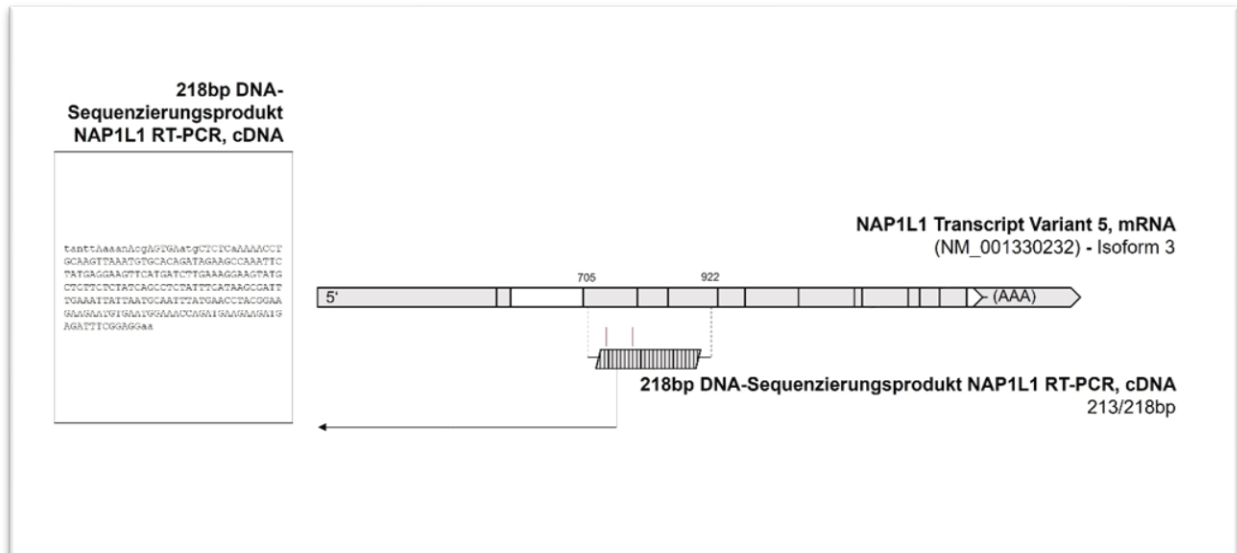
Ab Position 7 bis Position 542 des PCR-Produktes bestand Sequenzidentität mit NAP1L1-cDNA (transcript variant 1, NM\_139207.2, dort Position 513 bis 1048) mit Ausnahme zweier „unaligned bases/gaps“ (Position 13 und 23) und dreier „misaligned bases“ (Position 281, 452 und 526). Dies entspricht einer Deckungsgleichheit („identity“) von 99,1% (532/537) zwischen 7 und 542. Das Gesamtsequenzierungsprodukt war dementsprechend zu 92,0% identisch mit der Referenz-cDNA („coverage“; 532/578).

Der Vergleich der sequenzierten Nukleotidfolge mit der humanen RNA-Datenbank von NCBI (Homo sapiens RefSeq RNA) erbrachte folgende Ergebnisse:

**Tabelle 4:** Vergleich der in-Gel sequenzierten Nukleotidfolge des 600bp-Amplifikates mit NCBI's humaner RNA-Datenbank

| Beschreibung  | E-Value | Max. Score | Total Score | Query Cover | Identity | Accession      |
|---|---------|------------|-------------|-------------|----------|----------------|
| NAP1L1, transcript variant 1, mRNA  | 0,0     | 965        | 965         | 92%         | 99%      | NM_139207.2    |
| NAP1L1, transcript variant 2, mRNA  | 0,0     | 965        | 965         | 92%         | 99%      | NM_004537.4    |
| NAP1L1, transcript variant X1, mRNA   | 0,0     | 965        | 965         | 92%         | 99%      | XM_011538390.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X5, mRNA  | 0,0     | 965        | 965         | 92%         | 99%      | XM_011538393.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X6, mRNA  | 0,0     | 965        | 965         | 92%         | 99%      | XM_011538394.1 |
| PREDICTED: <i>NAP1L4P3, misc_RNA (nucleosome assembly protein 1-like 4 pseudogene 3)</i>            | 0,0     | 760        | 760         | 92%         | 93%      | XR_915160.1    |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X2, mRNA  | 0,0     | 730        | 966         | 92%         | 99%      | XM_006719423.2 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X3, mRNA  | 0,0     | 730        | 966         | 92%         | 99%      | XM_011538391.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X4, mRNA  | 0,0     | 730        | 966         | 92%         | 99%      | XM_011538392.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X9, mRNA  | 0,0     | 651        | 651         | 64%         | 98%      | XM_006719425.2 |
| -----   | -----   | -----      | -----       | -----       | -----    | -----          |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X7, mRNA  | 1e-114  | 416        | 652         | 64%         | 98%      | XM_006719424.2 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X8, mRNA  | 1e-114  | 416        | 652         | 64%         | 98%      | XM_011538395.1 |
| PREDICTED: <i>YARS2, transcript variant X7, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial)</i> | 4e-114  | 414        | 414         | 46%         | 95%      | XR_931299.1    |
| PREDICTED: <i>YARS2, transcript variant X3, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial)</i> | 4e-114  | 414        | 414         | 46%         | 95%      | XR_931297.1    |
| PREDICTED: <i>YARS2, transcript variant X5, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial)</i> | 4e-114  | 414        | 414         | 46%         | 95%      | XR_429036.1    |

Das Sequenzierungsprodukt der unteren Bande hatte eine Gesamtlänge von 218 Basenpaaren (s. Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Sequenzierung der NAP1L1-RT-PCR-Produkte - 400bp-Amplifikat

Basensequenz des Sequenzierungsproduktes (Kasten links) und Alignment zur NAP1L1-mRNA mit Sequenzidentität von Position 705 bis 922 (rechts). Misaligned bzw. Unaligned Basen sind gekennzeichnet (rote Striche). Gespleißte Exone (weiß)

Von Position 4 bis Position 218 - ausgenommen zweier „misalignements“ an Position 10 und 83- war es zu 99,1% („identity“; 213/218) identisch zur NAP1L1-cDNA (transcript variant 1, NM\_139207.2). Die Übereinstimmung der gesamten sequenzierten Nukleotidfolge mit der Referenz-NAP1L1-cDNA betrug 97,7% („coverage“, 213/218). Das Alignment des Sequenzierungsergebnisses mit der humanen RNA-Datenbank von NCBI bot folgendes Bild:

**Tabelle 5:** Vergleich der in-Gel sequenzierten Nukleotidfolge des 400bp-Amplifikates mit NCBI's humaner RNA-Datenbank

| Beschreibung   | E-Value | Max. Score | Total Score | Query Cover | Identity | Accession      |
|--|---------|------------|-------------|-------------|----------|----------------|
| NAP1L1, transcript variant 1, mRNA   | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | NM_139207.2    |
| NAP1L1, transcript variant 2, mRNA   | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | NM_004537.4    |
| NAP1L1, transcript variant X1, mRNA  | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | XM_011538390.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X5, mRNA   | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | XM_011538393.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X6, mRNA   | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | XM_011538394.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X9, mRNA   | 7e-107  | 388        | 388         | 98%         | 99%      | XM_006719425.2 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X2, mRNA   | 2e-103  | 377        | 377         | 95%         | 99%      | XM_006719423.2 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X3, mRNA   | 2e-103  | 377        | 377         | 95%         | 99%      | XM_011538391.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X4, mRNA   | 2e-103  | 377        | 377         | 95%         | 99%      | XM_011538392.1 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X7, mRNA   | 2e-103  | 377        | 377         | 95%         | 99%      | XM_006719424.2 |
| PREDICTED: NAP1L1, transcript variant X8, mRNA   | 2e-103  | 377        | 377         | 95%         | 99%      | XM_011538395.1 |
| PREDICTED: <i>YARS2</i> , transcript variant X7, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial) | 1e-89   | 331        | 331         | 98%         | 94%      | XR_931299.1    |
| PREDICTED: <i>YARS2</i> , transcript variant X3, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial) | 1e-89   | 331        | 331         | 98%         | 94%      | XR_931297.1    |
| PREDICTED: <i>YARS2</i> , transcript variant X5, misc_RNA (tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial) | 1e-89   | 331        | 331         | 98%         | 94%      | XR_429036.1    |
| PREDICTED: <i>NAP1L4P3</i> , misc_RNA (nucleosome assembly protein 1-like 4 pseudogene 3)            | 5e-74   | 279        | 279         | 98%         | 91%      | XR_915160.1    |

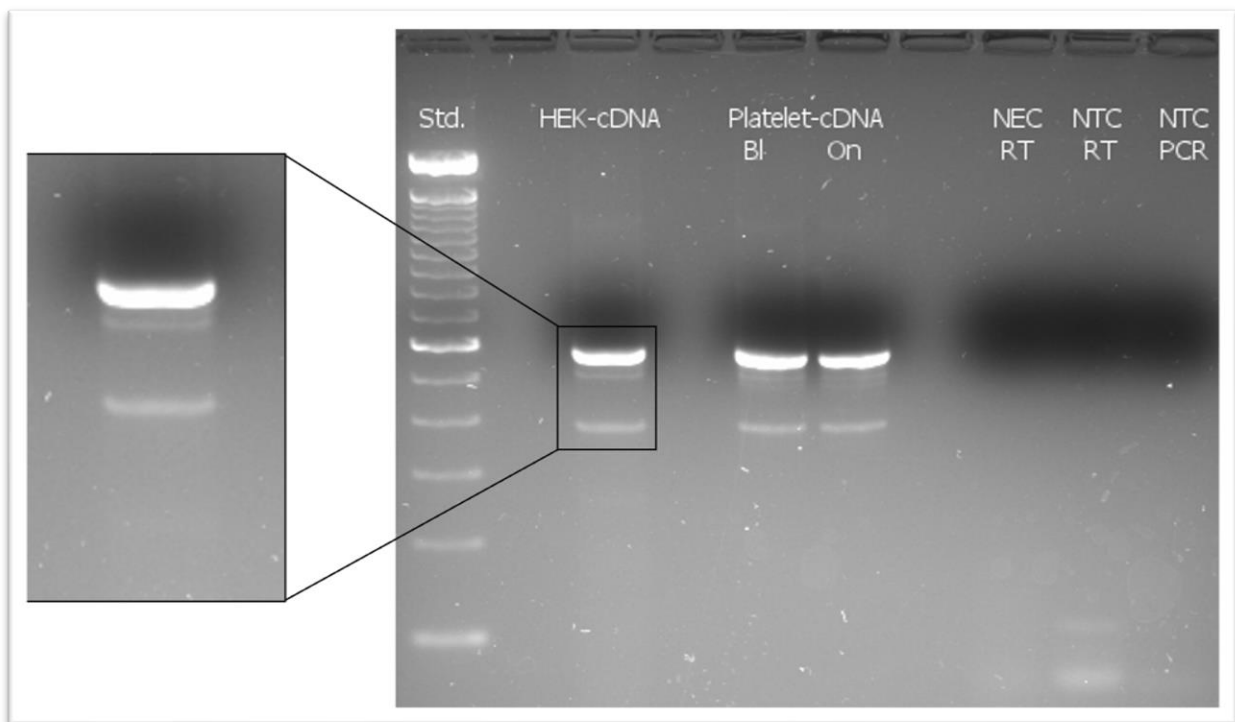
Die NAP1L1-RT-PCR-Produkte mit einer Länge von 588 bzw. 399 Basenpaaren konnten mit Hilfe dieser Sequenzierung definitiv als NAP1L1-mRNA identifiziert werden. Die Sequenzhomologie zu NAP1L1-mRNA war mit Abstand am höchsten (d.h. das E-Value am geringsten) weit vor allen anderen möglichen humanen mRNAs (vgl. Tabellen 4 und 5).

Für das dritte RT-PCR-Produkt von knapp 500 Basenpaaren gelang eine Sequenzierung aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht.

Darüber hinaus schlossen wichtige Kontrollen zum einen die endogene oder exogene Kontamination des Versuchs durch DNA (DNase-Behandlung nach RNA-Isolation bzw. no-Reverse-Transkriptase-Control), zum anderen durch unspezifisch amplifizierte, oder kontaminierende Nukleinsäuren oder exzessive „Primer-Dimer“-Formation (no-Template-Control) aus (s. Abbildungen 10 und 11).

#### 4.5 Alternative NAP1L1-mRNA in Thrombozyten und kernhaltigen Zellen

Um zu untersuchen, ob es sich bei der in der RT-PCR beobachteten alternativ gespleißten NAP1L1-mRNA um ein Plättchen-spezifisches Phänomen handelt, wurde einmalig die Zellen einer „klassischen“ Zellkultur (HEK HNA 3a) auf das Vorhandensein ebensolcher mRNA Varianten untersucht (s. Abbildung 14).



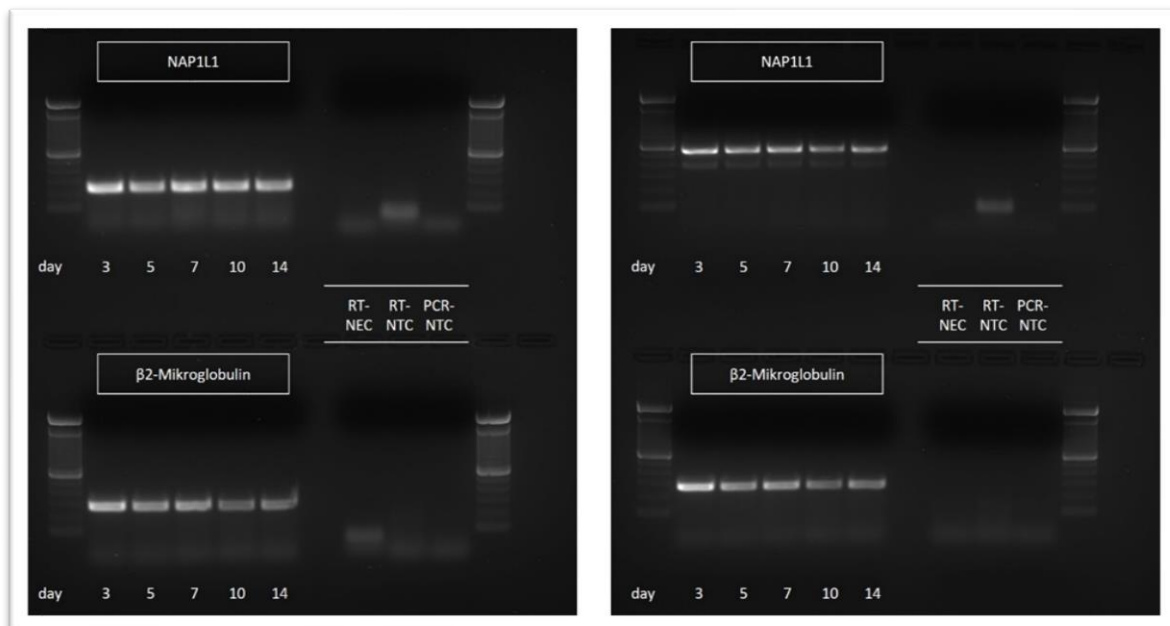
**Abbildung 14:** Humane kernhaltige Zellen (HEK) und humane Thrombozyten weisen alternative NAP1L1 mRNA auf

NAP1L1-RT-PCR eines Thrombozyten-Spenders unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation (Bl - baseline) und nach 12-stündiger Inkubation der Thrombozyten (On - overnight). (Std.) - Nukleinsäure-Molekulargewichtsmarker, (NEC-RT) – non-enzymatic-control RT-Schritt, (NTC-RT) – non-template-control RT-Schritt, (NTC-PCR) – non-template-control PCR-Schritt.

Auch hier zeigte sich die auch schon bei Thrombozyten beobachtete Zusammensetzung von alternativen NAP1L1-Transkripten (s. Abbildung 14, *Ausschnitt links*).

## 4.6 Alternative NAP1L1-mRNA in Thrombopoese

Da Thrombozyten im Verlauf ihrer Entstehung von Megakaryozyten eine mRNA-Ausstattung erhalten<sup>132</sup>, müsste NAP1L1-mRNA und ggf. alternative NAP1L1-mRNA in Megakaryozyten bzw. ihren Vorläuferzellen, den CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen, nachweisbar sein. CD34-positive-HPC wurden wie beschrieben isoliert, kultiviert und über 14 Tage zum Megakaryozyten differenziert (s. Kapitel 3.4). Im Verlauf der Zelldifferenzierung wurde zu fünf Zeitpunkten (Kulturtag 3, 5, 7, 10 und 14) RNA isoliert und mittels PCR untersucht, um die Expression von NAP1L1 mRNA und entsprechende Varianten nachweisen zu können (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Expression von NAP1L1 mRNA in humanen CD34+-HPC im Rahmen ihrer *in vitro* Differenzierung zu Megakaryozyten in Zellkultur

NAP1L1-RT-PCR Nr. I einer gepoolten CD34+Progenitorzellkultur (*links*) und Nachweis alternativer NAP1L1-Transkripte in NAP1L1-RT-PCR Nr. II (*rechts*). (*day 3-14*): Tag der RNA-Isolation im Rahmen der Megakaryozytendifferenzierung. (*RT-NEC*) – non-enzymatic-control RT-Schritt, (*RT-NTC*) – non-template-control RT-Schritt, (*PCR-NTC*) – non-template-control PCR-Schritt.

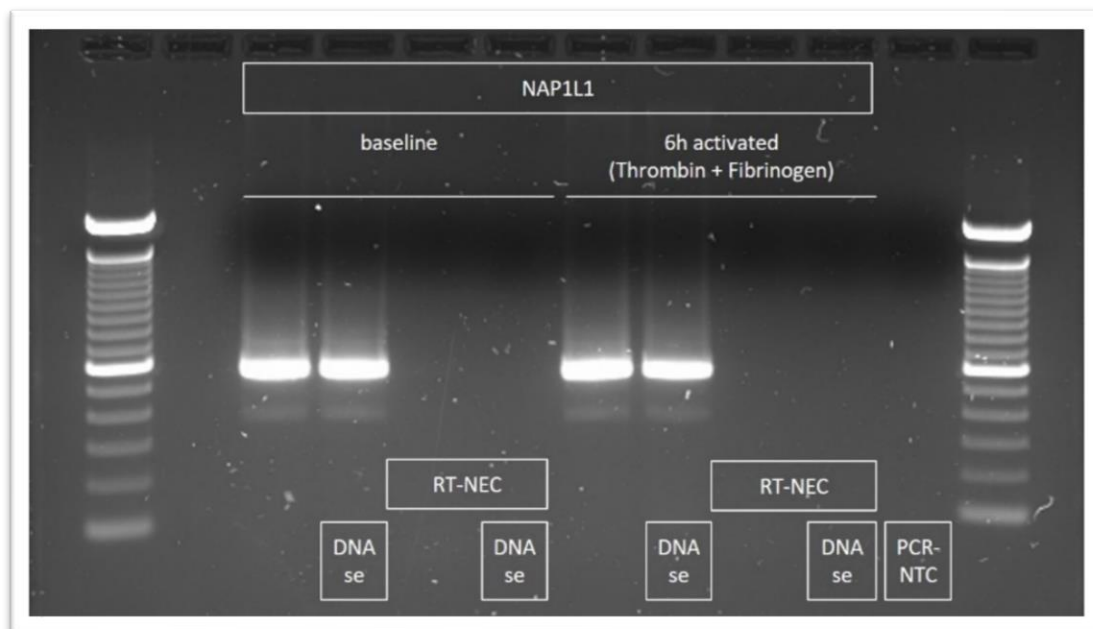
Die NAP1L1-RT-PCR der CD34+-Zellkultur zeigte, wie bereits die PCR der Thrombozyten, sowohl eine Expression von „klassischer“ NAP1L1-mRNA als auch das Vorhandensein von alternativen NAP1L1-Genprodukten.



In Relation zur mitgeführten RNA-Ladungskontrolle ( $\beta$ 2-Mikroglobulin), zeigte sich sowohl klassische als auch alternative NAP1L1-Transkripte stabil über den Zeitraum der Entwicklung der CD34+Zellreihe.

#### 4.7 Alternative NAP1L1-mRNA nach Thrombozyten-Aktivierung

Weil Thrombozyten auf die Stimulation mit Thrombin bzw. Fibrinogen mit post-transkriptionaler Modifikation reagieren können<sup>135</sup> wurde im weiteren Verlauf, nach sechs-stündiger *in-vitro* Plättchenaktivierung mit Thrombin und Fibrinogen, RNA isoliert und auf das Vorhandensein von NAP1L1-mRNA und alternativer Transkripte untersucht (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Expression von alternativen NAP1L1-Transkripten in humanen Thrombozyten nach *in vitro*-Aktivierung

NAP1L1-RT-PCR eines Thrombozyten-Spenders unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation (links, *baseline*) und nach sechs-stündiger *in-vitro*-Aktivierung (rechts, *Thrombin + Fibrinogen*). (*DNAse*) – RNA-Isolation mit *DNAse*-Behandlung, (*RT-NEC*) – non-enzymatic-control RT-Schritt, (*PCR-NTC*) – non-template-control PCR-Schritt.

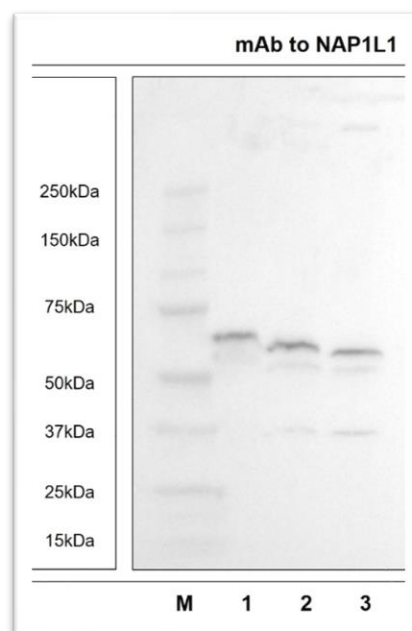
Erneut zeigte sich in den isolierten Thrombozyten NAP1L1-mRNA und alternative Transkripte. Die Zusammensetzung und Länge der amplifizierten Produkte veränderte sich nicht durch *in-vitro* Thrombozytenaktivierung bzw. -stimulation.

#### 4.8 Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombozyten (WB)

Nachdem der Nachweis von NAP1L1-mRNA in Thrombozyten und deren Vorläuferzellen, den Megakaryocyten gelungen war, sollte im nächsten experimentellen Schritt das kodierte Protein NAP1L1 nachgewiesen werden, um damit die Brücke vom Transkriptom zum Proteom und schliesslich zur Proteinfunktion zu schlagen.

Da bis dato kein immuno-spezifischer Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombozyten jenseits von Proteom-basierten Erhebungen vorlag, erfolgte dieser mit Hilfe zweier sich ergänzender Methoden: Western Blot (s. Kapitel 4.8) ergänzt um Peptide Competition Assay (PCA) und Fluoreszenzmikroskopie (s. Kapitel 4.10).

Zur Etablierung des immunologischen Nachweises von NAP1L1 in Thrombozyten, wurde deren Proteinlysate in abnehmender Menge (Thrombozytenzahl), wie in Kapitel 3.7 beschrieben, mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch nach der Größe der Proteine aufgetrennt, auf die PVDF-Membran transferiert und zuerst mit dem monoklonalen, murinen Antikörper gegen NAP1L1 inkubiert (s. Abbildung 17).

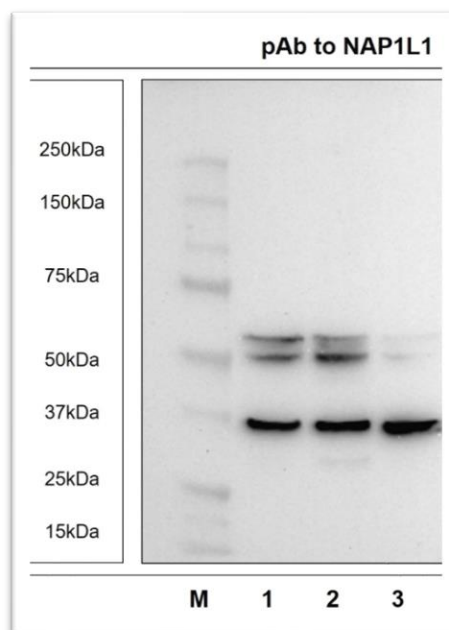


**Abbildung 17:** Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein (mAb)

NAP1L1-WB eines Thrombozyten-Spenders (1-3) unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation. (M) Proteinmassegewichtsstandard (1) -  $1 \times 10^9$  Thrombozyten (2) -  $5 \times 10^8$  Thrombozyten (3) -  $1 \times 10^8$  Thrombozyten

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass zusätzlich zum erwarteten Signal bei ca. 60kDa eine Bindung des monoklonalen Antikörpers an zwei weiteren Stellen nachgewiesen wurde, die zugehörigen Proteine mit einer Masse von 53 bzw. 37 kDa. Das laut Hersteller des Antikörpers erwartete Ergebnis war der Nachweis eines Proteins der Größe von 37 kDa. Es ist weiterhin wichtig zu erwähnen, dass die leiterartige Verschiebung der proteinnachweisenden Banden durch die veränderte Proteingesamtbeladung der jeweiligen SDS-PAGE-Lanes verursacht wird.

Da der murine Antikörper gegen NAP1L1 unerwartet drei statt einem Protein nachwies, wurden die Thrombozytenlysate nach erneuter Auftrennung mittels Western Blot mit einem alternativen Antikörper untersucht (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen), welcher sich gegen eine andere Peptidsequenz des Antigens richtet (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein (pAb)

NAP1L1-WB eines Thrombozyten-Spenders (1-3) unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation. (M) Proteinmassegewichtsstandard (1) -  $1 \times 10^8$  Thrombozyten (2) -  $5 \times 10^7$  Thrombozyten (3) -  $1 \times 10^7$  Thrombozyten

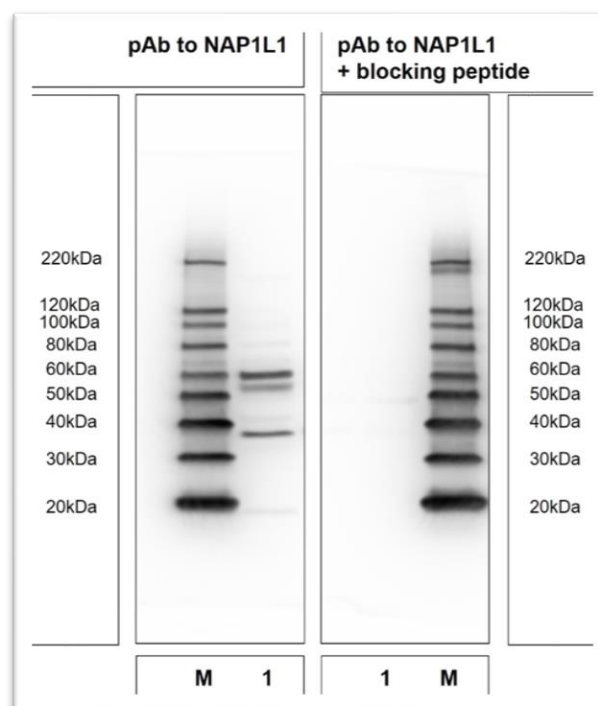
In Abbildung 18 ist zu sehen, dass sich auch mit polyklonalen Antikörper gegen NAP1L1 im Western Blot humaner Thrombozyten drei nachgewiesene Proteine mit einer Größe von 60, 53 und 37 kDa zeigten. Das laut Hersteller des Antikörpers erwartete Ergebnis war jedoch in diesem Fall der Nachweis eines Proteins bei einem

ungefähren Massegewicht von 53 kDa. Die Signalstärke zwischen den einzelnen Banden änderte sich mit dem Protein/Antikörper-Verhältnis. In Abbildung 18 gilt es weiterhin zu beachten, dass die Proteinbeladungsunterschiede zwischen den einzelnen SDS-PAGE-Lanes geringer skaliert waren als in Abbildung 17, und damit der Überladungs-induzierte „Leitereffekt“ ausblieb.

Beide Antikörper wiesen also im Western Blot jeweils spezifische Proteinsignale auf, welche sich in Zahl und Größe der Banden von dem vom Hersteller erwarteten Ergebnis unterschieden, waren allerdings interexperimentell konsistent.

#### 4.8.1 NAP1L1-Western Blot in Peptide Competition Assay

Obwohl diese Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies stammten und gegen unterschiedliche Peptidsequenzen von NAP1L1 gerichtet waren, zeigten sie vergleichbare Ergebnisse. Folglich erschien die Wahrscheinlichkeit hoch, dass alle drei Signale eher NAP1L1-Isoformen statt unspezifische Antikörperbindung waren. Der immunspezifische Nachweis unterschiedlicher NAP1L1-Isoformen sollte deshalb im Folgenden mit Hilfe eines Peptide Competition Assays (PCA) untersucht werden (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19:** NAP1L1-Protein wird in humanen Thrombozyten spezifisch nachgewiesen (PCA)

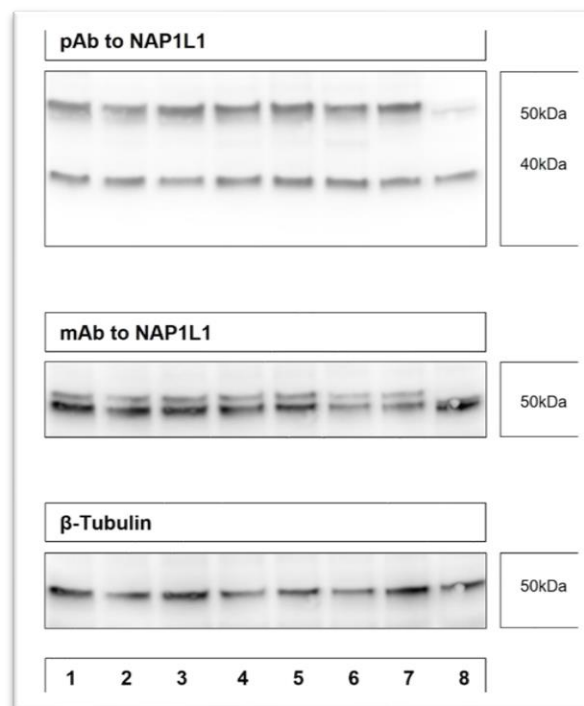
NAP1L1-WB eines Thrombozyten-Spenders (1) unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation. (M) Proteinmassegewichtsstandard. Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente. Links ohne, rechts mit NAP1L1-spezifischem Peptide zur Blockierung der Proteinbindungsstelle des primären Detektionsantikörpers.

Die Inkubation des polyklonalen Antikörper gegen NAP1L1 mit dem entsprechenden immunogenen NAP1L1-Peptid (das Epitop gegen das dieser gerichtet ist) führte zur Elimination der nachgewiesenen NAP1L1 Proteine für 37, 53 und 60 kDa (s. Abbildung 19, *rechts*).

Dieses Ergebnis unterstrich, dass es sich bei den drei detektierten Proteinen um eine immuno-spezifische Bindung des Antikörpers handelte und gab Anlass, wie bereits geschildert, auf Transkriptionsebene nach alternativen NAP1L1-mRNAs zu suchen (s. Kapitel 4.2).

## 4.9 NAP1L1-Isoformen nach Thrombozyten-Kultivierung

Die beschriebenen NAP1L1-Isoformen wurden in den Plättchen aller untersuchten Probanden nachgewiesen. Auf mRNA-Ebene war bereits bekannt, dass die Menge an NAP1L1-Transkript in humanen Thrombozyten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit stabil blieb (s. Kapitel 4.3). Um dieses Ergebnis auch auf Proteinebene zu validieren, wurde ein Teil der Thrombozyten des jeweiligen Spenders wie in Kapitel 3.1 beschrieben für 24 Stunden in Zellkulturremedium inkubiert und danach ihre Proteinausstattung mit Hilfe der Western-Blot-Technik analysiert (s. Abbildung 20).



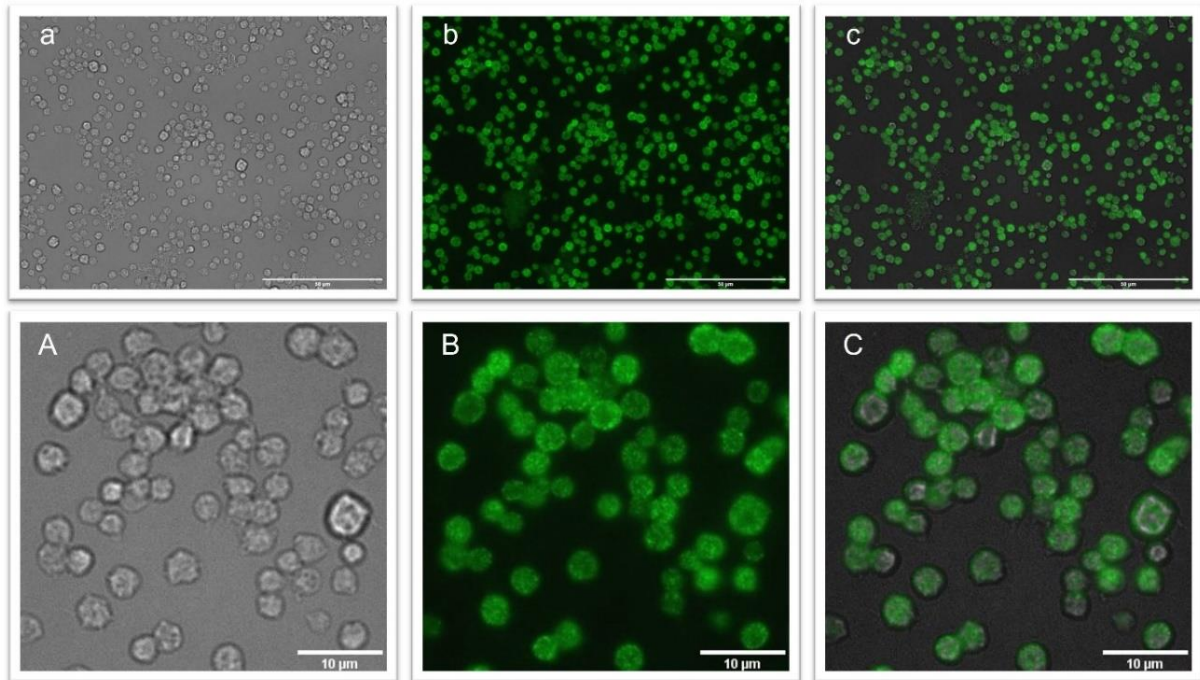
**Abbildung 20:** Humane Thrombozyten weisen NAP1L1-Protein in drei Isoformen vor und nach 24-stündiger Inkubation in einem Nährmedium auf

NAP1L1-WB von vier unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern vor (1 + 3 + 5 + 7) und nach Inkubation (2 + 4 + 6 + 8).

Nach Inkubation der Plättchen in M199-Zellkulturmedium blieb die Expression von NAP1L1 im Vergleich zur Ladungskontrolle ( $\beta$ -Tubulin) weitestgehend stabil, auch die Zusammensetzung der Isoformen blieb unverändert.

#### 4.10 Mikroskopischer Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombozyten (ICC)

Um NAP1L1-Protein in humanen Thrombozyten direkt sichtbar zu machen, wurden diese, wie in Kapitel 3.11 geschildert, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie immunocytochemisch untersucht (s. Abbildung 21).



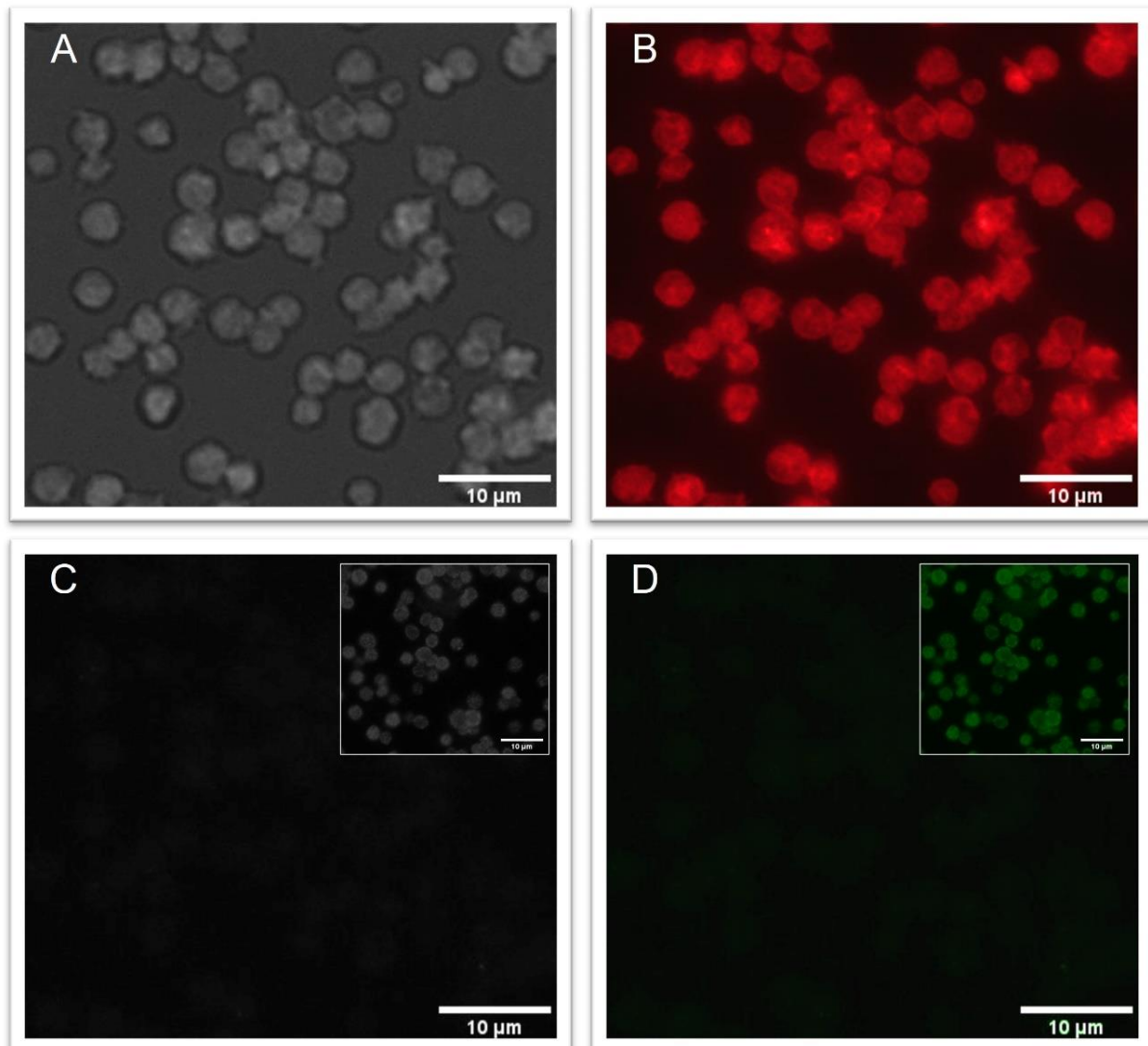
**Abbildung 21:** Humane Thrombozyten exprimieren das NAP1L1-Protein ubiquitär (ICC)

Native Mikroskopie (a/A), Fluoreszenzmikroskopie mit pAb gegen NAP1L1(b/B) und Überlagerungsbild (c/C) der humanen Thrombozyten eines Spenders unmittelbar nach Isolation (baseline). Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.

In allen untersuchten humanen Thrombozyten war NAP1L1-Protein (Abbildung 21, in grün) detektierbar.



Dieses Signal war spezifisch. In den Isotyp-Kontrollen (s. Abbildung 22, unten) unter den gleichen Aufnahmebedingungen (LED-Intensität, CCD-gain und -exposure) zeigte sich jeweils nahezu kein Hintergrundsignal (vgl. auch Bild-in-Bild in C/D in Abbildung 22).

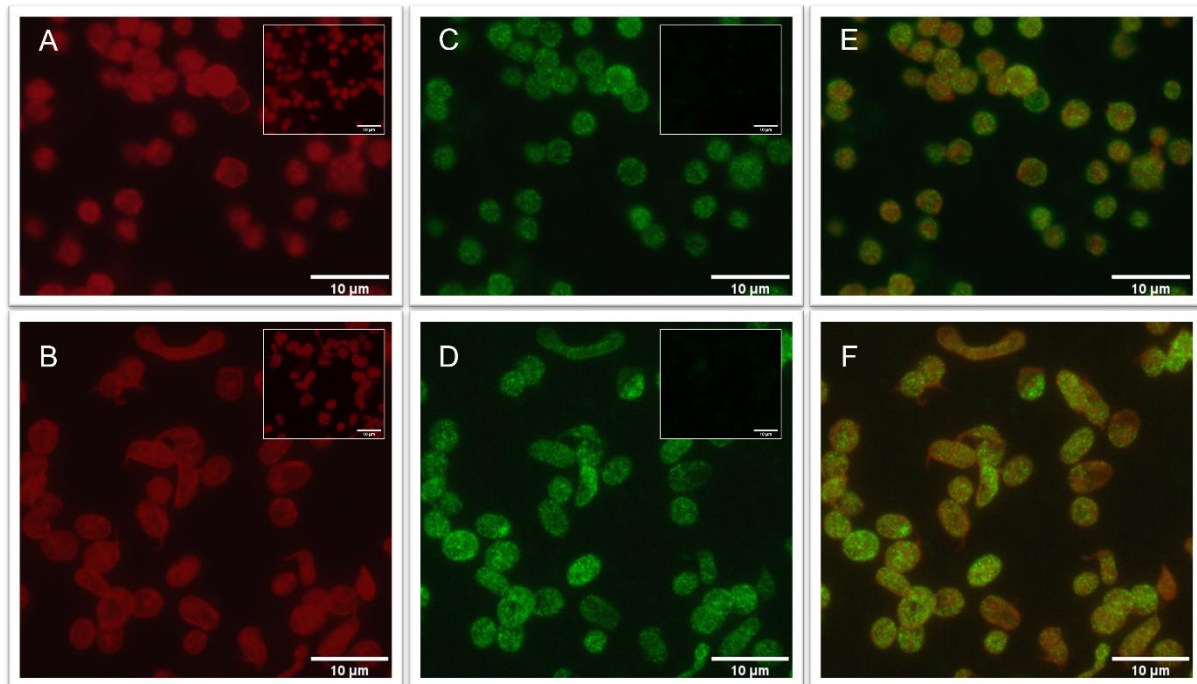


**Abbildung 22:** Spezifität der Fluoreszenzmikroskopie für NAP1L1 in humanen Thrombozyten

Native Mikroskopie (A) und Fluoreszenzmikroskopie mit (B) Phalloidin (Nachweis von F-Aktin) und (C/D) normal-IgG-Isotyp-Kontrolle (C – quantitativ monochrom, D – in grün). A-D gleicher Bildausschnitt. Bild-in-Bild jeweils Signal von pAb gegen NAP1L1 unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.

Während sich die Thrombozyten, wie in Abbildung 21 und 22 zu sehen, kurz nach Isolation vom jeweiligen Spender noch ruhend zeigen (diskoide Zellkörper, keine Pseudopodien, kein Degranulierung), ist in Abbildung 23, nach 12-stündiger

Kultivierung, eine deutlich andere Zellmorphologie zu verzeichnen (elongierte Zellkörper und Pseudopodienbildung).



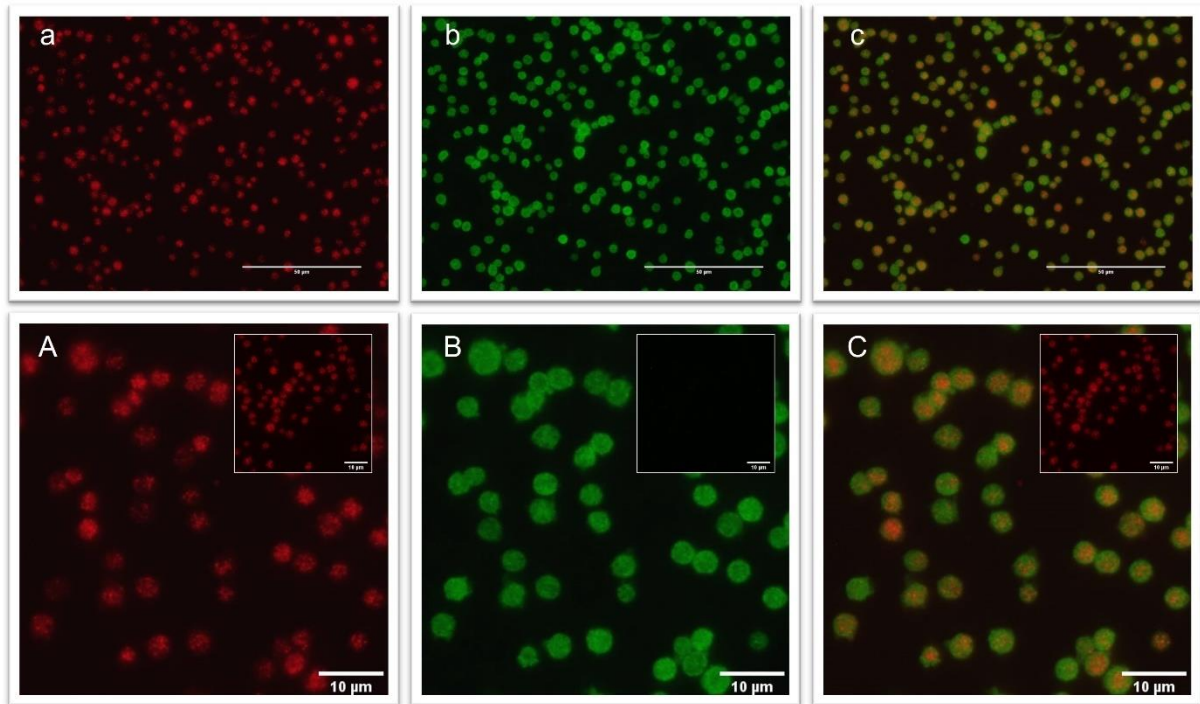
**Abbildung 23:** NAP1L1 ist in humanen Thrombozyten vor und nach 12-stündiger Inkubation ubiquitär verteilt (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie mit (A+B) Phalloidin (Nachweis von F-Aktin), (B+C) pAb gegen NAP1L1 und (E+F) Überlagerungsbild der humanen Thrombozyten eines Spenders unmittelbar nach Isolation (obere Reihe) und nach Inkubation (untere Reihe). Bild-in-Bild jeweils Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

In Abbildung 23 ist zu sehen, dass Thrombozyten, die im Rahmen der Kultivierung bereits eine ausgeprägte Änderung ihrer Morphologie durchgemacht haben (z.B. „barbell-shaped“ Proplatelet in Abbildung 23, B-F), tendenziell ein etwas geringeres NAP1L1-Signal zeigten, als ruhende, größere Thrombozyten, welche eher der Preplatelet-Fraktion zuzuordnen waren (vgl. Abbildung 21, B). Insgesamt zeigte sich NAP1L1 jedoch auch in den mikroskopischen Untersuchungen als homogen in allen Thrombozyten exprimiert.

Bei Betrachtung der intrazellulären Verteilung von NAP1L1 in Relation zum Aktin-Zytoskelett des Thrombozyten (Abbildung 23, A und B) fiel auf, dass NAP1L1 sich gleichförmig im gesamten Plättchen darstellte, jedoch in einem granulären Muster organisiert zu sein schien.

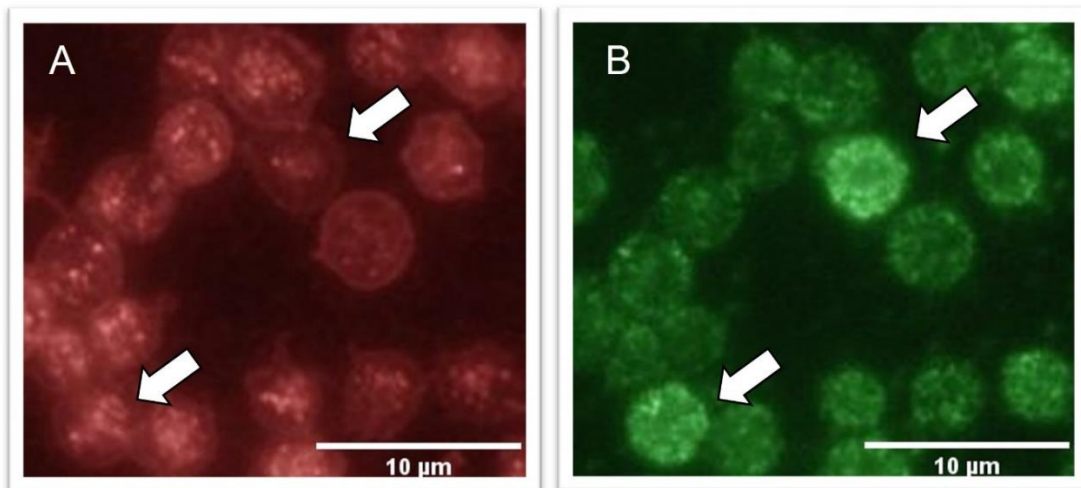
Um herauszufinden, ob sich NAP1L1 eventuell innerhalb von Plättchengranula ( $\alpha$ - bzw.  $\delta$ - Granula) befand, wurden Thrombozyten zusätzlich mit dem Lektin und Membranmarker Wheat germ agglutinin (WGA) markiert (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Vergleich der intrazellulären Lokalisation von NAP1L1 gegenüber dem Granulomer humaner Thrombozyten (ICC)

Fluoreszenzmikroskopie mit (a/A) WGA (Nachweis von Zellmembranen), (b/B) pAb gegen NAP1L1 und (c/C) Überlagerungsbild beider Signale. (a-c) gleicher Bildausschnitt, mit (A-C) zugehöriger Vergrößerung. Bild-in-Bild jeweils Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

Hier fiel auf, dass Areale hoher WGA-Signalstärke durch NAP1L1 eher ausgespart blieben (s. Abbildung 25). Statt also in den Granula lokalisiert zu sein, scheint sich NAP1L1 (grün) viel mehr zwischen diesen im Zytoplasma oder anderen zellulären Strukturen zu befinden.



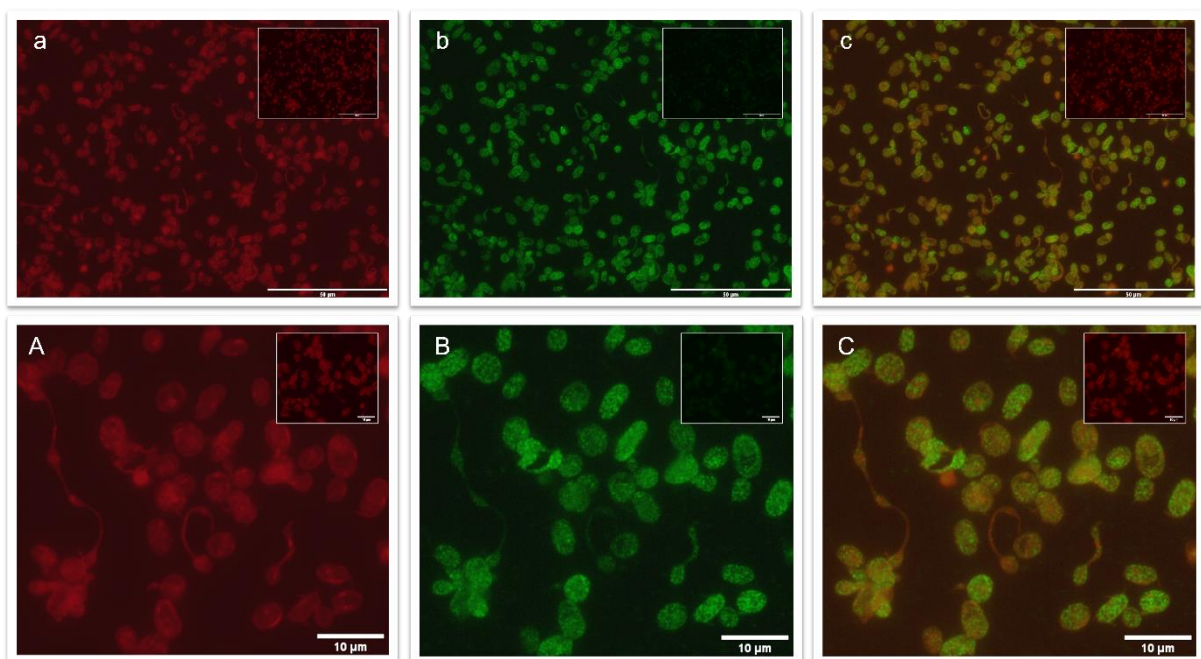
**Abbildung 25:** Peri-granuläre Lokalisation von NAP1L1 in humanen Thrombozyten (ICC)

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) WGA (Nachweis von Zellmembranen), (B) pAb gegen NAP1L1. (Pfeil) NAP1L1 ist vermehrt peri-granulär lokalisiert. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

## 4.11 Nachweis von NAP1L1-Protein in Thrombopoese

### 4.11.1 NAP1L1 in Morphogenese der Thrombozyten

Anukläre, humane Thrombozyten besitzen, zumindestens *in vitro*, die Fähigkeit eigene Abkömmlinge zu bilden<sup>9</sup>. Als nächstes wurden deshalb diese speziellen Thrombozyten-Vorläuferzellen des Blutes auf etwaige Auffälligkeiten in der Organisation und Lokalisation von NAP1L1 untersucht. Nach einer verlängerten Kultivierung der entnommenen Spenderthrombozyten über 24 Stunden, zeigten sich diese vermehrt als bekannte „*barbell-shaped*“-Thrombozytenfraktion (s. Abbildung 26).



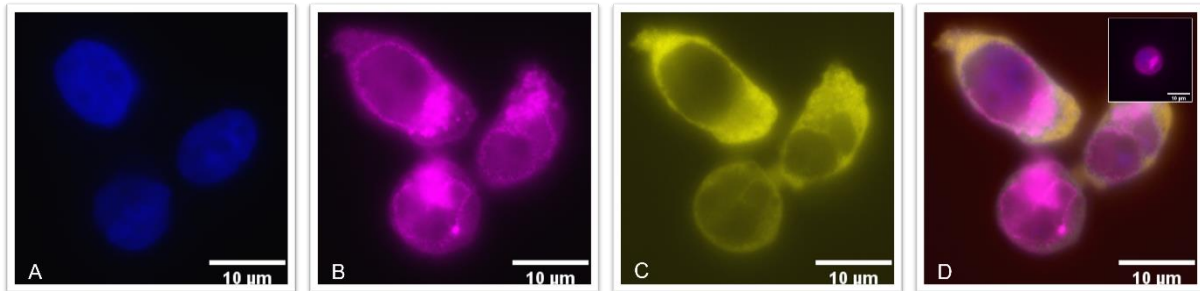
**Abbildung 26:** NAP1L1 wird während der Plättchen-Morphogenese auf entstehende Thrombozyten verteilt (ICC)

Fluoreszenzmikroskopie mit (a+A) Phalloidin (Nachweis von F-Aktin), (b+B) pAb gegen NAP1L1 und (c+C) Überlagerungsbild der humanen Thrombozyten eines Spenders unmittelbar nach Isolation (obere Reihe) und nach Inkubation für 24 Stunden (untere Reihe). Bild-in-Bild jeweils Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

NAP1L1 konnte sowohl in den entstehenden Thrombozyten, als auch in der schmalen Zytoplasmabrücke dazwischen beobachtet werden, jedoch in einer geringeren Signalstärke als in ruhenden, diskoiden Thrombozyten. Die Co-Färbung gegen filamentöses Aktin unterstreicht hierbei die stattgefundenen strukturellen Veränderungen der Thrombozyten (s. Abbildung 26, a/A).

#### 4.11.2 NAP1L1 in CD34<sup>+</sup>-HPC und *in vitro*-Megakaryozyten

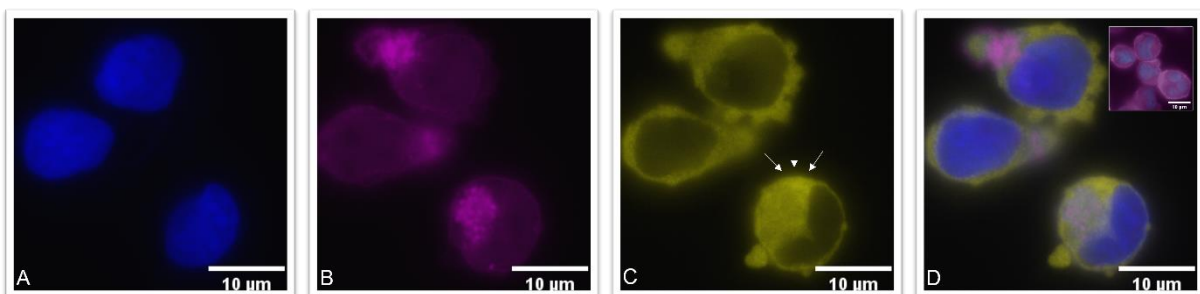
Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung konnte NAP1L1 über die gesamte Dauer der *in vitro* Megakaryozytenentwicklung nachgewiesen werden (s. Abbildungen 27 und 28).



**Abbildung 27:** NAP1L1 wird während der Interphase humaner CD34<sup>+</sup>-HPC zytoplasmatisch exprimiert (Tag 2)

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen am 2. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen Diese Abbildung repräsentiert n=10 unabhängige Experimente.

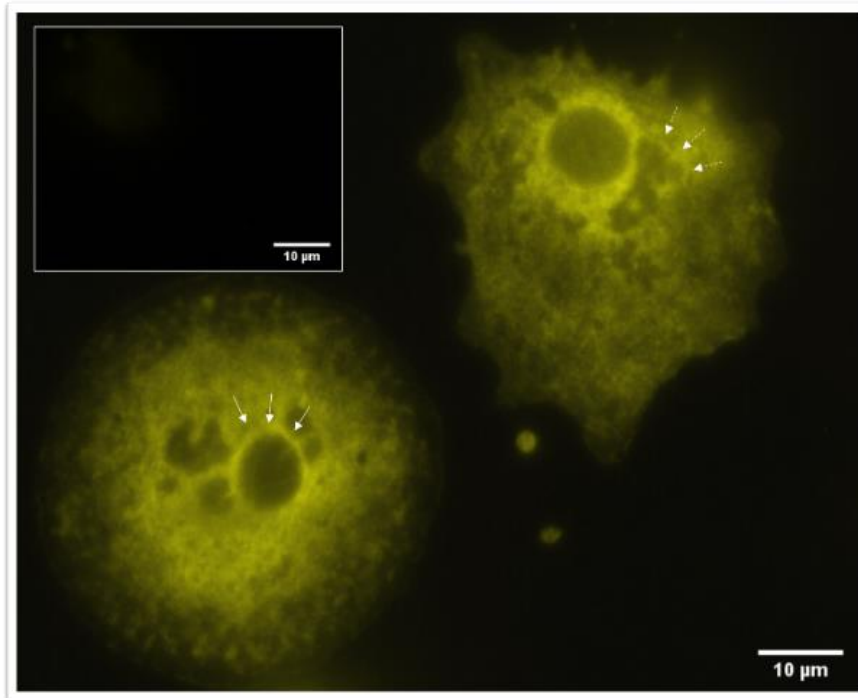
Dabei war NAP1L1 während der Interphase ausschließlich außerhalb des Nukleus nachweisbar und scheint sich in Assoziation zu Golgi-Apparat bzw. endoplasmatischen Retikulum zu konzentrieren, besonders deutlich nach Induktion der Megakaryozytendifferenzierung (s. Abbildung 29 und 30).



**Abbildung 28:** NAP1L1 ist in humanen CD34<sup>+</sup>-HPC perinukleär und in Assoziation mit dem Translationsapparat lokalisiert (Tag 11).

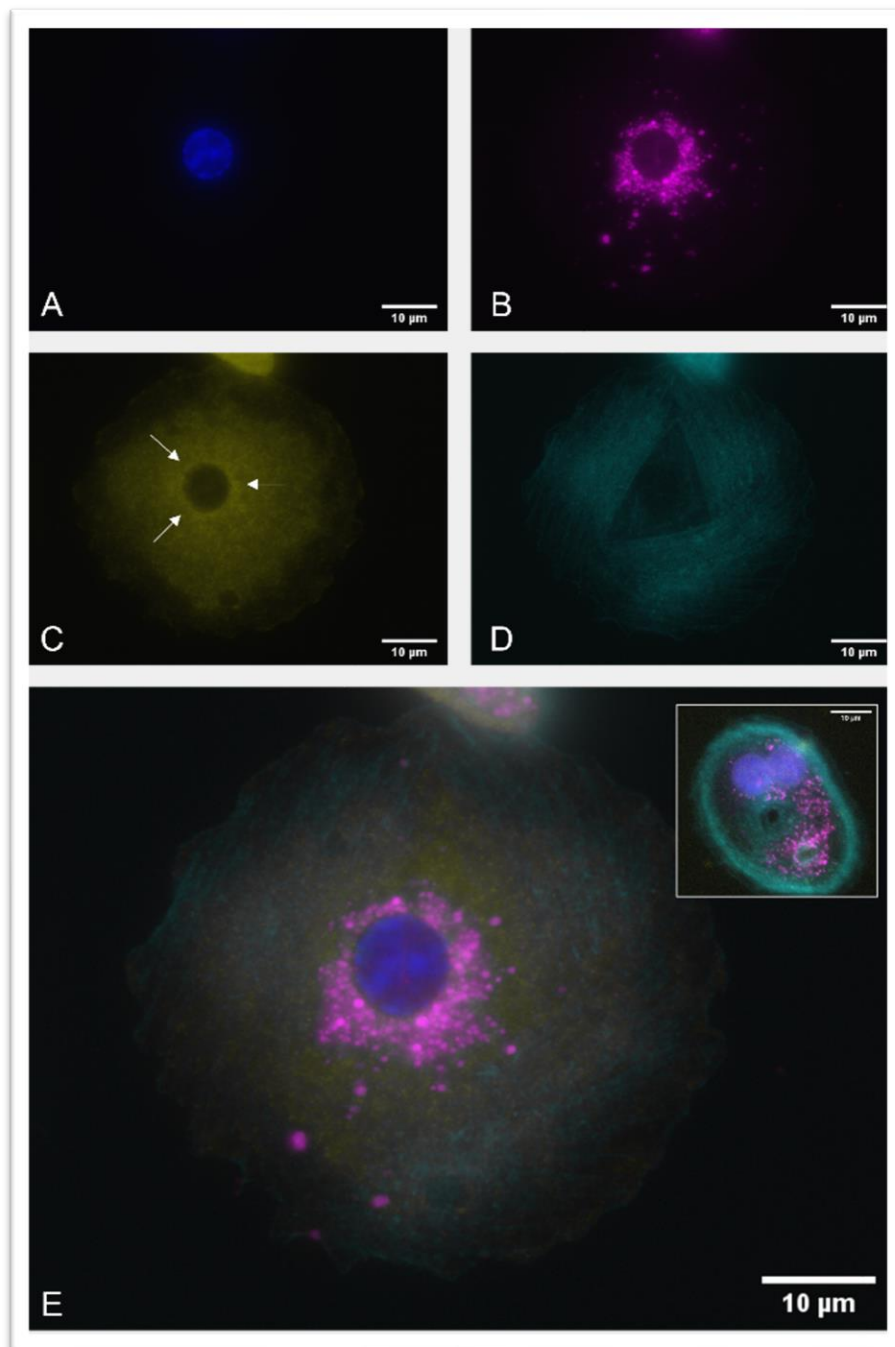
Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen am 11. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen Diese Abbildung repräsentiert n=10 unabhängige Experimente.

Der Nukleus, dessen DNA in Abbildung 29 nicht angefärbt wurde, wies dabei konstant ein reduziertes NAP1L1-Expressionsmuster auf (s. Abbildung 29, *Pfeile*).



**Abbildung 29:** NAP1L1 ist in humanen *in vitro* Megakaryozyten zytoplasmatisch lokalisiert, konzentriert sich jedoch perinukleär (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie von aus CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen differenzierten Megakaryozyten mit pAb gegen NAP1L1 und (Bild-in-Bild) normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.

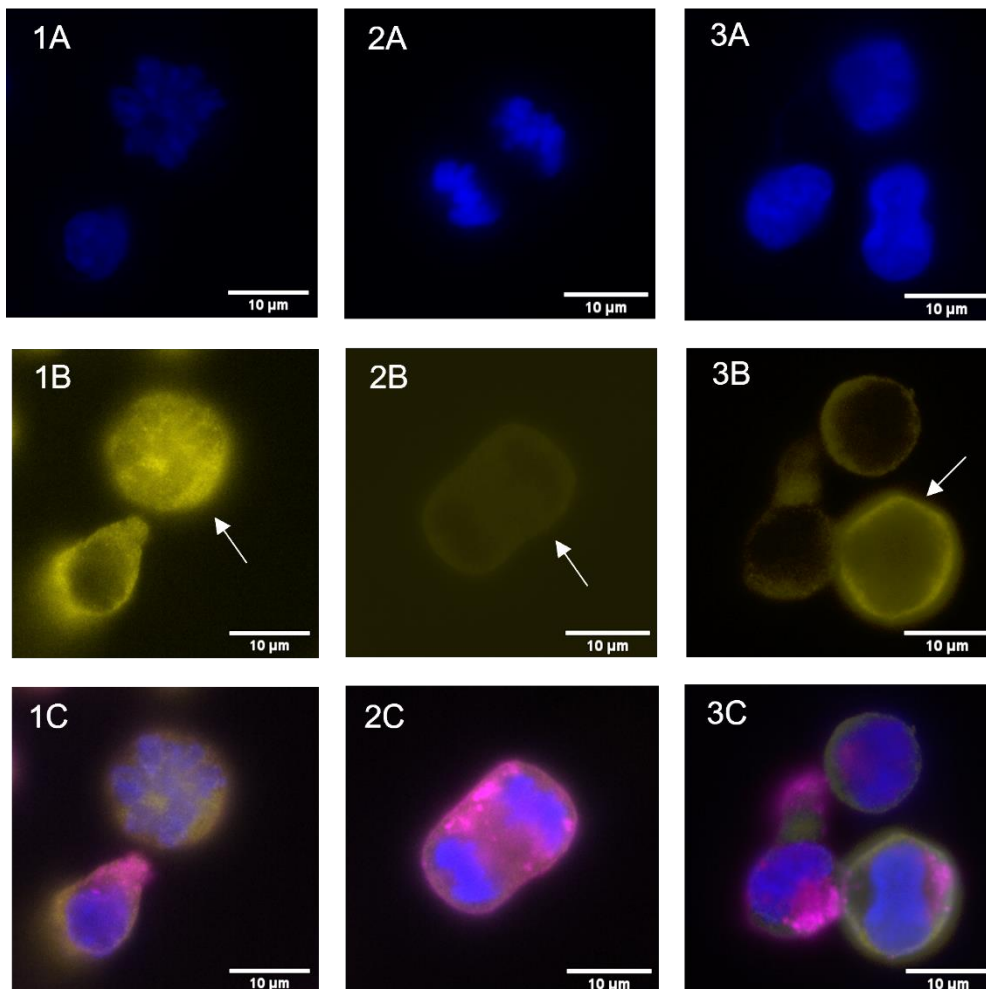


**Abbildung 30:** NAP1L1 konzentriert sich bei Zytoskelett-Reorganisation des *in vitro* Megakaryozyten verstärkt in perinukleärem Muster (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie von aus CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen differenzierten Megakaryozyten mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1, (D) Phalloidin (Nachweis von F-Aktin) und (Bild-in-Bild) normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.



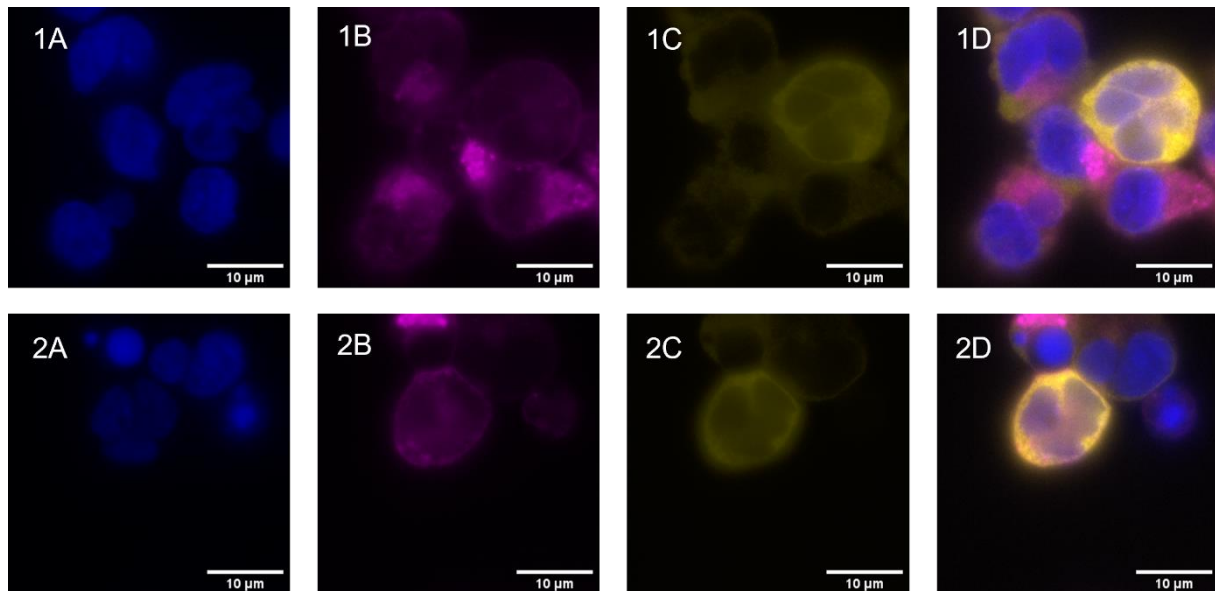
Während der M-Phase der CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen veränderte sich das Bild, so war während der frühen M-Phase mehr, danach deutlich weniger NAP1L1 fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar. Außerdem verminderte sich die Assoziation zur DNA mit Anaphase (s. Abbildung 31). 137



**Abbildung 31:** Lokalisation von NAP1L1 ist in humanen CD34<sup>+</sup>-HPC M-Phase abhängig (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) pAb gegen NAP1L1 und (C) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen an unterschiedlichen Kultivierungstagen. (1) Prometaphase, (2) Anaphase und (3) Telophase Diese Abbildung repräsentiert n=10 unabhängige Experimente.

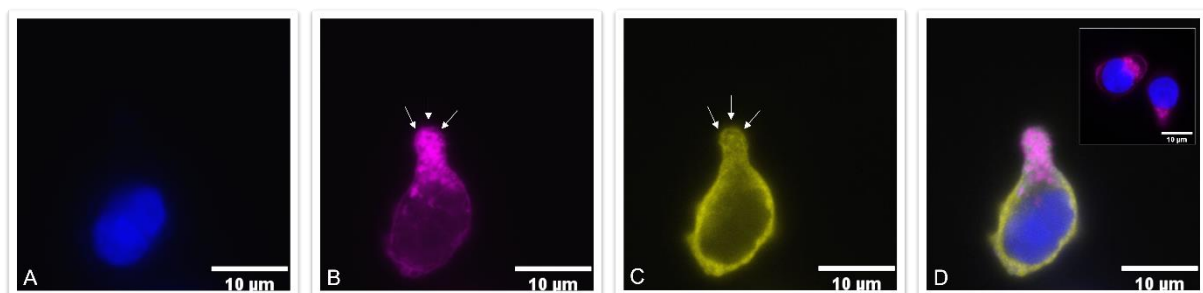
CD34<sup>+</sup>-hämatopoietische Progenitorzellen, welche einen deutlich gelappten Kern als Zeichen für Polyploidie aufwiesen, zeigten meist ein stärkeres NAP1L1-Signal in der ICC (s. Abbildung 32).



**Abbildung 32:** NAP1L1 ist in humanen, polyploiden CD34<sup>+</sup>-HPC vermehrt nachweisbar (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen an unterschiedlichen Kultivierungstagen (1 + 2). Diese Abbildung repräsentiert n=10 unabhängige Experimente.

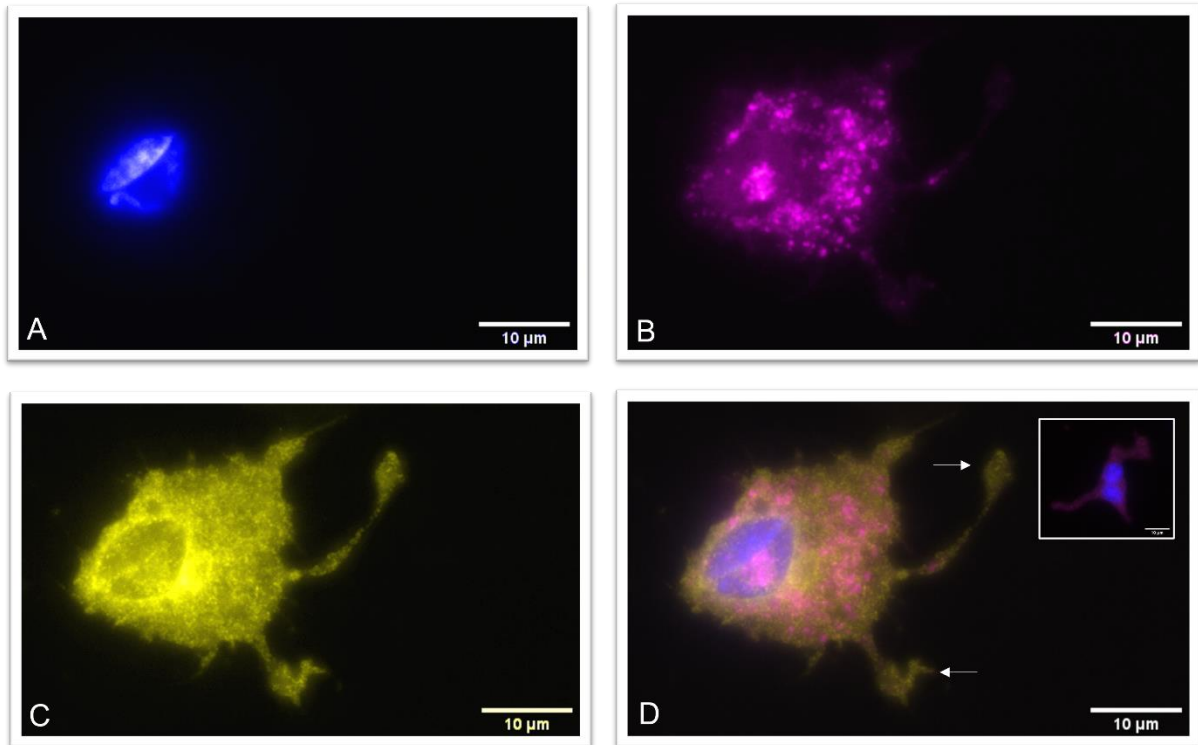
Im Rahmen der Migration der CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen ist NAP1L1 auch in Zellprotrusionen lokalisiert (s. Abbildung 33).



**Abbildung 33:** NAP1L1 ist im Rahmen der Migration von CD34<sup>+</sup>-HPC auch in den Zellfortsätzen lokalisiert (ICC).

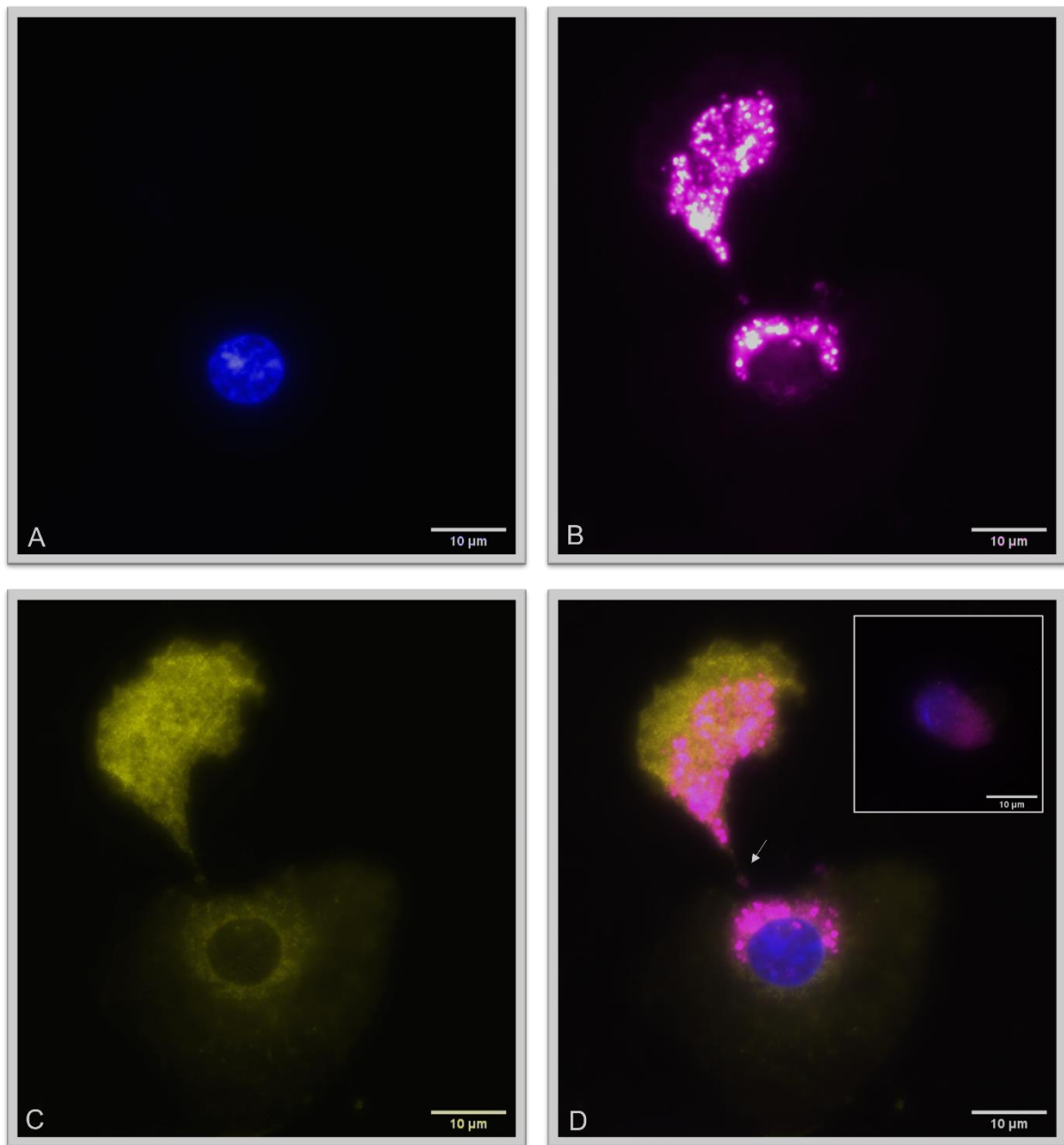
Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen am 5. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=10 unabhängige Experimente.

Nach Induktion der Differenzierung der CD34<sup>+</sup>- hämatopoietischer Progenitorzellen zu *in vitro*-Megakaryozyten konnte NAP1L1 in allen Stadien der Proplateletformation (s. Abbildung 34 bis 36) und damit den direkten Thrombozyten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden.



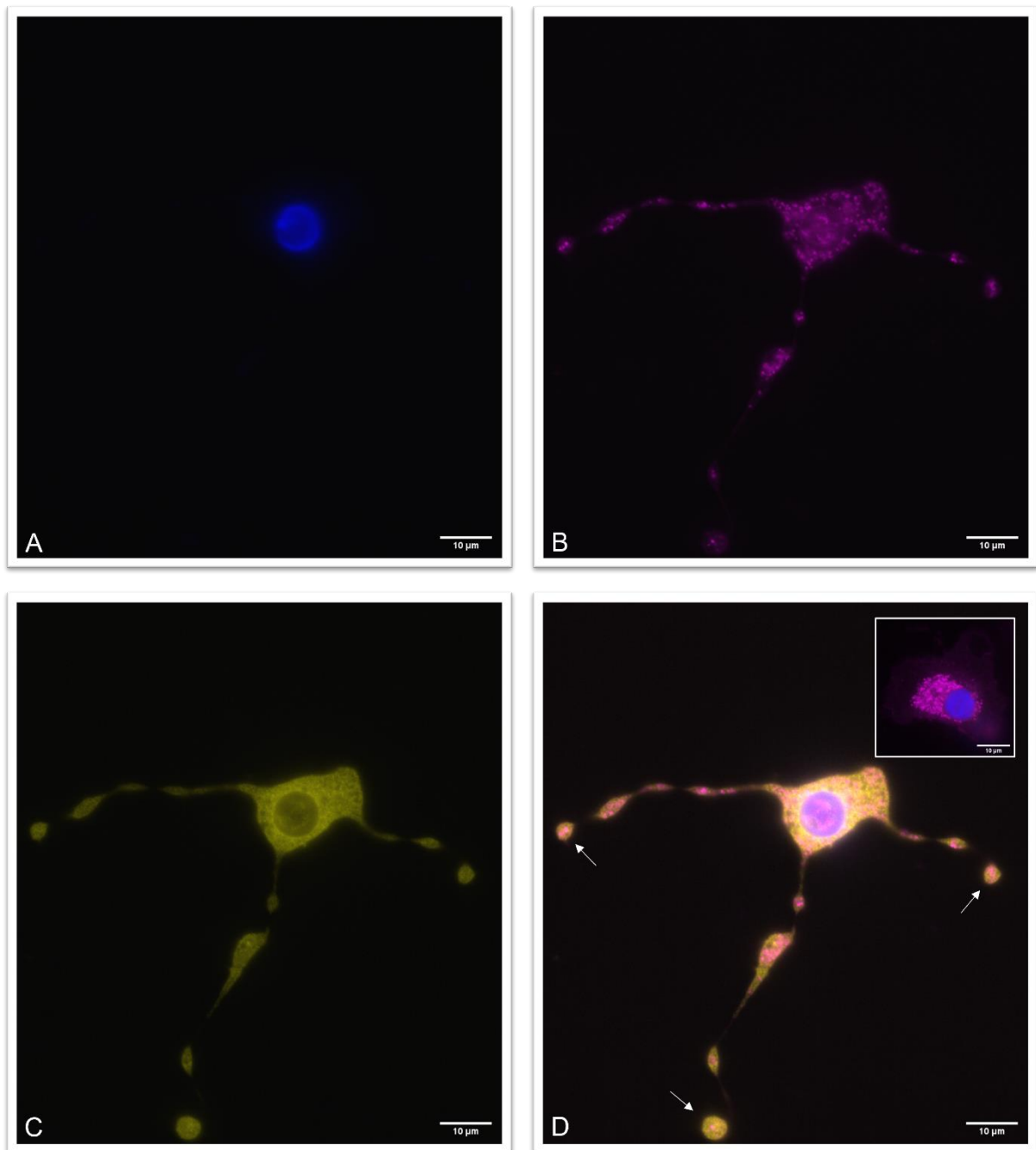
**Abbildung 34:** NAP1L1 in den Pseudopodien (Pfeile) eines *in vitro* Megakaryozyten vor Proplatelet-Formation.

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen am 14. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.



**Abbildung 35:** NAP1L1 im desintegrierten *in vitro* Megakaryozyten mit Zytoplasmabrücke (Pfeil) zu ausgestoßenem Nukleus.

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen am 14. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.



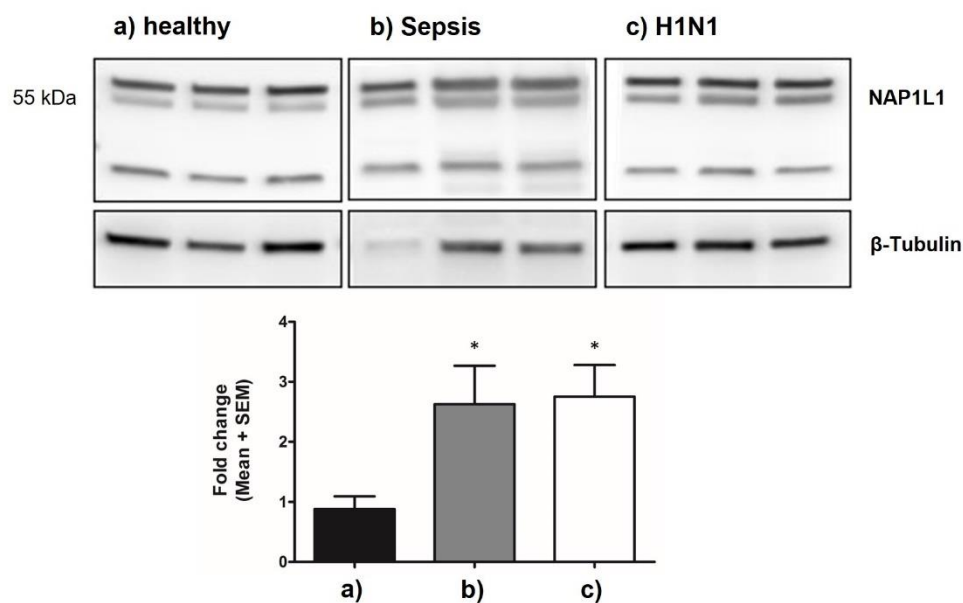
**Abbildung 36:** NAP1L1 in den entstehenden Proplatelet-Fortsätzen eines *in vitro*-Megakaryozyten mit Proplatelet-Freisetzung (Pfeile)

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen NAP1L1 und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischer Progenitorzellen am 14. Kultivierungstag. (Bild-in-Bild): Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=5 unabhängige Experimente.

## 4.12 NAP1L1 in humanen Thrombozyten im Rahmen von Infektionen

Durch Kooperationspartner der Universität von Utah bereitgestellte RNA-sequencing-Daten zeigten eine erhöhte Menge an NAP1L1-mRNA in Patienten mit den Krankheitsbildern „Sepsis“ bzw. „Infektion mit H1N1“ (s. Kapitel 1.5).

Diese Beobachtung wurde in dieser Arbeit erstmalig auf Proteinebene untersucht (s. Abbildung 37, oben).



**Abbildung 37:** Expression von NAP1L1 in humanen Thrombozyten in Sepsis und H1N1-Infektion

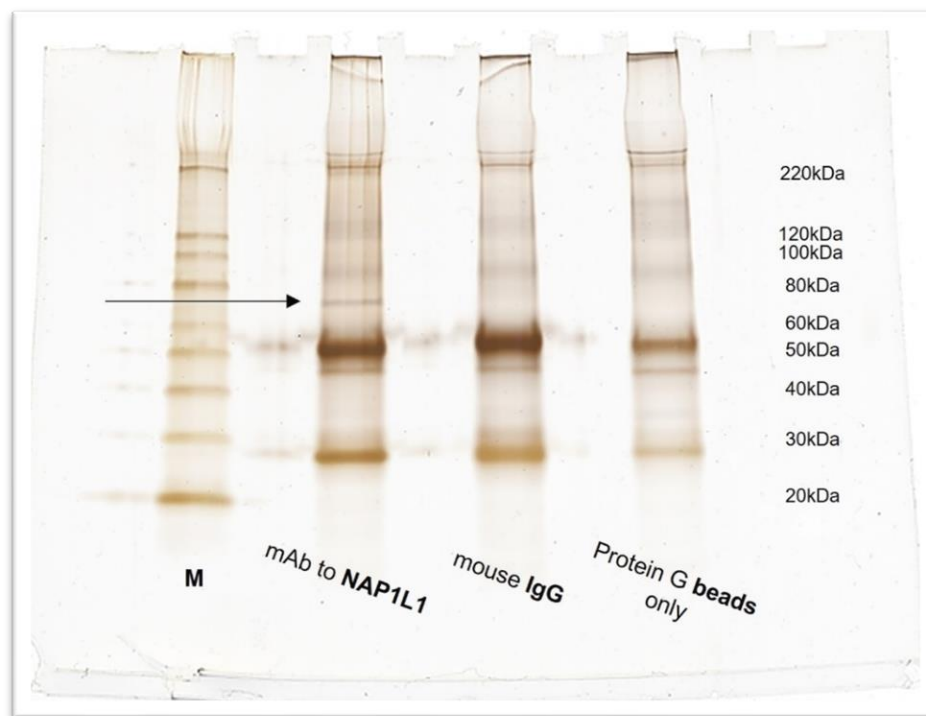
NAP1L1-WB von je sechs unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern je Gruppe (a-c). Semiquantitative Analyse der relativen Intensität der 55 kDa NAP1L1-Isoform in den Thrombozyten erkrankter gegenüber gesunden Spendern. SEM – standard error of mean. (\*) –  $p < 0,05$

Auch hier wurde NAP1L1 mit seinen Isoformen in den humanen Thrombozyten aller untersuchten Probanden nachgewiesen. Bei Vergleich gegenüber den Thrombozyten gesunder Spender im Sinne eines semiquantitativen Western-Blots (Ladungskontrolle  $\beta$ -Tubulin) zeigte sich die NAP1L1-Isoform einer Größe von 55 kDa in Patienten mit schwerer bakterieller (Sepsis) bzw. viraler Infektion (H1N1) etwa zwei-fach erhöht exprimiert (s. Abbildung 37, unten).

### 4.13 Native NAP1L1-Co-IP und Identifikation von DLAT (LC-MS/MS)

In den zurückliegenden Experimenten konnte das Vorhandensein von NAP1L1, einem nukleären Protein mit Aufgaben im Rahmen der Chromatin-Organisation, in humanen Thrombozyten wie auch seinen Vorläuferzellen zweifelsfrei belegt werden.

Um auch Hinweise auf eine potenzielle Funktion von NAP1L1 in Thrombozyten zu gewinnen, wurde die in Kapitel 3.8 beschriebene native Co-IP durchgeführt (s, Abbildung 38).

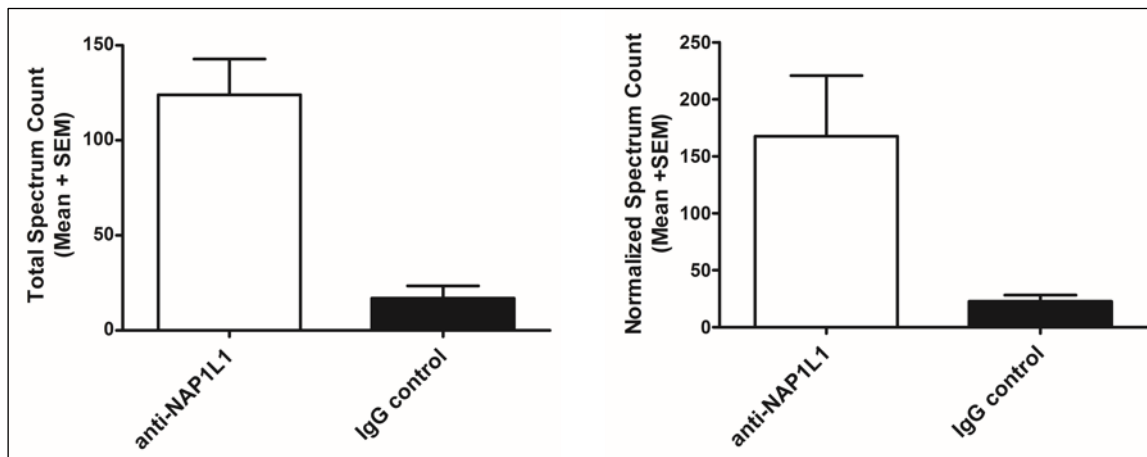


**Abbildung 38:** Spezifisches Immunpräzipitat von NAP1L1 in humanen Thrombozyten

SDS-PAGE eines Thrombozyten-Spendern nach nativer Co-IP, (M) - Proteinmassenstandard (mouse IgG) – unspezifisches Immunpräzipitat von murinen IgG-Gemisch (Protein G beads only) – unspezifisches Präzipitat der verwendeten magnetischen Protein G-beads ohne gebundene Antikörper

Abbildung 38 zeigt die Auftrennung des Proteingemisches humaner Thrombozyten mittels SDS-PAGE nach Präzipitation mit murinen, monoklonalen Antikörper gegen NAP1L1 (syn. „spezifischer Pulldown“) in MS-kompatibler Silberfärbung. In der Abbildung markiert (*Pfeil*) eine Proteinbande der Größe von ca. 70 kDa, welche durch alleinige Präzipitation mit Isotyp- (normal mouse IgG) und Bead-Kontrolle (beads only) nicht nachgewiesen werden konnte.

Die co-präzipitierte Bande und jeweils zwei negative Kontrollen gleicher Grösse und Position aus der Isotyp- und Bead-Lane des SDS-PAGE-Gels wurden aus dem Gel extrahiert und nach Trypsinverdau des Gels mit Hilfe von LC-MS/MS zuerst in drei technischen Replikaten auf ihre Zusammensetzung untersucht (s. Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Nachgewiesene Peptidmassespektren für DLAT

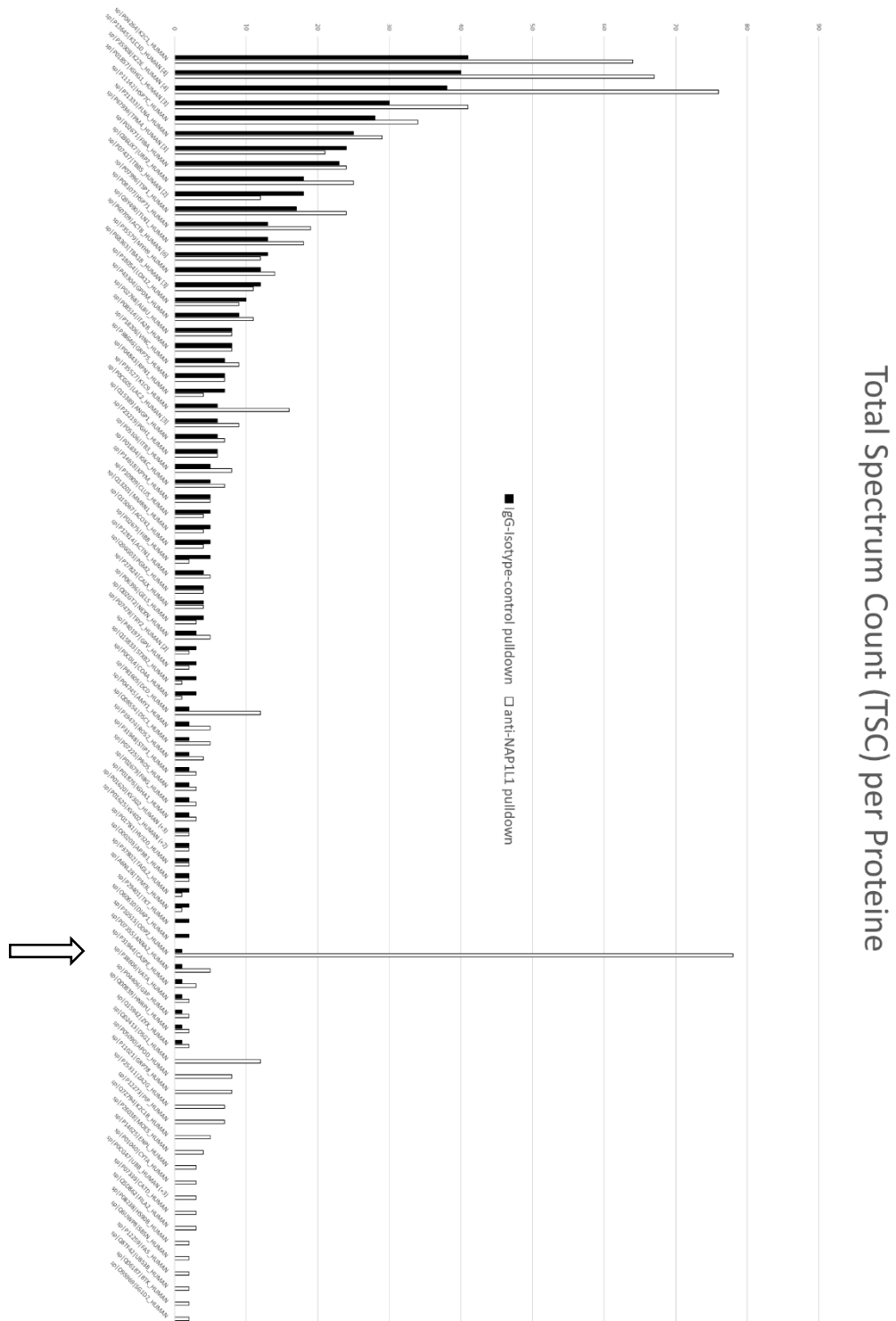
Vergleich der in LC-MS/MS nachgewiesenen Peptidmassespektren für DLAT (links – absolut, rechts – normalisiert auf die Gesamtspektrenmenge) in spezifischen (weiß, jeweils links) und unspezifischen (schwarz, jeweils rechts) Pulldown eines Thrombozyten-Spenders nach nativer CoIP. Drei-faches technisches Replikat, (SEM) – standard error of the mean

Bei Analyse der Gesamtmenge von zu einem bestimmten Protein zugehörigen Peptidmassespektren (TSC) fiel auf, dass die zu Dihydrolipoyllysinrest-Acetyltransferase (DLAT), einer Untereinheit des Multienzymkomplexes der Pyruvat-Dehydrogenase (syn.: PDC-E2), gehörigen Massespektren im Co-Präzipitat von NAP1L1 in sehr hoher Zahl, in den Kontrollen jedoch nur in sehr geringem Umfang vorkamen. Wenn die Gesamtzahl der für DLAT nachgewiesenen Peptidmassespektren auf die Gesamtzahl der nachgewiesenen Spektren normalisiert wurde, war dies ebenfalls der Fall.

In weiteren nativen Co-IPs mit nachfolgender LC-MS/MS-gestützter Proteinidentifikation von unterschiedlichen Thrombozytenspendern wurden insgesamt 9559 Tandemspektren aus der 70 kDa-Bande (4938) und ihrer zugehörigen Negativkontrolle (4621) isoliert. Davon entsprachen 1386 den für Peptide Prophete festgelegten Kriterien. Hiervon abgeleitet konnten insgesamt 98 Proteine identifiziert werden (inkl. Cluster).



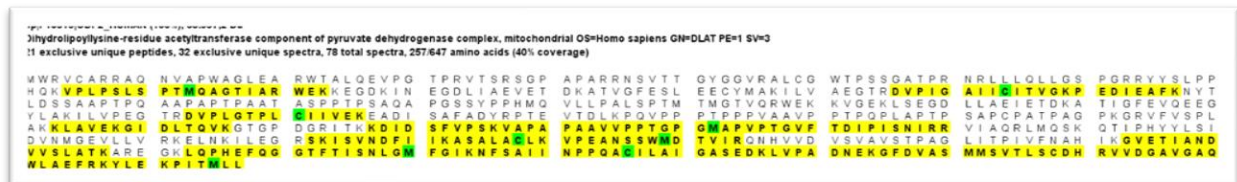
Bei absteigender Reihung dieser Proteine nach der Zahl ihrer zugehörigen Spektren (TSC) in der Negativkontrolle zeigte sich DLAT (Uni-Prot-ID: P10515 - ODP2\_HUMAN) nicht nur mit dem absolut höchsten TSC im spezifischen Co-präzipitat (weiß), noch vor häufigen Kontaminanten wie z.B. Keratin, sondern auch als einziges mit einer deutlichen Differenz im TSC von spezifischen (weiß) zu unspezifischen Immunpräzipitat (schwarz, s. Abbildung 40).



**Abbildung 40:** LC-MS/MS-Analyse der 70kDa-Bande der nativen NAP1L1-Co-IP

Vergleich der in LC-MS/MS nachgewiesenen Gesamtzahl an Peptidmassespektren geordnet nach Protein (*links*, mit UniProt-ID) links) im spezifischen Pulldown (*weiß*) und unspezifischen Pulldown (*schwarz*). (*Pfeil*): zu DLAT (P10515) gehörige Peptidmassespektren.

Weiterhin konnten im spezifischen Co-Immunopräzipitat in der 70-kDa-Bande 257 der 647 Aminosäuren (AS) von DLAT nachgewiesen werden (40% Coverage), während in der Negativkontrollen nur 2,3% der Aminosäure (AS) -sequenz von DLAT nachweisbar war (s. Abbildung 41).

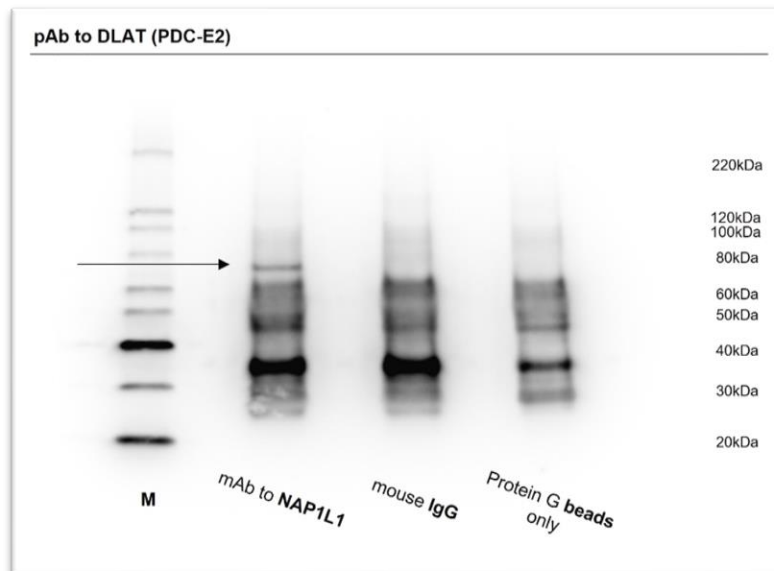


**Abbildung 41:** Analyse der in LC-MS/MS nachgewiesenen (gelb) Anteile an der gesamten Aminosäuresequenz (weiß) von DLAT

DLAT konnte somit bereits mit hoher Sicherheit als spezifischer Pulldown der durchgeführten nativen Co-Immunopräzipitation identifiziert werden.

#### 4.14 Native NAP1L1-Co-IP und Identifikation von DLAT (WB)

Zusätzlich wurde im Rahmen einer nativen Co-IP das aufgetrennte Immunopräzipitat mittels Western Blot erneut auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit einem polyklonalen Antikörper gegen DLAT inkubiert (s. Abbildung 42).



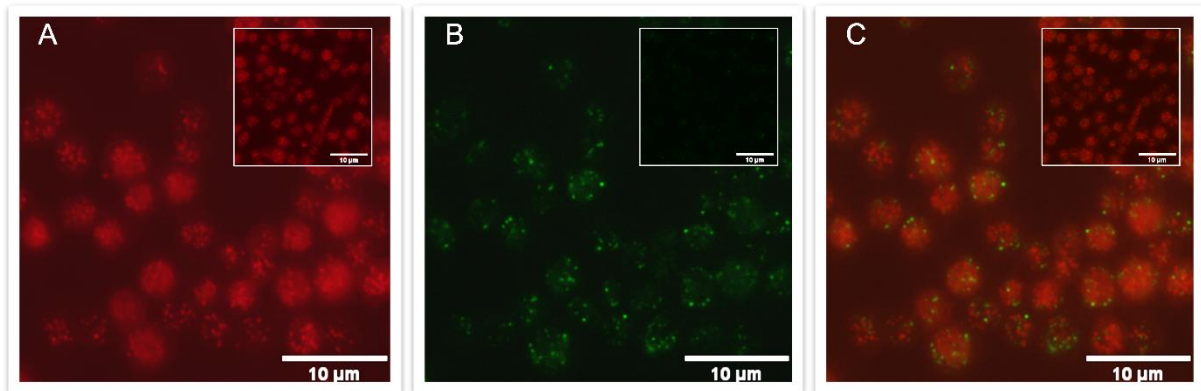
**Abbildung 42:** Nachweis von DLAT im spezifischen Co-Immunopräzipitat von NAP1L1 (WB).

WB mit pAb gegen DLAT eines Thrombozyten-Spenders unmittelbar nach Thrombozyten-Isolation. (Pfeil) - Nachweis von DLAT bei erwarteten 70kDa, (M) - Proteinmassesstandard

In der Position der im Vorfeld per LC-MS/MS analysierten Bande bei ca. 70kDa konnte DLAT auf diese Weise auch immuno-spezifisch im NAP1L1-Co-Präzipitat nachgewiesen werden, während es in den unspezifischen Kontrollen erneut nicht detektierbar war.

#### 4.15 Nachweis von DLAT-Protein in Thrombozyten (ICC)

Um DLAT in humanen Thrombozyten direkt sichtbar zu machen, wurden diese wie in Kapitel 3.11 geschildert, mit Hilfe der ICC angefärbt und mikroskopisch untersucht (s. Abbildung 43).

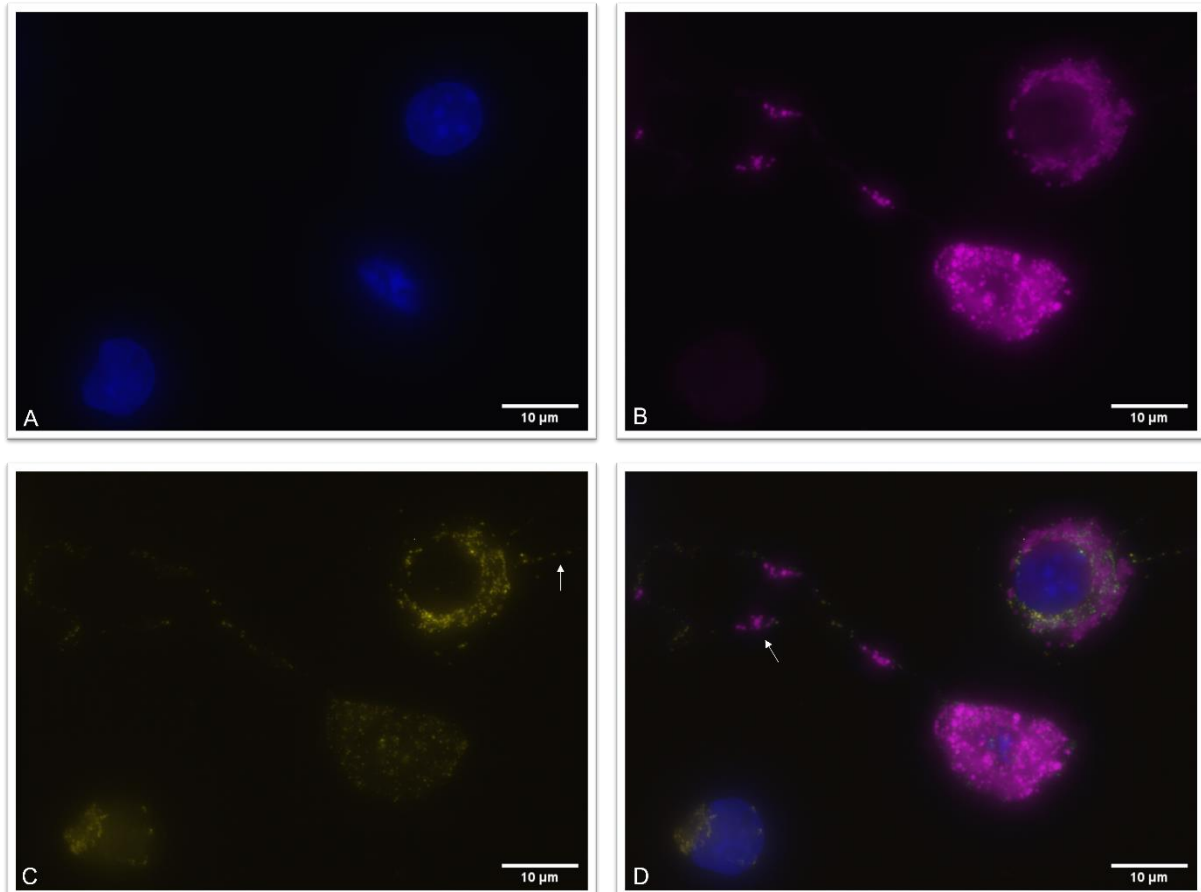


**Abbildung 43:** DLAT ist in humanen Thrombozyten exprimiert (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (B) mAb gegen DLAT und (C) Überlagerungsbild der humanen Thrombozyten eines Spenders unmittelbar nach Isolation. Bild-in-Bild jeweils Signal von normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

#### 4.16 Nachweis von DLAT-Protein in *in vitro*-Megakaryozyten

DLAT konnte ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie in *in vitro* Megakaryozyten sichtbar gemacht werden. Hier war ein sich von perinuklear aus fein verzweigendes Signal auffällig, welches sich bis in die Extensionen bei Proplatelet-Formation fortsetzte (s. Abbildung 44).

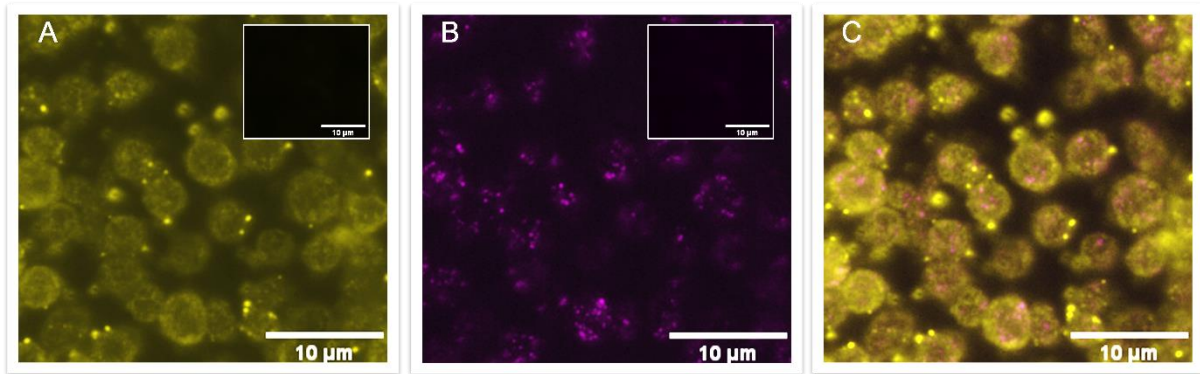


**Abbildung 44:** Nachweis von DLAT ist in *in vitro*-Megakaryozyten und ihren Proplatelet-Fortsätzen (ICC)

Fluoreszenzmikroskopie mit (A) DAPI (Nachweis von DNA), (B) WGA (Nachweis von membranständigen Lektinen), (C) pAb gegen DLAT und (D) Überlagerungsbild der gepoolten CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen am 14. Kultivierungstag. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

#### 4.17 Nachweis von NAP1L1 und DLAT in humanen Thrombozyten

NAP1L1 als auch sein in der nativen Co-IP identifizierter Interaktionspartner DLAT konnten in humanen Thrombozyten fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (s. Abbildung 45).

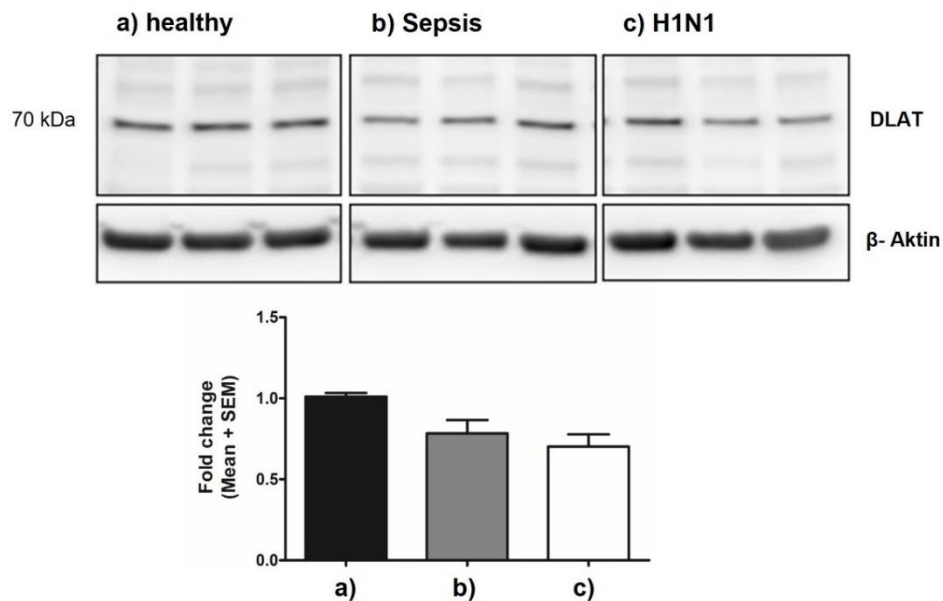


**Abbildung 45:** NAP1L1 und DLAT werden in humanen Thrombozyten gemeinsam exprimiert (ICC).

Fluoreszenzmikroskopie von humanen Thrombozyten eines Spenders mit (A) pAb gegen NAP1L1, (B) mAb gegen DLAT und (C) Überlagerungsbild. (Bild-in-Bild) normal-IgG-Isotyp-Kontrolle unter den gleichen Aufnahmebedingungen. Diese Abbildung repräsentiert n=3 unabhängige Experimente.

#### 4.18 DLAT in humanen Thrombozyten im Rahmen von Infektionen

In Kapitel 4.12, Abbildung 37 konnte gezeigt werden, dass NAP1L1 in den humanen Thrombozyten von Spendern mit schwerer bakterieller und viraler Infektion vermehrt exprimiert wurde. Angesichts dessen war die Expression des potenziellen Interaktionspartners DLAT in den gleichen Patienten von Interesse (s. Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Expression von DLAT in humanen Thrombozyten in Sepsis und H1N1-Infektion

DLAT-WB von je sechs unterschiedlichen Thrombozyten-Spendern je Gruppe (a-c). Semiquantitative Analyse der relativen Intensität der DLAT-Bande Thrombozyten erkrankter gegenüber gesunden Spendern. SEM – standard error of mean.

Bei Vergleich gegenüber den Thrombozyten gesunder Spender im Rahmen eines semiquantitativen Western-Blots zeigte sich eine tendenziell gering reduzierte Expression von DLAT in den Plättchen aus erkrankten Individuen im Vergleich zu denen aus Gesunden.



## 5 Diskussion

### 5.1 Überblick

Humane Thrombozyten weisen Nucleosome-assembly-Protein-1-like-1 (NAP1L1) auf, welches in dieser Arbeit zum ersten Mal in Blutplättchen beschrieben wird. Dieses Protein wird von humanen CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Progenitorzellen im Rahmen der *in vitro* Thrombopoese translatiert und vom *in vitro* kultivierten Megakaryozyten aktiv in die entstehenden Pre- bzw. Proplatelets transferiert. Zusätzlich zur Proteinebene wird NAP1L1-mRNA über den gesamten Zeitraum der *in vitro* Inkubation des Thrombozyten exprimiert. Weiterhin wird NAP1L1-mRNA auch in humanen Thrombozyten stabil exprimiert, ohne Nachweis einer Degradation. NAP1L1 kommt im humanen Thrombozyten, wie auch in seinen Vorläuferzellen *in vitro*, in drei unterschiedlich großen Protein-Isoformen vor. Mindestens zwei dieser NAP1L1-Isoformen sind, aller Wahrscheinlichkeit nach, Produkte von alternativem Splicing. Die korrespondierenden alternativen NAP1L1-Transkripte werden ebenfalls stabil über den gesamten Zeitraum der *in vitro* Thrombopoese und im humanen Thrombozyten exprimiert. Die 53kDa-NAP1L1-Isoform wird in humanen Thrombozyten als Reaktion auf bakterielle bzw. virale Infektion vermehrt exprimiert. Im humanen Thrombozyten ist die zentrale Untereinheit E2 des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes (DLAT), welche die Acetylierung des Coenzym A vermittelt, an NAP1L1 gebunden. In Reaktion, auf vorgenannten Krankheitszustände, wird DLAT jedoch tendenziell vermindert im Thrombozyten exprimiert. In den *in vitro* kultivierten Vorläuferzellen des Thrombozyten ist NAP1L1 im Gegensatz zu anderen Zelltypen nicht bzw. kaum nukleär nachweisbar, auch nicht in Abhängigkeit von Zellzyklus oder Zellreifung, sondern konzentriert sich zytoplasmatisch und dort verstärkt perinukleär, in Regionen, in denen klassischerweise die Translationsmaschinerie der Zelle lokalisiert ist.

### 5.2 NAP1L1-Isoformen

Die beschriebenen NAP1L1-WBs humaner Thrombozyten zeigten unerwartete Besonderheiten: zum einen das Vorkommen von drei NAP1L1-Isotypen statt nur einem NAP1L1-Protein und zum anderen ein beobachtetes Molekulargewicht, welches sich vom kalkulierten MW unterschied.

Für diese Erscheinungen kommen mehrere Gründe in Frage:

(1) Proteolyse: die schwerste Bande ist das intakte Protein, während die leichteren Banden Produkte spezifischer oder unspezifischer enzymatischer Spaltung sind

(2) Unspezifische Bindung des Antikörpers: der verwendete Antikörper bindet neben dem Zielprotein noch an andere Strukturen

(3) Alternatives Splicing: Es existieren mehrere zum gleichen Gen gehörige mRNAs deren jeweiliges Translationsprodukt das Ziel-Epitop des verwendeten Antikörpers aufweist.

Zu (1): Bei jedem Zellaufschluss kann es zur unspezifischen Proteolyse von Zielproteinen kommen. Zur Lyse der Thrombozyten wurde sowohl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E64, Leupeptin, Pepstatin A) beziehungsweise Tris-HCl-SDS-Puffer mit und ohne Zusatz von  $\beta$ -ME verwendet. Beides sind etablierte Verfahren um einer unspezifischen, proteolytischen Zersetzung des Proteingemisches zu begegnen<sup>136</sup>.

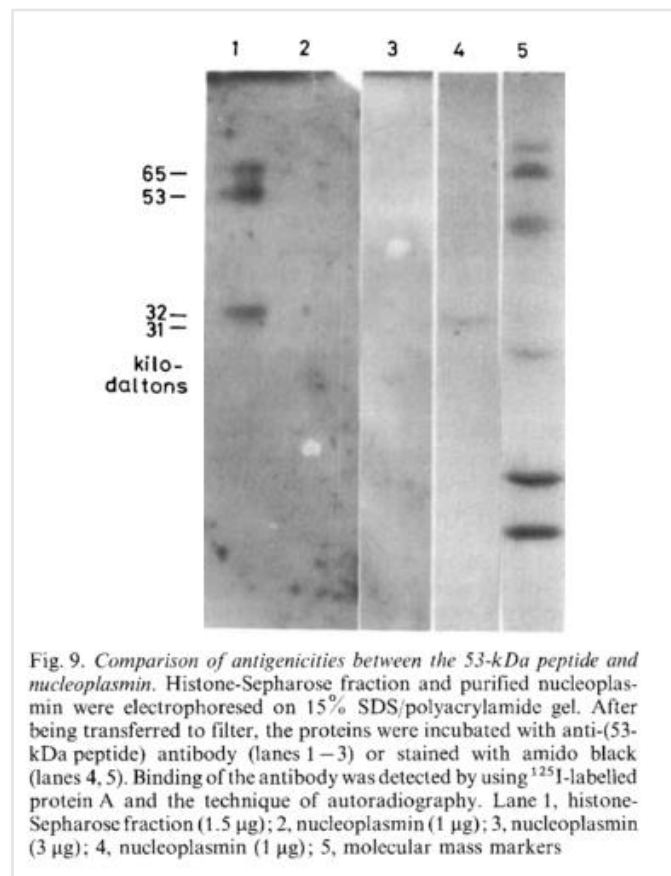
Dass es sich bei den NAP1L1-Isoformen um Abbauprodukte einer spezifischen, intrazellulären Proteindegradation handelt, kann nicht definitiv ausgeschlossen werden. Jedoch kam es zu keiner beobachteten Zunahme der 53kDa und 38kDa-Bande nach 12-stündiger Übernachtsinkubation von Thrombozyten in M199-Medium. Auch wurde eine von Ishimi et al.<sup>27</sup> beschriebene Zunahme der 37kDa-Form nach wiederholten Einfrier-/Auftau-Zyklen des Proteingemisches in dieser Studie nicht gesehen.

Zu (2): Die Peptide Competition Assays (PCA) blockierten im WB verlässlich alle drei vermuteten Isoformen von NAP1L1, die Wahrscheinlichkeit, dass alle drei Proteine die immunogene Peptidsequenz aufweisen, ist demnach als sehr hoch einzuschätzen.

Zu (3): Bereits bei der erstmaligen Beschreibung von humanen NAP1L1 durch Ishimi et al.<sup>27</sup> wurden drei Isoformen im WB nachgewiesen, welche genau das gleiche Muster zeigen (s. Abbildung 47, *Lane 1*).

Im Gegensatz zum dort verwendeten polyklonalen Antikörpergemisch aus dem Serum immunisierter Ratten, wurden in dieser Arbeit kommerziell erzeugte, aufgereinigte

monoklonale und polyklonale Antikörper aus zwei unterschiedlichen Spezies verwendet. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die drei unterschiedlichen Proteinsignale bei Verwendung vollkommen unterschiedlicher Antikörper in verschiedenen Zelltypen durch eine jeweils gleiche unspezifische Bindung der Antikörper zustande kommen würde.



**Abbildung 47:** Nachweis von NAP1L in WB von Ishimi et al. (1984)

Auch Okuwaki et al.<sup>137</sup> detektierten NAP1L1 per WB in humanen Zellen (HeLa) in Form der von Ishimi et al. und in dieser Arbeit beschriebenen Isoformen, machten jedoch zu deren beobachteten Größe keine Aussage.

In der hier vorgelegten Arbeit konnten während der humanen *in vitro* Thrombopoese als auch in humanen Thrombozyten mindestens drei unterschiedlich lange NAP1L1-Transkripte nachgewiesen werden, von denen zwei definitiv durch Sanger-Sequenzierung als NAP1L1-mRNA identifiziert wurden. Dieselben alternativen

Transkripte konnten auch in einem anderen humanen Zelltyp (HEK) nachgewiesen werden.

Die Existenz von drei NAP1L1-Isotypen, erklärt die o.g. Beobachtungen auf Proteinebene schlüssig.

Für eine Abweichung des in der SDS-PAGE anhand des Massestandards beobachteten Massegewichtes von der mittels AS-Sequenz theoretisch kalkulierten Masse kann es verschiedene Gründe geben:

(1) Unspezifischer Antikörperrnachweis: Der verwendete primäre Antikörper bindet neben dem Zielprotein auch an andere Strukturen, welche dementsprechend eine andere Größe aufweisen.

(2) Bindungspartner: Am Zielprotein gebundene Interaktionspartner oder Substrate verändern MW und/oder Migrationsgeschwindigkeit, auch die (Homo)-Dimerisierung kommt hier als Ursache in Frage.

(3) Post-Translationale-Modifikation (PTM): Die AS-Sequenz wird *in vivo* z.B. durch Phosphorylierungen ergänzt, welche in einem veränderten Migrationsverhalten im Gel resultieren und Masseunterschiede erzeugen.

Zu (1): Bei jedem Proteinnachweis mithilfe von Antikörpern kann es zu unspezifischen Bindungen kommen, allerdings zeigte der beschriebene PCA, dass es sich bei der Bindung des Antikörpers an die betreffenden Proteine am ehesten um eine spezifische Bindung handelt.

Zu (2): Ein Teil der Proben wurden nach dem initialen Zellaufschluss mit Tris-HCl-SDS behandelt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Verbleibende etwaige Disulfidbrückenbindungen wurden durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Sekundär- bis Quartärstrukturen von Proteinen sollten nach dieser Behandlung nicht verblieben sein<sup>138</sup>. Trotzdem zeigten sich dieselben drei NAP1L1-Isoformen.

Zu (3): Die AS-Sequenz von NAP1L1 zeigt mehrere PTM-Motive, welche in ihrer Gesamtheit für ein geändertes Migrationsverhalten im Gel der SDS-PAGE sorgen können<sup>139,140</sup>. Darunter sind: Phosphorylierung<sup>141</sup>, N-Acetylierung<sup>142</sup>, Farnesylierung<sup>143</sup> und Polyglutamylierung<sup>144</sup>. Letztere erscheint in diesem Kontext

besonders interessant. Die enzymatisch vermittelte Peptidbindung eines freien Glutamats (Glu/E) an die  $\gamma$ -Carboxy-Gruppe bestehender Glu-reicher Sequenzen bestimmter Proteine und die folgende Etablierung von Glu-Seitenketten, hat Konformationsänderungen zur Folge, welche das Bindungsverhalten für Interaktionspartner, z.B. im Fall von MT und Tau, wesentlich beeinflussen<sup>145</sup>. Der Kreis von Proteinen welche sich durch saure, stark Glu-reiche Seitenketten und Glu-reiche Sequenzmotive auszeichnen ist eher klein: Nach Immuno-Affinitätschromatographie mit anti-GT335 (einem etablierten Antikörper gegen Polyglutamylierungsmotive) und LC-MS/MS-basierter Analyse konnte er in HeLa auf knapp 50 spezifische Proteine eingegrenzt werden<sup>146</sup>. Neben MT werden einzelne Mitglieder der NAP-Familie als klassische Vertreter dieser Gruppe angesehen<sup>147</sup> und auch Neurofilament ist ein Beispiel für ein Glu-reiches Strukturmotiv<sup>148</sup>. Die drei Neurofilament-UE NF-L, NF-M und NF-H zeigen in SDS-PAGE eine stark veränderte Migration und extreme Abweichungen im Molekulargewicht von bis zu 40% im Vergleich zu anderen Methoden<sup>149</sup>. Georges und Mushynski<sup>150</sup> wiesen nach, dass die selektive Neutralisierung der negativ geladenen Carboxyl-Gruppen der Glu-Motive durch Carbodiimide im Vorfeld der Gelelektrophorese dieses abweichende Migrationsverhalten rückgängig macht.

Auch NAP1L1 weist als Teil der NAP-Familie diese Gruppen auf und insbesondere die dritte Domäne am C-terminalen Ende ist entscheidend für den Glutamylierungsgrad des Proteins, wie Dijk et al.<sup>146</sup> mittels einer Kombination aus rekombinanten NAP1L1-Chimären und einem radioaktiven *in vitro*-Polyglutamylierungs-Assay zeigen konnten. Fehlt diese, wie z.B. im bei o.g. Versuchen verwendeten (murinen) NAP3 oder NAP4 ist diese PTM *in vitro* nicht oder nur geringfügig detektierbar.

Für das Tubulin-Tyrosin-Ligase-like Protein 4 (TTLL4) und die Cytosolische Carboxypeptidase 6 (CCP6), welche die Rückreaktion vermittelt, konnte bereits gezeigt werden, dass sie in murinen wie auch humanen Megakaryozyten (CD41<sup>+</sup>) exprimiert werden<sup>151</sup>. TTLL4 ist auch diejenige nicht-Tubulin-spezifische Polyglutamylase, welche nachgewiesenermaßen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in HeLa diese PTM an NAP1L1 vermittelt<sup>146</sup>. TTLL10 ist ein verwandtes Protein mit der

gleichen Funktion, jedoch ist dessen Vorhandensein und Polyglutamylierung von NAP1L1 bislang nur für spezielle murine Zellen gezeigt worden<sup>152</sup>.

Die Annahme, dass NAP1L1 auch in humanen Thrombozyten in o.g. Art und Weise modifiziert ist, liegt also nahe, da alle Voraussetzungen dafür erfüllt sind und diese PTM von NAP1L1 in humanen CD41<sub>+</sub>-Megakaryozyten bereits *in vitro* nachgewiesen wurde. Auch wenn der definitive Nachweis, z.B. mit anti-GT335 gegen ein präzipitiertes NAP1L1 aus humanen Plättchen aussteht. Sollte NAP1L1 jedoch in Hinsicht dieser PTM im Thrombozyten unmodifiziert vorliegen, so wäre eine vollständige Deglutamylierung des Proteins im Vorfeld der Proplatelet-Formation notwendig, was sehr ungewöhnlich wäre.

### 5.2.1 Zusammenfassung

Zusammenfassend wird das tatsächliche Vorkommen von drei alternativ gespleißten NAP1L1-Isoformen in humanen Thrombozyten und ihren Vorläuferzellen durch diese Arbeit mit hoher Sicherheit nachgewiesen, eine Abweichung des beobachteten MW von den kalkulierten ca. 45kDa erklärt sich durch die umfangreichen Möglichkeiten der PTM, von denen insbesondere die Polyglutamylierung als spezifische Eigenschaft von NAP1L1 ins Auge fällt.

Letztendlich ist bei genauer Betrachtung der Vorarbeiten zu mNAP1 bzw. hNAP1L1 ersichtlich, dass erstens immer eine Abweichung vom kalkulierten MW auftrat und zweitens das Vorkommen von bis zu drei nachgewiesenen Proteinen im NAP1L1-WB kein neues Phänomen ist, für das jedoch bislang keine sichere Erklärung gefunden wurde (s. Tabelle 6). In späteren Arbeiten wurde dann keine Aussage mehr getroffen, welches MW bzw. wieviel oder welche NAP1-Form(en) beobachtet wurde(n)<sup>153</sup>.

**Tabelle 6:** Übersicht über Vorarbeiten zu NAP1L1

| Autor                               | Größe - beobachtet | Größe - kalkuliert | Zellen bzw. Spezies | Nachweisverfahren                                  | Kommentar                               |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--|---|
| Ishimi et al. (1984) <sup>27</sup>  | 65, 53 und 32 kDa  | 43kDa              | FM3A, murin         | Sedimentation und Ultrazentrifugation, SDS-PAGE/WB | Erstbeschreibung                        |
| Ishimi et al. (1985) <sup>154</sup> | 58 und 53 kDa      | 45kDa              | HeLa S3, human      | SDS-PAGE/WB  | Beide mit Nucleosome-Assembly-Aktivität |

|                                     |               |       |                          |             |                       |
|-------------------------------------|---------------|-------|--------------------------|-------------|-----------------------|
| Ishimi et al. (1987) <sup>155</sup> | 53 kDa        | 43kDa | FM3A, murin              | SDS-PAGE    |                       |
| Ishimi et al. (1991) <sup>156</sup> | 60 kDa        | 47kDa | E.coli, yDNA transfected | SDS-PAGE/WB | Transfektion und Tags |
| Clark et al. (2008) <sup>157</sup>  | 58 und 53 kDa | 45kDa | PAECs, human             | SDS-PAGE/WB |                       |

### 5.3 Lokalisation von NAP1L1 in CD34<sup>+</sup>-HPC und humanen Thrombozyten

Die 53kDa-Form von NAP1L1 wurde zuerst als diejenige mit der eigentlichen „Nucleosome-assembly“-Funktion angesehen<sup>27</sup>. Jedoch zeigten Kompartiment-spezifische WBs in HeLa, dass nur die größte von vermutlich drei NAP1L1-Isoformen M-Phase-abhängig teilweise im Nukleus der Zellen vorkam, während die zwei kleineren Isoformen sich während aller Stadien des Zellzyklus im Zytoplasma befanden<sup>158</sup>. In einer anderen Kompartiment-spezifischen Untersuchung aus HeLa ist eher eine ausgeglichene Verteilung der NAP1L1s zwischen diesen Kompartimenten beobachtet worden, leider wird dort keine Ladungskontrolle gezeigt<sup>159</sup>. Ebenfalls in HeLa konnte im Gegensatz dazu Zellzyklus-synchronisiert und ICC-basiert durch eine andere Arbeitsgruppe nahezu kein NAP1L1 im Zellkern nachgewiesen werden<sup>137</sup>.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ICC-Versuche an CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen fügen sich in das erst- und letztgenannte Bild ein. NAP1L1 wurde ebenfalls vorwiegend im Zytoplasma detektiert, der Zellkern wies während der Interphase kein Signal auf. Zusätzlich zeigte die ICC, dass NAP1L1 sich an großen subzelluläre Membranstrukturen, wie Kernmembran und Golgi-Apparat, konzentrierte.

Obwohl unsere Zellkultur nicht Zellzyklus-synchronisiert war, gelang es trotzdem auch in *in vitro* CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen, die von Marheineke et al.<sup>158</sup> beschriebenen NAP1L1-Translokation M-Phase-abhängig (s. Abbildung 31) nachzuweisen. Wahrscheinlich kann sie hier auch genauer auf die Prometaphase eingegrenzt werden, da in dieser Arbeit in der späteren M-Phase in der ICC wieder

weniger NAP1L1 in Assoziation zum Zellkern nachgewiesen werden kann. Aufgrund der erwähnten Vorarbeiten, muss davon ausgegangen werden, dass auch in CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen die vorwiegend größte NAP1L1-Isoform (hier beobachtete 60kDa) nukleär transloziert.

Zusammenfassend lässt die klassische Aufgabe von NAPs (also Chromatin-„Remodelling“ in Zusammenhang mit Replikation der Erbinformation) eine viel stärkere Konzentration von humanen NAP1L1 (hnNAP1L1) im Zellkern erwarten, wie dies z.B. bei *Drosophila*-NAP1<sup>160</sup> der Fall ist.

Deshalb wurde bereits in der Vergangenheit durch Okuwaki et al.<sup>137</sup> die Vermutung geäußert, dass hnNAP1L1 zusätzlich in der Lage ist, aufgrund seiner Struktureigenschaften (s. Kapitel 1.4), bestimmte Proteine, wie z.B. Histone, zu binden und auf Chaperon-artige Weise an den Ort ihrer Bestimmung an oder ab zu transportieren<sup>161</sup>.

Ein intrazelluläres Shuttling translatierter Proteine durch NAP1L1, bei bekannten direkten Interaktionen von  $\gamma$ NAP1 mit Akteuren bzw. Regulatoren der Translation<sup>31</sup> kann die Konzentration um kernnahe Membranformationen (Golgi-Apparat bzw. endoplasmatisches Retikulum) der CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen erklären.

Nach dem Transport von NAP1L1 aus den Megakaryozyten in die entstehenden Thrombozyten, zeigte sich NAP1L1 in der ICC eher verstärkt in der Preplatelet-Fraktion (s. Abbildung 21, C).

### 5.3.1 Zusammenfassung

Konsistent zu anderen Zelltypen, z.B. HEK-293T<sup>161</sup> oder auch HeLa<sup>158</sup> ist NAP1L1 vorwiegend im Zellplasma von CD34<sup>+</sup>-hämatopoietischen Progenitorzellen lokalisiert. Während der frühen M-Phase (Prometaphase) kommt es zur nukleären Translokation von NAP1L1 und Chromatin- bzw. DNA-Assoziation von NAP1L1, welche ab Metaphase regredient ist. Dieses subzelluläre Verteilungsmuster macht zusätzliche Funktion(en) von NAP1L1 jenseits der Replikationsabhängigen Chromatinorganisation auch in den Vorläuferzellen von Thrombozyten wahrscheinlich.



## 5.4 Alternative NAP1L1-Transkripte und abgeleitete Proteinstruktur

Klassische als auch alternativ gespleißte NAP1L1 mRNA wurde in Thrombozyten nachgewiesen. Das Vorkommen von NAP1L1 mRNA konnte durch RNAseq-Studien bereits nachgewiesen werden<sup>33,162</sup>. Gute wissenschaftliche Praxis verlangt jedoch, dass identifizierte mRNAs mittels RT-PCR bzw. qRT-PCR validiert werden sollten<sup>163</sup>. Die hier vorgelegte Studie demonstriert, unter strikt angewendeten Kontrollversuchen die Expression von NAP1L1 mRNA (inklusive alternative-gespleisster Varianten) in humanen Thrombozyten und CD34+-hämatopoietischen Progenitorzellen und daraus differenzierten Megakaryozyten.

Die Spezifität der durchgeführten NAP1L1-RT-PCR-Versuche für NAP1L1 mRNA in menschlichen Thrombozyten und Megakaryozyten wurde mittels cDNA-Sequenzierung zusätzlich nachgewiesen<sup>134</sup>.

Die Sequenz von zwei der drei amplifizierten cDNA wurde als NAP1L1 mRNA homolog identifiziert. Die NAP1L1-Transkript-Variante 5 wie auch X9 codieren für eine kalkuliert ca. 37 kDa schwere NAP1L1-Isoform 3. Eine Größe, welche auch im WB beobachtet wurde. Beim Vergleich der von den Transkripten abgeleiteten AS-Sequenzen fällt insbesondere auf, dass sich die einzelnen Isoformen untereinander in ihren bereits erwähnten Glu-reichen, sauren Domänen<sup>164</sup> (s. Abbildung 49, *grau*) unterscheiden. Während die C-terminale Domäne III bei der zweiten NAP1L1-Isoform aufgrund des Fehlens der zwei vorletzten Exone verkürzt ist, fehlt bei Isoform 3 die komplette N-terminale Domäne I sowie ein Teil der mittleren Domäne II. Die ersten beiden erwähnten Strukturen (I und III) sind unter den Mitgliedern der NAP1-Familie hochkonserviert und nahezu essentiell für die Chromatin-organisierende Funktion des Proteins<sup>165</sup>, weswegen die Isoformen 2 und 3 unter Umständen innerhalb der Zelle ein anderes Aufgabenspektrum als Isoform 1 aufweisen.

| NAP1L1 Isoform 1 - 45kDa |            | NAP1L1 Isoform 2 - 42kDa |            | NAP1L1 Isoform 3 - 37kDa |     |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|-----|
| MADINKEDS                | ELDDDLDDV  | EVEEETGEE                | TKLKRQLTV  | QMIKINPQLA               | 50  |
| ALGERLDGLV               | ETPTGYEEL  | PRVWRRVNA                | LKNLQWCAQ  | IEANFYEEVH               | 100 |
| DLERKYAVLY               | QPLFDGIFEI | INAYEPTTE                | ECEWKPDEED | EISEELKEKA               | 150 |
| KLEDKKDEE                | KEDPKGPEI  | WLVTKNVDL                | LSDMVGEHDE | PLKHLKDK                 | 200 |
| WFSADGGPM                | SFVLEHFEP  | NEYFTNEVLT               | KTYRMRSEPD | DSDFPSFDGP               | 250 |
| EIMCTGGQI                | DWKKGNVTL  | KTKRKGQHK                | GRGTVRTVK  | TVSNDFFNF                | 300 |
| FAPPEVPSG                | DLDDDAEAL  | AADFEIGHFL               | REIRIPRSVL | YFTGSEKEDD               | 350 |
| DDVDDEEGEE               | ADDEEEDD   | EENQFYDPK                | KDQNPACDQ  | Q                        | 391 |

Abbildung 48: Aminosäuresequenz der NAP1L1-Isoformen

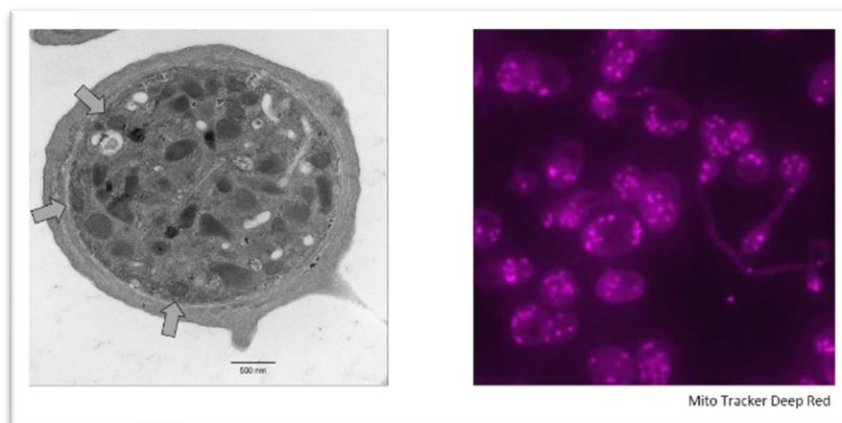
### 5.4.1 Zusammenfassung

Nur die größte der drei NAP1L1-Isoformen weist alle drei Glu-reichen Domänen auf, welche die bekannte „Nucleosome-assembly“-Funktion des Proteins vermitteln. Alternativ gespleißte Transkripte von NAP1L1 kodieren aller Wahrscheinlichkeit nach für strukturell, und damit auch funktionell, deutlich unterschiedliche Proteine.

## 5.5 Interaktion von NAP1L1 und DLAT

Mit DLAT konnte die Untereinheit E2 des PDC, eines Schlüsselenzyms des Citrat-Zyklus sowohl LC-MS/MS-basiert als auch im WB als ein Interaktionspartner von NAP1L1 in humanen Thrombozyten identifiziert werden.

Die Expression und Lokalisation von DLAT erfolgte, hier gezeigt, in humanen Thrombozyten direkt per ICC (s. Abbildung 43). Lokalisation und Verteilung des ICC-Signals lassen vermuten, dass das Enzym vorwiegend direkt in der mitochondrialen Matrix als Teil des PDC angefärbt wurde (vgl. hierzu Abbildung 49). Im Vergleich dazu ist DLAT in CD34<sup>+</sup>-Megakaryozyten, in welchen Proplatelet-Formation induziert wurde, von perinukleär bis in die Proplatelet-Fortsätze lokalisiert (s. Abbildung 44). Diese Lokalisation spiegelt die „juxtannukleäre“ Organisation von Zellorganellen in reifenden Megakaryozyten wieder<sup>166</sup>, welche von dort am Mikrotubuli-Gerüst in die Proplatelet-Extensions geleitet werden<sup>167</sup>.



**Abbildung 49:** Elektronen- (links) und Fluoreszenz- (rechts) mikroskopische Darstellung von Mitochondrien in humanen Thrombozyten (von Schwertz H, persönliche Kommunikation)

Bevor DLAT in den Mitochondrien die Reaktion zu Acetyl-CoA vermitteln kann, muss es im Zytosol translatiert werden, da es im Gegensatz zu z.B. einzelnen Komplexen der Atmungskette nicht durch die mtDNA, sondern nukleäre genomische DNA codiert wird. Damit sind die räumlichen Voraussetzungen für eine Protein-Protein-Interaktion zwischen NAP1L1 und DLAT erfüllt. Zusätzlich ist die Bindungsfähigkeit von NAP1L1 mit mitochondrialen Proteinen nicht unerwartet. In einer der größten humanen Proteininteraktionsstudien<sup>168</sup> wurde mittels automatisierter Yeast-2-Hybrid-Screens Dihydrolipoamide Succinyltransferase (DLST, Untereinheit E2 des OGDC) bereits als NAP1L1-Interaktionspartner gefunden, ein mitochondriales Protein, das die zweite Schlüsselreaktion im Citrat-Zyklus vermittelt. DLST ähnelt DLAT in seiner Funktion (ebenfalls eine Acyltransferase). Es ist jedoch wichtig zu erwähnen dass DLAT und DLST nur eine geringe Sequenzhomologie aufweisen<sup>133,169</sup>.

Die hier geschilderten Ergebnisse der nativen Co-IP und des o.g. Y2H-Screening können komplementär interpretiert werden. Während die binäre Interaktion im Y2H-Screen aufgrund der funktionellen Begrenzungen der Methode bekanntermaßen (1) in einem anderen Organismus, (2) in einem anderem Zellkompartiment, (3) unter Zuhilfenahme eines anderen Translationsapparates und (4) eventuell durch Überexpression der Partner zustande kommt<sup>170</sup>, zeigen die hier gefundenen nativen Co-IP-Ergebnisse erstmals die Interaktion eines Chromatin-organisierenden Proteins mit einem mitochondrialen Protein im Thrombozyten des Menschen unter physiologischen Expressionsverhältnissen und ohne artifizielle Proteinmarkierungen (Tags) oder sonstige Modifikationen<sup>171</sup>. Vor diesem Hintergrund ist auch die Interaktion von NAP1L1 mit mtHsp70 zu sehen, einem Importmotor für Prä-proteine der mitochondrialen Matrix (s.u.)<sup>172,173</sup>.

### **5.6 Alternative Funktionen von NAP1L1 als Transportprotein und Chaperon**

Neben ihrer Eigenschaft zur Organisation des Nukleosoms beizutragen, können Mitglieder der NAP1-Familie auch andere Proteine binden und den Transport ihres Interaktionspartner in ein anderes Zellkompartiment, z.B. den Zellkern, bewerkstelligen. Klassisches Beispiel hierfür ist der nukleäre Transport der Histone

H2A und H2B in *Drosophila melanogaster*. Im Einklang mit dieser Shuttle-Funktion ist dNAP1 dort subzellulär sowohl im Zellkern (M-/S-Phase), als auch im Zytoplasma nachzuweisen<sup>160</sup>. Auch für *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine yNAP1-Karyopherin-Interaktion, als ein Weg des Importes von H2A/H2B in den Zellkern, demonstriert werden<sup>174</sup>.

NAPs können auch inhibitorisch den Zugang eines ein Interaktionspartners zum Zellkern regulieren. Am Beispiel von Diaacylglycerol-Kinase-zeta (DGK $\zeta$ ) wurde gezeigt, dass NAP1L1 die Interaktion von DGK $\zeta$  mit ihren Kernimport-vermittelnden Proteinen (Qip1 and NPI-1) in HeLa unterbindet. Diese Funktion als ein „zytoplasmatischer Anker“ hatte u.a. einen zell-protectiven Effekt bei Inkubation von HeLa mit Doxorubicin zur Folge<sup>175</sup>.

Zusätzlich haben NAPs die Fähigkeit den Transport ihrer Bindungspartner zu anderen Kompartimenten, ausser dem Zellkern zu vermitteln.

In der Hefe interagiert yNAP1 mit Ssc1 (syn. mtHsp70)<sup>172</sup>, ein ATP-abhängiges Chaperon der mitochondrialen Matrix, welches im Zusammenspiel mit u.a. Tim44 die Translokation von Proteinen in das Mitochondrium vermittelt<sup>176</sup>. Ein wichtiger Einflussfaktor auf diesen Transportvorgang ist das MMP: eine Depolarisation vermindert die Effektivität drastisch<sup>177</sup>. So wie andere Bestandteile des mitochondrialen Imports<sup>178</sup>, ist auch Hsp70 zwischen den Spezies hochkonserviert<sup>179</sup>.

Denkbar ist, dass NAP1L1 den Bindungspartner DLAT in humanen Thrombozyten in seiner Konformation hält und die Interaktion mit Importproteinen des Mitochondriums reguliert. Dies ist insbesondere wichtig, da der Import in die Mitochondrien eine „Einbahnstraße“ darstellt: Einmal importierte Proteine können nicht wieder exportiert werden<sup>180</sup>.

Die Regulation des mitochondrialen Imports von DLAT im Rahmen der Thrombozytopoese oder auch im späteren Thrombozyten bietet wiederum die Möglichkeit zwei zentrale Funktionen des Stoffwechsels zu beeinflussen: (1) verringerte Oxidative Phosphorylierung und vermehrte Glykolyse im Sinne eines „metabolischen Schalters“ und konsekutiv (2) die verminderte Formation von ROS (über eine Erniedrigung des MMP und eine Aktivitätsreduktion der PDC).

Beides hätte zur Folge, dass Thrombozyten eine (1) geringere Aggregation, (2) geringere Sekretion zeigen, (3) eine geringere Schädigung ihrer mitochondrialen Proteinausstattung durch ROS erleiden und (4) in geringerem Maße apoptotisch untergehen und dabei die Gerinnungskaskade weniger induzieren.

Hierbei ist eine weitere Beobachtung wichtig: erwiesenermaßen führt Sepsis u.a. zu erhöhten TPO-Spiegeln<sup>181</sup>. TPO führt (in Ratten) durch Transkriptionsregulation zu vermehrter Expression von rNAP1<sup>182</sup>, welches durch seine Chromatin-Remodeling-Funktion<sup>183,184</sup>, den Zugang zu DNA für weitere Transkriptionsfaktoren<sup>185</sup> regulieren kann. Bislang sind keine (Schlüssel-)Enzyme des mitochondrialen Stoffwechsels bekannt, welche durch TPO reguliert werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass TPO *in vitro* auf H9C2-Zellen in noch nicht näher definierter Funktionsweise anti-apoptotisch wirkt. Es wird vermutet, dass TPO einen protektiven Effekt auf Mitochondrien ausübt, indem es den Anfall von ROS begrenzt<sup>186</sup>. Dieser Effekt war mit einer Aufrechterhaltung des MMP verbunden, während es in den nicht-TPO-behandelten Zellen zu einer MMP-Depolarisation und Apoptose-Induktion kam.

### **5.7 Expression und Interaktion von NAP1L1 und DLAT in Sepsis und H1N1**

Nicht immer korrelieren erhobene Thrombozyten-RNAseq-Daten mit dem Thrombozyten-Proteom, da jedoch eine erhöhte Expression von NAP1L1 mRNA in Thrombozyten von Patienten mit bakterieller Sepsis und der viralen Infektion mit H1N1 gezeigt werden konnte, fokussierte diese Arbeit sich auf diese Krankheitsbilder<sup>187</sup>.

NAP1L1-53kDa zeigte sich im semiquantitativen WB verstärkt exprimiert, während die größere (beobachtete 60kDa) und kleinere (beobachtete 37kDa) NAP1L1-Isoform gegenüber gesunden Thrombozyten-Spendern stabil exprimiert wurde (s. Abbildung 37). Demgegenüber verringerte sich der DLAT-Gehalt in den untersuchten Thrombozyten im semiquantitativen WB tendenziell.

Letzteres Ergebnis ist wiederum konsistent mit den RNA-Microarray-Daten aus menschlichen Leukozyten im Modell einer systemischen Entzündung<sup>56</sup>, in welcher ebenfalls eine Mindereexpression von u.a. DLAT gezeigt werden konnte. Hier wird dieses Phänomen erstmals auf Proteinebene für Thrombozyten gezeigt.

Eine Limitation der hier gezeigten Studie ist die kleinere Anzahl an Patientenproben, die für die Proteinexpressions-Analysen verwendet werden konnten (für NAP1L1 n=6 bzw. für DLAT n=3), ein Umstand, der die Aussagekraft der Ergebnisse verringern kann.

Auch kann die densitometrische Auswertung von WBs, im Gegensatz z.B. zu aufwendigeren quantitativen MS-basierten Methoden nur grobe Hinweise auf die Proteinexpression von Zellen geben<sup>111</sup>. Nichtsdestotrotz bestätigt diese Analyse im Fall von NAP1L1 die von unserer Partnergruppe in Salt Lake City mit Hilfe von anderen Patientenproben erhobenen *in vivo* RNAseq-Daten und im Fall von DLAT die in einem humanen *in vitro* Modell systemischer Entzündung gefundenen Micoarray-Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe in einem anderen (Blut-)Zelltyp<sup>56</sup>.

Prinzipiell gibt es drei Wege auf denen der mitochondriale Stoffwechsel die Funktion von Thrombozyten beeinflussen kann: (1) über die Oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP, (2) über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als „second messenger“ und (3) über die Regulation des intrinsischen Weges der Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren Mitochondrienmembran<sup>188</sup>.

Zu (1) Wenn die Expression von DLAT und oder der Import in das Mitochondrium vermindert wird, kann weniger Pyruvat irreversibel zu Acetyl-CoA umgewandelt werden (weil diese Untereinheit das grundlegende Gerüst<sup>189</sup> für den PDC zur Verfügung stellt und dessen Teilreaktionen koordiniert<sup>190</sup>), Thrombozytenfunktion und -sekretion von Granula werden beeinträchtigt (s. Kapitel 1.9).

Zu (2) Die zwei funktionell verwandten Enzyme des Citrat-Zyklus PDC und OGDHC und deren Untereinheiten sind ein bedeutender Entstehungs- und Angriffsort von ROS<sup>191–194</sup>. Die Formation von ROS kann die physiologischen Abläufe in Mitochondrien empfindlich stören<sup>195</sup>. Störungen der mitochondrialen Funktion beeinflussen auch die Thrombozytenfunktion<sup>196</sup>, eine Regulation dieser Komplexe bzw. ihrer Untereinheiten ist also prinzipiell sinnvoll um eine Schädigung der Plättchen durch ROS und/oder eine Hyperaggregation zu vermeiden.

Zu (3) Jobe et al.<sup>197</sup> wiesen nach, dass es nach Stimulation muriner Plättchen mit Thrombin bzw. Thrombin und Convulxin zu einem schnellen Verlust des MMP mit

folgender PS-Externalisierung und Fibrinogen-Retention kommt (Zeichen der Apoptose). In den Plättchen Cyclophilin D-defizienter Mäuse waren diese Veränderungen geringfügiger ausgeprägt, was auf eine Beteiligung der MPTP bei der Etablierung eines „hochgradig aktivierten“ Zustandes der Thrombozyten schließen lässt<sup>197</sup>. ROS konnten diesen Zustand als Ko-Aktivator ebenfalls Cyclophilin-D-abhängig herbeiführen<sup>197</sup>. Interessanterweise hat dieser MPTP-vermittelte Thrombozytenuntergang durch Apoptose (mit niedrigem PAC-1 und hoher PS-Externalisierung), jedoch unter Umständen bei der Generierung eines Thrombus nicht die Aufgabe der Stabilisierung durch Aggregation, sondern dient der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung<sup>198</sup>. Die Regulation der intrazellulären Apoptose in Thrombozyten ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Ein wichtiger Faktor ist jedoch auch hier der intramitochondriale ATP-Gehalt. Ist dieser depletiert, so wird die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase erschwert und durch die Akkumulation von intramitochondrialen Calcium Formation der MPTP und damit die Apoptose eingeleitet werden<sup>199,200</sup>.

### **5.8 Rolle von NAP1L1 und DLAT in Sepsis und H1N1**

In Patienten mit systemischer Entzündung (SIRS nach Sepsis-2<sup>201</sup>) zeigen humane Thrombozyten im Vergleich mit gesunden Probanden *in vivo* eine Depolarisation des MMP, welche mit der Krankheitsschwere (gemessen mit APACHE II und SOFA) zunahm. Zusätzlich war ein höherer Anteil an apoptotischen Plättchen nachweisbar (gemessen mit Annexin V-Bindung an externalisierten PS), welche stärker aktiviert waren (CD62P). Weiterhin korrelierte die MMP-Depolarisation mit dem im Serum gemessenen Laktat und Cytochrom c-Spiegeln<sup>202</sup>, was wiederum die Rolle von Thrombozyten als Indikatoren für systemischen metabolischen Stress unterstreicht<sup>203</sup>.

Dies weist darauf hin, dass es im Rahmen der systemischen Immunantwort des menschlichen Organismus zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung in den thrombozytären Mitochondrien kommt, welche mit vermehrten Thrombozytenuntergang durch Apoptose assoziiert ist und umso deutlicher ausfällt je schwerer die Patienten erkrankt sind.

Die Fähigkeit verschiedenster Viren, intrinsische oder extrinsische Apoptosewege von eukaryotischen Zellen in ihrem Sinne verstärkend oder abschwächend zu beeinflussen, ist gut dokumentiert<sup>204</sup>. Im Fall von H1N1 konnte z.B. nachgewiesen werden, dass in HEK-293-Zellen und murinen Makrophagen das H1N1-Protein PB1-F2 via TOM40 in den Intermembranraum der Mitochondrien transloziert und dort das MMP herabsetzt, was die zelluläre Immunantwort, über den RLR-Weg sowie die Formation von NLRP3-Inflammasomen, negativ beeinflusst<sup>205</sup> und in Apoptose von immunkompetenten Zellen, wie z.B. humanen Monozyten, resultiert<sup>206</sup>.

Im Fall von H1N1 und Thrombozyten liegt wohl eine andere Ursache vor: wie in Kapitel 1.6 geschildert, kann die Infektion mit dem H1N1-Virus und assoziierten Respiratorischen Versagen mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie einhergehen<sup>38</sup>. Patienten, bei denen dies zur Aufnahme auf einer Intensivstation der Fall war, hatten im weiteren Verlauf ein fast doppelt so hohes Risiko während ihres Krankenhausaufenthaltes zu versterben<sup>38</sup>. Während Boilard et al.<sup>39</sup> zeigten, dass es über FcγRIIA und aktiviertes Thrombin in humanen Thrombozyten u.a. zu einer Expression von P-Selektin und Freisetzung von Mikropartikeln kommt, wiesen Rondina et al.<sup>41</sup> nach, dass H1N1-getriggert eine gesteigerte Aktivierung des gpIIb/IIIa-Rezeptors stattfindet. Der gpIIb/IIIa-Inhibitor Tirofiban wiederum, kann eine Thrombin-verursachte intrinsische Apoptose der Plättchen verringern, sowie eine MMP-Depolarisation, PS-Externalisierung und die Produktion von ROS deutlich vermindern<sup>207</sup>. Dies zeigt, dass im Falle von H1N1 eine extensive Aktivierung von Plättchen mittels Agonisten, welche nachgewiesenermaßen bei (Über-)Stimulation eine Apoptose von Thrombozyten hervorrufen, einen vermehrten Untergang dieser Blutbestandteile verursacht und dieser durch Mitochondrien über die intrinsischen Wege der Apoptose reguliert wird.



### 6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusätzlich zu ihrer Zielstellung humane Thrombozyten auf das Vorkommen von NAP1L1 zu untersuchen, liefert diese Arbeit Anhalt für die potenzielle Funktion dieses „nukleären“ Proteins in diesem anukleären Zelltyp. Eine Einflussnahme von NAP1L1 auf den Transport und ggf. Import eines Schlüsselenzyms des mitochondrialen Stoffwechsels (DLAT) erscheint als ein möglicher Mechanismus für die Einflussnahme auf systemische entzündliche Prozesse durch NAP1L1.

Für humane Thrombozyten sind die beschriebenen Veränderungen von DLAT eine der ersten Hinweise auf eine aktive Regulation der intramitochondrialen Proteinausstattung in Reaktion auf die systemische Infektion mit bakteriellen und viralen Erregern. Bislang existierten in dieser Situation nur Daten, welche z.B. die direkte Beeinflussung von Plättchen durch Erreger, z.B. durch induzierte Degradation des anti-apoptotischen Bcl-x<sup>208</sup>, beschreiben.

In der Zukunft wird es wichtig sein zu ergründen, welche funktionellen Konsequenzen aus einer Mehr- oder Mindereexpression von NAP1L1 im Bezug auf die thrombozytäre Mitochondrienfunktion entstehen, im Weiteren welchen pathophysiologischen Stellenwert diese Änderungen besitzen und wie man diese dann therapeutisch beeinflussen kann.

Fest steht, dass die in der Einleitung aufgeworfene Frage, ob die im Rahmen einer akuten, systemischen Entzündungsreaktion beobachteten metabolischen Veränderungen eher Ausdruck einer aktiven Regulation als eines pathologischen Defektes sind, auch auf die humanen Thrombozyten übertragen werden muss.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Brewer, D. B. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British Journal of Haematology* vol. 133 251–258 (2006).
2. Italiano, J. E., Lecine, P., Shivdasani, R. A. & Hartwig, J. H. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* **147**, 1299–1312 (1999).
3. Thon, J. N. *et al.* Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* **191**, 861–874 (2010).
4. Kosaki, G. Platelet production by megakaryocytes: Protoplatelet theory justifies cytoplasmic fragmentation model. *International Journal of Hematology* vol. 88 255–267 (2008).
5. Schulze, H. *et al.* Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* **107**, 3868–3875 (2006).
6. Machlus, K. R. & Italiano, J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology* vol. 201 785–796 (2013).
7. Kosaki, G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int. J. Hematol.* **81**, 208–219 (2005).
8. Xiao, da W., Yang, M., Yang, J., Hon, K. L. & Fok, F. T. Lung damage may induce thrombocytopenia. *Platelets.* **17**, 347–349 (2006).
9. Schwertz, H. *et al.* Anucleate platelets generate progeny. *Blood* **115**, 3801–3809 (2010).
10. Bozza, F. A., Shah, A. M., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Amicus or adversary platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* vol. 40 123–134 (2009).
11. Correction Naghavi, M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **385**,

- 117–171 (2015).
12. Zimmerman, G. a. & Weyrich, A. S. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: New pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, (2008).
  13. Yang, J., Furie, B. C. & Furie, B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: Its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thrombosis and Haemostasis* vol. 81 1–7 (1999).
  14. Diacovo, T. G., DeFougerolles, A. R., Bainton, D. F. & Springer, T. A. A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2. *J. Clin. Invest.* **94**, 1243–1251 (1994).
  15. Elzey, B. D. *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* **19**, 9–19 (2003).
  16. Pervushina, O. *et al.* Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J. Immunol.* **173**, 2060–2067 (2004).
  17. Klinger, M. H. *et al.* Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 541–546 (1995).
  18. Rondina, M. T., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. a. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ. Res.* **112**, 1506–19 (2013).
  19. Weyrich, A. S. Platelets: More than a sack of glue. *Hematology* **2014**, 400–403 (2014).
  20. Brass, L. F. Did dinosaurs have megakaryocytes? New ideas about platelets and their progenitors. *Journal of Clinical Investigation* vol. 115 3329–3331 (2005).
  21. Spinelli, S. L., Maggirwar, S. B., Blumberg, N. & Phipps, R. P. Nuclear emancipation: a platelet tour de force. *Sci. Signal.* **3**, pe37 (2010).
  22. Weyrich, A. S., Lindeaaann, S. & Zimmerman, G. A. The evolving role of platelets

- 
- in inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* vol. 1 1897–1905 (2003).
23. Qureshi, A. H. *et al.* Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: Insights into integrin signaling. *PLoS One* **4**, (2009).
  24. Burkhardt, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. **120**, 73–82 (2012).
  25. Burkhardt, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **120**, 73–82 (2012).
  26. Burkhardt, J. M. *et al.* What can proteomics tell us about platelets? *Circ. Res.* **114**, 1204–1219 (2014).
  27. Ishimi, Y. *et al.* Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **142**, 431–9 (1984).
  28. Park, Y.-J. & Luger, K. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1248–53 (2006).
  29. Thibaud-Nissen, F. *et al.* P8008 The NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline. *J. Anim. Sci.* **94**, 184–184 (2016).
  30. Baltz, A. G. *et al.* The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol. Cell* **46**, 674–90 (2012).
  31. Zlatanova, J., Seebart, C. & Tomschik, M. Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *FASEB J.* **21**, 1294–310 (2007).
  32. Kim, M.-S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575–81 (2014).
  33. Rowley, J. W. *et al.* Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* **118**, 101–112 (2011).
  34. Schimmack, S. *et al.* A mechanistic role for the chromatin modulator, NAP1L1, in pancreatic neuroendocrine neoplasm proliferation and metastases.
-

- 
- Epigenetics Chromatin* **7**, 15 (2014).
35. De Marco, A. *et al.* Subcellular localization of the interaction between the human immunodeficiency virus transactivator Tat and the nucleosome assembly protein 1. *Amino Acids* **38**, 1583–1593 (2010).
  36. Rehtanz, M., Schmidt, H., Warthorst, U. & Steger, G. Direct Interaction between Nucleosome Assembly Protein 1 and the Papillomavirus E2 Proteins Involved in Activation of Transcription. *Molecluar Cell. Biol.* **24**, 2153–2168 (2004).
  37. Mansouri, S., Wang, S. & Frappier, L. A Role for the Nucleosome Assembly Proteins TAF-I?? and NAP1 in the Activation of BZLF1 Expression and Epstein-Barr Virus Reactivation. *PLoS One* **8**, (2013).
  38. Lopez-Delgado, J. C. *et al.* Thrombocytopenia as a mortality risk factor in acute respiratory failure in H1N1 influenza. *Swiss Med. Wkly.* **143**, 1–6 (2013).
  39. Boilard, E. *et al.* Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* **123**, 2854–2863 (2014).
  40. Harms, P. W. *et al.* Autopsy findings in eight patients with fatal H1N1 influenza. *Am. J. Clin. Pathol.* **134**, 27–35 (2010).
  41. Rondina, M. T. *et al.* In vivo platelet activation in critically ill patients with primary 2009 influenza A(H1N1). *Chest* **141**, 1490–1495 (2012).
  42. Boldt, J., Menges, T., Wollbrück, M., Sonneborn, S. & Hempelmann, G. Platelet function in critically ill patients. *Chest* **106**, 899–903 (1994).
  43. Gawaz, M., Dickfeld, T., Bogner, C., Fateh-Moghadam, S. & Neumann, F. J. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* **23**, 379–85 (1997).
  44. Yaguchi, a, Lobo, F. L. M., Vincent, J.-L. & Pradier, O. Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 2096–102 (2004).
  45. Vincent, J., Yagushi, A. & Pradier, O. Platelet function in sepsis. *Crit. Care Med.* **30**, 313–317 (2002).
  46. Carré, J. E. & Singer, M. Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for
-

- 
- a systems approach. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**, 763–771 (2008).
47. James, D. E., Brown, R., Navarro, J. & Pilch, P. F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**, 183–185 (1988).
48. Engelhardt, S., Huang, S.-F., Patkar, S., Gassmann, M. & Ogunshola, O. O. Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS* **12**, 4 (2015).
49. Fink, M. P. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit. Care Clin.* **17**, 219–237 (2001).
50. Fink, M. P. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. 491–499 (2002) doi:10.1186/cc1824.
51. Fink, M. P. Cytopathic Hypoxia and Sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* **16**, 89–91 (2015).
52. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66–72 (2014).
53. Garrabou, G. *et al.* The effects of sepsis on mitochondria. *J. Infect. Dis.* **205**, 392–400 (2012).
54. Protti, A. & Singer, M. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit. Care* **10**, 228 (2006).
55. Lee, I. & Hüttemann, M. Energy crisis: The role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1579–1586 (2014).
56. Calvano, S. E. *et al.* A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* **437**, 1032–1037 (2005).
57. Benecke, R., Strumper, P. & Weiss, H. Electron-Transfer Complex-I and Complex-Iv of Platelets Are Abnormal in Parkinsons-Disease but Normal in Parkinson-Plus Syndromes. *Brain* **116**, 1451–1463 (1993).
58. Mancuso, M. *et al.* Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is
-

- accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* **182**, 421–426 (2003).
59. Parker, W. D., Boyson, S. J., Luder, A. S. & Parks, J. K. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* **40**, 1231–1234 (1990).
  60. Prince, J., Jia, S., Bave, U., Anneren, G. & Oreland, L. Mitochondrial enzyme deficiencies in Down's syndrome. *J. Neural Transm. - Park. Dis. Dement. Sect.* **8**, 171–181 (1994).
  61. Grassian, A. R. *et al.* IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res.* **74**, 3317–3331 (2014).
  62. Marquis, N. R., Vigdahl, R. L. & Tavormina, P. A. Platelet Aggregation - Regulation by cyclic AMP and Prostaglandin E1. **36**, 965–972 (1969).
  63. Akkerman, J. W. & Holmsen, H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca<sup>2+</sup> secretion. *Blood* **57**, 956–966 (1981).
  64. Tomasiak, M., Stelmach, H., Rusak, T. & Wysocka, J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 789–803 (2004).
  65. Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Lenti, L., Gazzaniga, P. P. & Violi, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* **91**, 484–490 (1998).
  66. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15–18 (1997).
  67. Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L. & Brownlee, M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* **50**, 1491–1494 (2001).
  68. Avila, C. *et al.* Platelet mitochondrial dysfunction is evident in type 2 diabetes in association with modifications of mitochondrial anti-oxidant stress proteins. *Exp.*

- Clin. Endocrinol. Diabetes* **120**, 248–251 (2012).
69. Leytin, V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* **26**, 51–63 (2012).
70. Jobe, S. M. *et al.* Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* **111**, 1257–1265 (2008).
71. Bozza, F. a. & Weyrich, a. S. Mitochondria push platelets past their prime. *Blood* **111**, 2496–2497 (2008).
72. Sjövall, F. *et al.* Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit. Care* **14**, R214 (2010).
73. Gründler, K. *et al.* Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit. Care* **18**, R31 (2014).
74. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. *Bull. world Heal. Organ.* **79**, 373–374 (2001).
75. Weyrich, S. A. *et al.* Activated platelet signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* **97**, 1525 (1996).
76. Gulliksson, H. Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **34**, 76–7 (2012).
77. Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379–91 (2005).
78. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231–8 (1990).
79. Grützkau, A. & Radbruch, A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry. A* **77**, 643–7 (2010).
80. Metcalfe, P. Platelet antigens and antibody detection Polymorphisms of the glycoprotein complexes. **87**, 82–86 (2004).



81. Fulwyler. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science* **150**,.
82. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **159**, 156–159 (1987).
83. Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–5 (2006).
84. Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209–11 (1970).
85. Spiegelman, S., Watson, K. F. & Kacian, D. L. Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2843–5 (1971).
86. Efstratiadis, A., Kafatos, F. C., Maxam, A. M. & Maniatis, T. Enzymatic in vitro synthesis of globin genes. *Cell* **7**, 279–88 (1976).
87. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. & Khorana, H. G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **56**, 341–61 (1971).
88. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335–50 (1987).
89. Saiki, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–4 (1985).
90. Mocharla, H., Mocharla, R. & Hodes, M. E. Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive and rapid method for isozyme genotyping. *Gene* **93**, 271–5 (1990).
91. Bustin, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–93 (2000).
92. Okello, J. B. *a et al.* Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. *PLoS One* **5**,

- e13931 (2010).
93. Kotewicz, M. L., Sampson, C. M., D'Alessio, J. M. & Gerard, G. F. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res.* **16**, 265–77 (1988).
  94. Air, G. M. & Harris, J. I. DNA-dependent RNA polymerase from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. *FEBS Lett.* **38**, 277–81 (1974).
  95. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).
  96. Untergasser, A. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, e115 (2012).
  97. Dieffenbach, CW Lowe, TMJ, D. G. General concepts for PCR primer design . General Concepts for PCR Primer Design. (1993).
  98. Desjardins, P. R. & Conklin, D. S. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Appendix 3**, 3J (2011).
  99. Kibbe, W. a. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43-6 (2007).
  100. Aaij, C. & Borst, P. The gel electrophoresis of DNA. *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.* **269**, 192–200 (1972).
  101. Borst, P. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life* **57**, 745–747 (2005).
  102. Bustin, S. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
  103. Ornstein, L. DISC ELECTROPHORESIS-I BACKGROUND AND THEORY\*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1964).
  104. Davis, B. DISC ELECTROPHORESIS–II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS\*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 404–427 (1964).
  105. RAYMOND, S. & WEINTRAUB, L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).

106. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970).
107. Maizel, J. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Trends Biochem. Sci.* (2000).
108. Kazmin, D., Edwards, R. a, Turner, R. J., Larson, E. & Starkey, J. Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination. *Anal. Biochem.* **301**, 91–6 (2002).
109. Westermeier, R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 61–64 (2006).
110. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145–9 (1992).
111. Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. & Vogel, J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**, 1845–55 (2009).
112. Foltman, M. & Sanchez-Diaz, A. Studying protein-protein interactions in budding yeast using co-immunoprecipitation. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1369 239–256 (2016).
113. Kalli, A., Smith, G. T., Sweredoski, M. J. & Hess, S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *J. Proteome Res.* **12**, 3071–86 (2013).
114. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
115. Pitt, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 19–34 (2009).
116. Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989 (1994).
117. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database

- search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392 (2002).
118. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**, D204-12 (2015).
119. Stahl, D. C., Swiderek, K. M., Davis, M. T. & Lee, T. D. Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 532–40 (1996).
120. Landry, M. L., Ferguson, D. & Wlochowski, J. Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by cyospin-enhanced direct immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 302–4 (1997).
121. Panchuk-Voloshina, N. *et al.* Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–88 (1999).
122. Lichtman, J. W. & Conchello, J. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **2**, (2005).
123. Petty, H. R. Fluorescence Microscopy: Established and Emerging Methods, Experimental Strategies, and Applications in Immunology. *Microsc. Res. Tech.* **709**, 687–709 (2007).
124. Rossner, M. & Yamada, K. M. What's in a picture? The temptation of image manipulation. *J. Cell Biol.* **166**, 11–5 (2004).
125. Brown, C. M. Fluorescence microscopy--avoiding the pitfalls. *J. Cell Sci.* **120**, 1703–5 (2007).
126. Sanger, F. & Nicklen, S. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **74**, 5463–5467 (1977).
127. Chan, E. Y. Advances in sequencing technology. **573**, 13–40 (2005).
128. Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3171–5 (1977).
129. Rondina, M. T., Schwertz, H., Harris, E. S., Kraemer, B. F. & Campbell, R. A. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human

- 
- platelets. 748–758 (2011) doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04208.x.
130. Schwertz, H. *et al.* Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J. Exp. Med.* **203**, 2433–2440 (2006).
131. Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* **154**, 485–90 (2001).
132. Neu, C. T., Gutschner, T. & Haemmerle, M. Post-transcriptional expression control in platelet biogenesis and function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–25 (2020).
133. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
134. Bevan, I. S., Rapley, R. & Walker, M. R. Sequencing of PCR-amplified DNA. *Genome Res.* **1**, 222–228 (1992).
135. Zucker, M., Hauschner, H., Seligsohn, U. & Rosenberg, N. Platelet factor XI: intracellular localization and mRNA splicing following platelet activation. *Blood Cells. Mol. Dis.* **69**, 30–37 (2018).
136. J.L. Antibodies: A laboratory manual. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 429 (1989).
137. Okuwaki, M., Kato, K. & Nagata, K. Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones. *Genes Cells* **15**, 13–27 (2010).
138. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
139. Dunker, A.K., Rueckert, R. R. Observations on Molecular Weight Determinations on Polyacrylamide Gel. *J. Biol. Chem.* **244**, 5074–5081 (1969).
140. Ahmad, Q. R., Nguyen, D. H., Wingerd, M. A., Church, G. M. & Steffen, M. A. Molecular weight assessment of proteins in total proteome profiles using 1D-PAGE and LC/MS/MS. *Proteome Sci.* **3**, 6 (2005).
141. Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10762–10767 (2008).
-

- 
142. Choudhary, C. *et al.* Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* (80-. ). **325**, 834–840 (2009).
  143. Kho, Y. *et al.* A tagging-via-substrate technology for detection and proteomics of farnesylated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12479–84 (2004).
  144. van Dijk, J. *et al.* A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylolation. *Mol. Cell* **26**, 437–448 (2007).
  145. Boucher, D., Larcher, J.-C., Gros, F. & Denoulet, P. Polyglutamylolation of Tubulin as a Progressive Regulator of in Vitro Interactions between the Microtubule-Associated Protein Tau and Tubulin. *Biochemistry* **33**, 12471–12477 (1994).
  146. Van Dijk, J. *et al.* Polyglutamylolation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *J. Biol. Chem.* **283**, 3915–3922 (2008).
  147. Regnard, C. *et al.* Polyglutamylolation of nucleosome assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 15969–15976 (2000).
  148. Geisler, N., Kaufmann, E., Fischer, S., Plessmann, U. & Weber, K. Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins. *EMBO J.* **2**, 1295–302 (1983).
  149. Kaufmann, E., Geisler, N. & Weber, K. SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. *FEBS Lett.* **170**, 81–84 (1984).
  150. GEORGES, E. & MUSHYNSKI, W. E. Chemical modification of charged amino acid moieties alters the electrophoretic mobilities of neurofilament subunits on SDS/polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **165**, 281–287 (1987).
  151. Ye, B. *et al.* Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylolation. *J. Exp. Med.* **211**, 2439–2454 (2014).
  152. Ikegami, K. *et al.* TTLL10 is a protein polyglycylase that can modify nucleosome assembly protein 1. *FEBS Lett.* **582**, 1129–1134 (2008).
  153. Li, L. *et al.* Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 promotes dimethyl sulfoxide-induced differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J. Cell. Biochem.* **113**, 3788–96 (2012).
-

154. Ishimi, Y. *et al.* Rapid Purification of Nucleosome Assembly Protein (AP-I) and Production of Monoclonal Antibodies against It. *Cell Struct. Funct.* **10**, 373–382 (1985).
155. Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. & Hanaoka, F. Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *Eur. J. Biochem.* **162**, 19–24 (1987).
156. Ishimi, Y. & Kikuchi, a. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* **266**, 7025–7029 (1991).
157. Clark, J. *et al.* Regulatory role for nucleosome assembly protein-1 in the proliferative and vasculogenic phenotype of pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **294**, L431–L439 (2008).
158. Marheineke, K. & Krude, T. Nucleosome Assembly Activity and Intracellular Localization of Human CAF-1 Changes during the Cell Division Cycle. *J. Biol. Chem.* **273**, 15279–15286 (1998).
159. Asahara, H. *et al.* Dual Roles of p300 in Chromatin Assembly and Transcriptional Activation in Cooperation with Nucleosome Assembly Protein 1 In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2974–2983 (2002).
160. Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. & Kadonaga, J. T. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3112–3124 (1996).
161. Zhang, Q., Giebler, H. A., Isaacson, M. K. & Nyborg, J. K. Eviction of linker histone H1 by NAP-family histone chaperones enhances activated transcription. *Epigenetics Chromatin* **8**, 30 (2015).
162. Osman, A., Hitzler, W. E., Ameer, A. & Provost, P. Differential Expression Analysis by RNA-Seq Reveals Perturbations in the Platelet mRNA Transcriptome Triggered by Pathogen Reduction Systems. 1–17 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0133070.
163. Fang, Z. & Cui, X. Design and validation issues in RNA-seq experiments. **12**, 280–287 (2011).

164. Park, Y. & Luger, K. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 549–558 (2006).
165. Miller, K. E. & Heald, R. Glutamylation of Nap1 modulates histone H1 dynamics and chromosome condensation in *Xenopus*. **209**, 211–220 (2015).
166. Pertuy, F. *et al.* Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood* **123**, 1261–1269 (2014).
167. Richardson, J. L., Shivdasani, R. A., Boers, C., Hartwig, J. H. & Italiano, J. E. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* **106**, 4066–4075 (2005).
168. Stelzl, U. *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957–68 (2005).
169. Fussey, S. P., Guest, J. R., James, O. F., Bassendine, M. F. & Yeaman, S. J. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8654–8 (1988).
170. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2763–2788 (2009).
171. Monti, M., Orrù, S., Pagnozzi, D. & Pucci, P. Interaction Proteomics. *Biosci. Rep.* **25**, 45–56 (2005).
172. Krogan, N. J. *et al.* Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643 (2006).
173. Strub, A., Lim, J. H., Pfanner, N. & Voos, W. The mitochondrial protein import motor. *Biol Chem* **381**, 943–949 (2000).
174. Mosammamaparast, N., Ewart, C. S. & Pemberton, L. F. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* **21**, 6527–6538 (2002).
175. Okada, M. *et al.* Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK $\zeta$  by attenuating its association with importins. *Exp. Cell Res.* **317**, 2853–63 (2011).
-



- 
176. D'Silva, P., Liu, Q., Walter, W. & Craig, E. A. Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1084–1091 (2004).
177. Huang, S., Ratliff, K. S. & Matouschek, A. Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 301–307 (2002).
178. Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M. & Ryan, M. T. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends in Cell Biology* vol. 17 456–464 (2007).
179. Bukau, B. & Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* vol. 92 351–366 (1998).
180. Bauer, N. C., Doetsch, P. W. & Corbett, A. H. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic* **16**, 1039–1061 (2015).
181. Zakyntinos, S. G. *et al.* Sepsis severity is the major determinant of circulating thrombopoietin levels in septic patients. *Crit. Care Med.* **32**, 1004–1010 (2004).
182. Cataldo, L. M., Zhang, Y., Lu, J. & Ravid, K. Rat NAP1: cDNA cloning and upregulation by Mpl ligand. *Gene* **226**, 355–64 (1999).
183. Workman, J. L. Nucleosome displacement in transcription. *Genes and Development* vol. 20 2009–2017 (2006).
184. Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W. L. & Muramatsu, M. p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev.* **14**, 1899–1907 (2000).
185. Walter, P. P., Owen-Hughes, T. A., Côté, J. & Workman, J. L. Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6178–87 (1995).
186. Chan, S. *et al.* Thrombopoietin Protects Cardiomyocytes from Iron-Overload Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Injury. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 2063–2071 (2015).
187. Londin, E. R. *et al.* The human platelet : strong transcriptome correlations among

- individuals associate weakly with the platelet proteome. 1–12 (2014).
188. Zharikov, S. & Shiva, S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 118–23 (2013).
189. Roche, T. E. *et al.* Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **70**, 33–75 (2001).
190. Harris, R., Huang, B. & Wu, P. Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 269–288 (2001).
191. Tretter, L. & Adam-Vizi, V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J. Neurosci.* **20**, 8972–8979 (2000).
192. Starkov, A. A. *et al.* Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* **24**, 7779–7788 (2004).
193. Ambrus, A., Tretter, L. & Adam-Vizi, V. Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *J. Neurochem.* **109**, 222–229 (2009).
194. Ambrus, A. *et al.* Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 642–650 (2015).
195. Víctor, V. M., Espulgues, J. V, Hernández-Mijares, A. & Rocha, M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets* **9**, 376–89 (2009).
196. Garcia-Souza, L. F. & Oliveira, M. F. Mitochondria: Biological roles in platelet physiology and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **50**, 156–60 (2014).
197. Jobe, S. M. *et al.* Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* **111**, 1257–65 (2008).

198. Munnix, I. C. A. *et al.* Segregation of Platelet Aggregatory and Procoagulant Microdomains in Thrombus Formation Regulation by Transient Integrin Activation. (2007) doi:10.1161/ATVBAHA.107.151100.
199. Jeger, V., Djafarzadeh, S., Jakob, S. M. & Takala, J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 532–542 (2013).
200. Leytin, V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* **26**, 51–63 (2012).
201. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* **31**, 1250–1256 (2003).
202. Yamakawa, K. *et al.* Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J. Trauma Acute Care Surg.* **74**, 411–418 (2013).
203. Kramer, P. a, Ravi, S., Chacko, B., Johnson, M. S. & Darley-USmar, V. M. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* **2**, 206–210 (2014).
204. Neumann, S. *et al.* How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? *Virus Res.* **209**, 45–55 (2015).
205. Yoshizumi, T. *et al.* Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat. Commun.* **5**, 4713 (2014).
206. Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* **7**, 1306–1312 (2001).
207. Zhu, J. *et al.* Platelet Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Inhibitor Rescues Progression of Apoptosis in Human Platelets. *Med. Sci. Monit.* **22**, 4261–4270 (2016).
208. Kraemer, B. F. *et al.* Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood* **120**, 5014–20 (2012).

## 8 Veröffentlichung

Rondina MT, **Freitag M**, Pluthero FG, Kahr WHA, Rowley JW, Kraiss LW, Franks Z, Zimmerman GA, Weyrich AS, Schwertz H. Non-genomic activities of retinoic acid receptor alpha control actin cytoskeletal events in human platelets. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1082–94.

### 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die viele Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Als erstes möchte ich mich bei Dr. med. Hansjörg Schwertz (ehemals Lichtenberg-Professor im Institut für Transfusionsmedizin der Universität Greifswald) bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Thema in seinem, von der Volkswagen Stiftung geförderten, Team zu arbeiten. Weiterhin gilt mein Dank den Mitgliedern unserer Forschungsgruppe: Dr. med. Ulrike Thorack, Dr. rer. nat. Krystin Krauel, und im Besonderen Anne Schumacher, welche immer mit Rat und Tat zur Seite stand und sich außerdem äußerst sorgfältig der Betreuung sowie Kultivierung der Progenitorzellenkultur widmete.

Des Weiteren danke ich den anderen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin der Universität Greifswald, im Besonderen Dr. rer. nat. Tom Berthold, Dr. rer. nat. Stefan Muschter und Dip.-Biol. Jan Wesche, welche immer ein offenes Ohr und einen guten Hinweis hatten.

Weiterhin zu Dank verpflichtet bin ich Matthew Rondina, MD, MS (University of Utah) der mir die Proteinisolate der Thrombozyten von Sepsis bzw. H1N1-Patienten zur Verfügung stellte.

Außerdem danke ich dem interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald, insbesondere den Mitarbeitern Hr. Dr. Leif Steil, Fr. Dr. Elke Hammer und Fr. Katrin Schoknecht, für die Möglichkeit der Nutzung der Massenspektrometrie.

Der Forschungsverbund Molekulare Medizin (FVMM) der Universität Greifswald förderte diese Arbeit finanziell, hierfür bedanke ich mich herzlich.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum: 23.09.2022

Unterschrift:

