

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

Thema:

**Standardisierung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung
von Thrombozyten auf Blutaussstrichen und Visualisierung der
Signalkaskade von Thrombozyten mit Hilfe von phosphorylierten
Kinasen**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität

Greifswald

2022

Vorgelegt von:
Lucas Karl Lex
geb. am 13.07.1990
in Trier/Rheinland-Pfalz

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

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

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pöttsch

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Seminarraum 10.014/16 (Flur10)

Tag der Disputation: 10.03.2023

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>III</u>
<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>VI</u>
<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>VIII</u>
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
<u>2. Material und Methoden.....</u>	<u>11</u>
2.1 Allgemeiner Ablauf	11
2.2 Humanes Vollblut – Blutentnahme	11
2.3 Blutausstriche	12
2.4 Blutausstriche fixieren	13
2.5 Blutausstriche färben	13
2.6 Lagerung der Blutausstriche	16
2.7 Fluoreszenzmikroskopie.....	16
2.8 Durchflusszytometrie mit dem Cystomics FC 500 von Beckman Coulter	17
2.9 Aggregometrie nach Born	20
2.10 Software und Datenbank	21
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>22</u>
3.1 Nachweis von Thrombozytenproteinen und Strukturen im Blutausstrich	22
3.2 Standardisierung der Lagerung von Blutausstrichen bei Raumtemperatur	23
3.3 Visualisierung der Signalkaskade mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen (anti-p-SRC-Ak, anti-p-SYK-Ak, anti-p-AKT1/2/3-Ak).....	38
3.3.1 Visualisierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie	38
3.3.2 Visualisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie	40
3.3.2.1 Zeitreihen mit Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen	40
3.3.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen von anti-p-SRC-Ak, anti-p-SYK-Ak und anti-p-AKT1/2/3-Ak mit verschiedenen Induktoren.....	41

3.4 Spezifische Rezeptorinhibition von wichtigen an der Signalkaskade des Thrombozyten beteiligten Rezeptoren.....	45
3.4.1 Durchflusszytometrie mit Sartanen.....	45
3.4.2 Aggregometrie nach Born mit Sartanen.....	49
3.4.2.1 Losartan.....	49
3.4.2.2 Candesartan	50
3.4.2.3 Valsartan	52
3.4.2.4 Telmisartan	53
3.4.3 Vorapaxar	54
3.5 Lagerungsversuch mit dem Durchflusszytometer	56
<u>4. Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	<u>59</u>
<u>5. Diskussion</u>	<u>61</u>
5.1 Blutausstriche und Fluoreszenzmikroskopie.....	61
5.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	64
5.3 Erste weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem Einsatz verschiedener Inhibitoren.....	66
<u>6. Literaturverzeichnis.....</u>	<u>72</u>
<u>7. Anhang</u>	<u>IX</u>
7.1 Ablaufschema Färbung Blutausstriche.....	IX
7.2 Ablaufschema Durchflusszytomterie	X
7.3 Danksagung.....	XI
7.4 Eidesstattliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

A.dest./A.d.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ACDA	Acid-Citrat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AF488	Alexa Fluor 488
AF647	Alexa Fluor 647
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase AKT
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD62 P	P-Selektin
Chk	Csk-homologe Kinase
Csk	C-terminale SRC-Kinase
Donor	Spender
DPBS(+Mg ²⁺ +Ca ²⁺)	Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epi.	Epinephrin
FC	Durchflusszytometer
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
G _i	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (inhibierend)
GP	Glykoprotein
GPIbIX	Glykoprotein IbIX
GPIIbIIIa	Glykoprotein IIbIIIa
GPVI	Glykoprotein VI
G _q	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (über Second Messenger)
GTP	Guanosintriphosphat
human (hu)	aus dem Menschen stammend
IgG	Immunglobulin G
in vitro	Reaktion außerhalb des Organismus
in vivo	Reaktion innerhalb eines lebenden Organismus
Ip3	Inositol-1,4,5-triphosphat

ITP	idiopathische thrombozytopenische Pupura
K ⁺	Kalium
LAMP	Lysosomal-assoziierte Membranproteine
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NMMIIa	Myosin
P2Y-R	P2Y-Rezeptor
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PAR4	Protease-aktivierter Rezeptor 4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDW	Plättchen-Verteilungsbreite
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase
PLC	Phospholipase
PLT	Thrombozyten
PP	Prolinreich
PPP	thrombozytenarmes Plasma
PRP	plättchenreiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Rap	RAS-verwandtes Protein
RASGRP2	RAS-Guanyl-Releasing-Protein 2
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SFK	SRC-Kinasen Familie
SRC	Tyrosinkinase SRC
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
STD	Standard

h	Stunde
SYK	Tyrosinkinase SYK
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMEM16F	Transmembran-Protein 16F
TRAP-6	Thrombinrezeptor-aktivierendes Protein
TxA2-R	Thromboxan-Rezeptor
U46619	Selektiver Prostaglandin-H2/Thromboxan-A2- Agonist
vWF	von-Willebrand-Faktor
Y	Tyrosin
ZNS	Ziegennormalserum

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Teilübersicht Rezeptoren und Signalwege des Thrombozyten	1
Abbildung 2: Grundstruktur SRC-Kinase	6
Abbildung 3: SRC-Familie-Kinasen	7
Abbildung 4: Die doppelte Funktion der AKT-Kinase	8
Abbildung 5: Ausgewählte Rezeptoren inklusive möglicher Inhibitoren	9
Abbildung 6: Allgemeiner Ablaufplan	11
Abbildung 7: Aggregometrie nach Born	20
Abbildung 8: Normalstrukturen in der Fluoreszenzmikroskopie.	23
Abbildung 9: Intensität von GPIIb/IIIa	24
Abbildung 10: Intensität von IbIX	24
Abbildung 11: Intensität von-Willebrand-Faktor	25
Abbildung 12: Intensität von Thrombospondin	25
Abbildung 13: Intensität von LAMP1	26
Abbildung 14: Intensität von LAMP2	26
Abbildung 15: Intensität von CD63	27
Abbildung 16: Intensität von P-Selektin	27
Abbildung 17: Intensität von NMMIIa	28
Abbildung 18: Intensität von Filamin A	28
Abbildung 19: Intensität von β 1-Tubulin	29
Abbildung 20: Heatmap der Lagerungsergebnisse (Intensität)	30
Abbildung 21: Heatmap der Lagerungsergebnisse an unterschiedlichen Fixationstagen	33
Abbildung 22: Strukturverteilung von Filamin A bei EDTA-antikoaguliertem Blut.....	34
Abbildung 23: Strukturverteilung von Filamin A bei Citrat-antikoaguliertem Blut.....	35
Abbildung 24: Strukturverteilung von Filamin A bei Hirudin-antikoaguliertem Blut....	35
Abbildung 25: Strukturverteilung von NMMIIa bei EDTA-antikoaguliertem Blut	36
Abbildung 26: Strukturverteilung von NMMIIa bei Citrat-antikoaguliertem Blut	36
Abbildung 27: Strukturverteilung von NMMIIa bei Hirudin-antikoaguliertem Blut	36
Abbildung 28: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei EDTA-antikoaguliertem Blut ...	37
Abbildung 29: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei Citrat-antikoaguliertem Blut	37
Abbildung 30: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei Hirudin-antikoaguliertem Blut..	37
Abbildung 31: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung der SRC Kinase ..	39
Abbildung 32: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung der SYK Kinase ...	39

Abbildung 33: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung der AKT Kinase ...	40
Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse (n=4) der Phosphorylierungs-Zeitreihe von p-SRC, p-SYK, p-AKT1/2/3.....	41
Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von p-SRC .	42
Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von p-SYK .	43
Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von p-AKT1/2/3.....	44
Abbildung 38: Darstellung des Medians inkl. Range des MFI fold increase mit verschiedenen Induktoren und Inhibitoren, durchflusszytometrische Ergebnisse	47
Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse, Telmisartan in vivo	48
Abbildung 40: Darstellung des Medians inkl. Range des MFI fold increase mit verschiedenen Induktoren, Telmisartan in vivo	49
Abbildung 41: Aggregometrie nach Born, Losartan, Convulxin	50
Abbildung 42: Aggregometrie nach Born, Losartan, U46619	50
Abbildung 43: Aggregometrie nach Born, Candesartan, Convulxin	51
Abbildung 44: Aggregometrie nach Born, Candesartan, U46619.....	51
Abbildung 45: Aggregometrie nach Born, Valsartan, Convulxin.....	52
Abbildung 46: Aggregometrie nach Born, Valsartan, U46619	52
Abbildung 47: Aggregometrie nach Born, Telmisartan, Convulxin	53
Abbildung 48: Aggregometrie nach Born, Telmisartan, U46619	53
Abbildung 49: Aggregometrie nach Born, Patientenvollblut bei Telmisartaneinnahme, Convulxin	54
Abbildung 50: Aggregometrie nach Born, Vorapaxar, TRAP-6	55
Abbildung 51: Aggregometrie nach Born, Vorapaxar, U46619.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchflusszytometrische Analyse der Inhibition der Phosphorylierung spezifischer Kinasen im Vollblut, GPVI-Inhibitoren	45
Tabelle 2: Durchflusszytometrische Analyse der Inhibition der Phosphorylierung p-Akt1/2/3 im Vollblut, Vorapaxar	55
Tabelle 3: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-SRC zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten.	57
Tabelle 4: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-SYK zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten.	57
Tabelle 5: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-AKT1/2/3 zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten.	58

1. Einleitung

Das Blut besteht aus verschiedenen Bestandteilen. In ihm zirkulieren neben Erythrozyten und Leukozyten auch Thrombozyten. Die aus Megakaryozyten entstandenen kernlosen Thrombozyten sind mit einer Größe von 2-4 μm die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Sie spielen bei der Regulierung der Hämostase, der Steuerung der vaskulären Integrität sowie bei Herz- und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Ein gesunder erwachsener Mensch besitzt in etwa zwischen 150.000/ μL und 400.000/ μL Thrombozyten. Durchschnittlich zirkulieren sie sieben bis zehn Tage im Blut (1, 2, 3), bevor sie dann von Milz und Leber abgebaut werden. Durch ihre Vorläuferzellen besitzen Thrombozyten mRNA und sind damit bedingt zur Proteinsynthese im Stande (4, 5). Thrombozyten exprimieren an ihrer Oberfläche eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation spielen. Dazu gehören der GPVI-Rezeptor für Kollagen, GPIIb/IIIa-Rezeptor für Fibrinogen, $\alpha_2\text{A}$ -adrenerge Rezeptor für Adrenalin, TxA_2 -Rezeptor für Thromboxan A_2 , GPIb/IX-Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor, PAR1- und PAR4-Rezeptor für Thrombin (6) sowie P_2Y_1 - und P_2Y_{12} -Rezeptor für ADP (Abb. 1) (7).

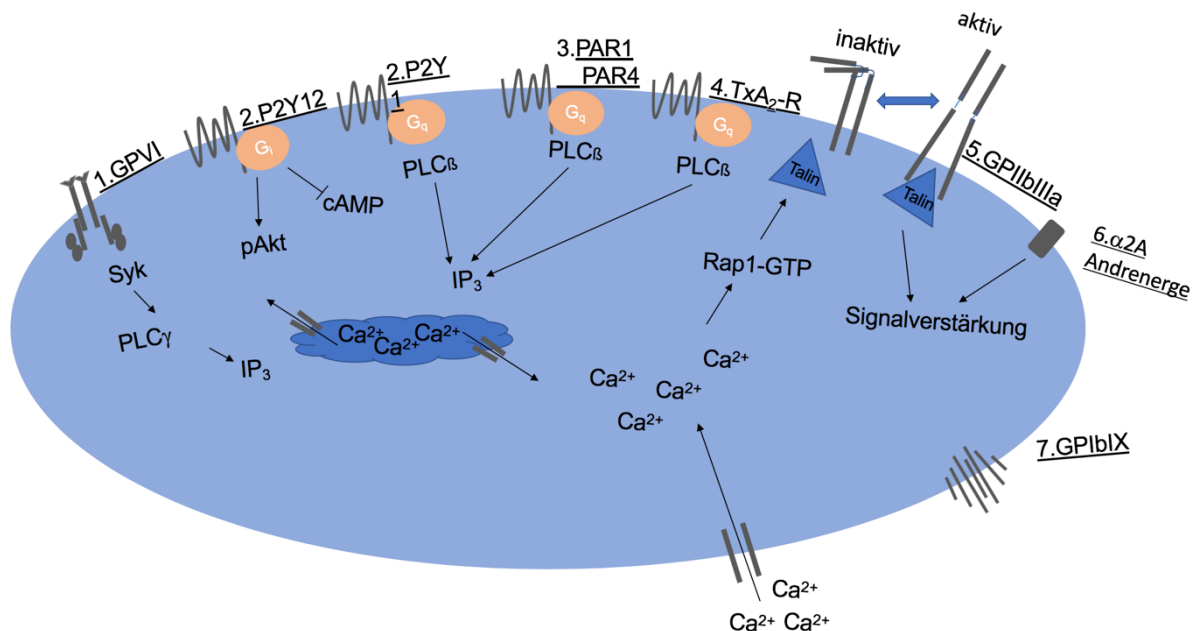


Abbildung 1: Teilübersicht der an der Thrombozytenaktivierung beteiligten Rezeptoren und Signalwege, eigene Darstellung in Anlehnung an Stalker et al. (2012), S.23. PLC = Phospholipase C, PKC = Proteinkinase C, IP_3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat, TxA_2 = Thromboxan A_2 , cAMP = Cyclisches Adenosinmonophosphat, Rap = Ras-verbundenes Protein, GTP = Guanosintriphosphat, PAR = Protease-aktivierter Rezeptor.

Im Zytoplasma der Thrombozyten finden sich unterschiedliche Granula, die bei der Aktivierung freigesetzt werden. Alpha-Granula enthalten im Wesentlichen Stoffe, die an der Initiierung der primären Hämostase der Thrombozyten beteiligt sind. Hierzu gehören neben Fibrinogen auch vWF und Laminin. Es sind aber auch entzündungsfördernde Lektine wie CD62 P (P-Selektin) sowie regulatorische Proteine wie das Thrombospondin enthalten. Die elektronendichten Granula entleeren bei Aktivierung ADP, Serotonin und Calcium, das in hoher Konzentration gespeichert ist. Thromboxan A₂ wird bei der Aktivierung des Thrombozyten gebildet und ist für die Freisetzung der Granulainhaltsstoffe entscheidend. Thrombozyten können mit Hilfe von Aktin, Myosin und Mikrotubuli Pseudopodien bilden, wodurch ihre Oberfläche vergrößert, und die Entleerung der verschiedenen Granula vereinfacht wird. Als Reservoir für Calciumionen wirkt ein geschlossenes tubuläres Membransystem (1, 2, 8, 9, 10).

Heute weiß man, dass die Thrombozyten ebenfalls in der Pathologie der Interaktion mit Bakterien, Viren sowie der chronischen Entzündung eine wichtige Rolle spielen (1, 3). Dabei besitzen Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine entscheidende Funktion. Man findet in den menschlichen Thrombozyten zehn verschiedene TLR. Die TLR 1, 2, 4, 5, 6 befinden sich als Transmembranrezeptoren auf der Zelloberfläche. Bakterielle Membranbestandteile werden durch TLR 1, 2, 4, 5, 6; Pilzbestandteile durch TLR 2, 4, 6; parasitäre Bestandteile durch TLR 2, 4 und virale Bestandteile durch TLR 2, 4 erkannt. Die TLR 3, 7, 8, 9 hingegen befinden sich intrazellulär in den Endosomen. Die verschiedenen TLR besitzen verschiedene Signalwege, in denen unter anderem die SRC-, SYK- und AKT-Kinase eine entscheidende Rolle spielen (11).

Zusätzlich bestehen Wechselwirkungen von Thrombozyten mit Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Bei der adaptiven und angeborenen Immunreaktion spielen diese Wechselwirkungen der Thrombozyten eine wichtige koordinierende Rolle (3).

Thrombozyten können auch als nichtinvasive Biomarker zur Einschätzung von Erkrankungen genutzt werden, so beispielsweise, dass mittlere Plättchenvolumen (MPV) oder die Plättchenverteilungsbreite (PDW) (1). Thrombozyten dienen aber nicht nur als nichtinvasive Biomarker oder haben eine Rolle in der Immunreaktion, sondern ihnen kommt vielmehr die Schlüsselrolle bei der Hämostase zu. Thrombozytopenien oder -pathien verursachen häufig Störungen in der primären Hämostase. Ab einer Thrombozytenzahl unter 150.000/μL wird von einer Thrombozytopenie gesprochen.

Besitzt ein Mensch weniger als 50.000 bis 60.000/ μ L Thrombozyten, so treten häufig spontane Blutungen auf (12). Angeborene Thrombozytopenien sind selten. Eine angeborene Thrombozytopenie kann entweder durch einen absoluten Mangel an Megakaryozyten oder eine Reifungsstörung entstehen. Aber auch ein beschleunigter Abbau, wie z.B. beim von-Willebrand-Syndrom Typ2B oder beim Wiscott Aldrich Syndrom kann zu einer Thrombozytopenie führen. Erworbene Störungen sind deutlich häufiger der Grund für geringe Thrombozytenkonzentrationen (12). Hier ist der antikörpervermittelte Abbau bei der idiopathischen Autoimmunthrombozytopenie (ITP) eine der häufigsten Ursachen.

Thrombozytopathien hingegen sind Erkrankungen mit gestörter oder verminderter Funktion der Thrombozyten wie z.B. das Bernhard-Soulier-Syndrom oder die Glanzmann-Thombasthenie. Hereditäre Thrombozytopathien sind selten und es besteht die Gefahr, dass sie nicht richtig diagnostiziert werden. Häufig kommt es zu Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von erworbenen oder angeborenen Störungen. Das klinische Auftreten der angeborenen Thrombozytopathien ist sehr variabel und kann von leichten Hämatomen bis zu starken Blutungen reichen (13). Häufig werden diese Thrombozytopathien auch erst durch die zusätzliche Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern klinisch manifest.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können heute Thrombozytopathien durch strukturelle Defekte oder charakteristische Fehlverteilungen von Thrombozytenproteinen im Blutaussstrich nachgewiesen werden. Als besonders geeignet zeigte sich die Methode bei dem Bernard Soulier Syndrom, der Thrombasthenie Glanzmann, dem Gray-Platelet Syndrom und der Gruppe der MYH9-Defekte. Insgesamt konnte bei 27 % der 3.217 Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Thrombozytenstörungen mit Hilfe der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie eine Thrombozytenstörung gezeigt werden. Einige Störungen können hingegen durch diese Methode nicht identifiziert werden. Positiv zeigte sich, dass für diese Art der Untersuchung nur sehr geringe Blutmengen benötigt werden, was vor allem für Kinder oder Personen ein Vorteil ist, bei denen sich größere Blutverluste zu diagnostischen Zwecken negativ auswirken. Die Fluoreszenzmikroskopie kann zudem kostengünstig und zentralisiert durchgeführt werden. Dies stellt einen großen Vorteil für Regionen mit einer geringen Dichte an Speziallaboren dar, in dem die Proben einfach an Zentrallabore versendet werden können (14). Da viele Blutausstriche dadurch zur

fluoreszenzmikroskopischen Diagnostik postalisch an spezielle Labore versandt werden und somit einige Tage transportiert werden, war es wichtig, herauszufinden, ob diese Blutausrichhe nach diesem Zeitraum weiterhin auswertbar sind oder Lagerungsartefakte auftreten. Dieser Aspekt blieb bislang in der Diagnostik weitestgehend unberücksichtigt, ist aber von besonderer Bedeutung, um Fehldiagnostiken in Bezug auf die Lagerungsartefakte zu vermeiden. Wird dieser Punkt mit einbezogen, könnten somit Über- oder Unterdiagnostiken von Erkrankungen vermieden werden.

Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt bezieht sich auf das verwendete antikoagulierte Vollblut zur Herstellung von Blutausrichen. Zum heutigen Stand gehen viele Einsendungen aus unterschiedlichen Laboren zur Diagnostik ein. Diese verwenden zum Anfertigen von Blut unterschiedliche Antikoagulantien (EDTA, Citrat und Hirudin). Um eventuelle Unterschiede in der Lagerung sowie der Anfälligkeit für Artefakte zwischen den verschiedenen Antikoagulantien feststellen zu können, sollte auch diese genannte Variable in die Lagerungsversuche mit integriert werden. Aus diesem Grund wurde für die Lagerungsversuche der Untersuchung EDTA-, Citrat- und Hirudin-antikoaguliertes Vollblut verwendet. Aufgrund der zuvor beschriebenen bisher kaum Berücksichtigten Rahmenbedingungen bei der Lagerung, war ein Ziel dieser Arbeit die standardisierte Untersuchung der Lagerung von Blutausrichen. Dazu wurden die bereits in Greifswald in der Routinediagnostik etablierten Färbungen und Antikörper für die Lagerungsversuche verwendet. Die verwendeten Antikörper richteten sich gegen Strukturproteine und Alpha- und Delta-Granula-Marker.

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Technik der Fluoreszenzmikroskopie können bis heute nur morphologische Defekte des Thrombozyten dargestellt werden. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war der Versuch der Darstellung von funktionellen Defekten und Störungen von Thrombozyten. Funktionelle Störungen können in den diversen zur Aktivierung führenden Abschnitten der Signaltransduktionskaskade der Thrombozyten liegen. Da bei der Funktion von Thrombozyten eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden benötigt werden, stellte sich die Frage, wie man Fehler oder Störungen in diesem Bereich darstellen kann.

Wichtig für diese Überlegungen war die Kenntnis, dass es nach der Aktivierung der Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von Enzymen kommt. Diese führt zur Freisetzung von Calciumionen, wodurch Veränderungen im Zytoskelett entstehen und

weitere Oberflächenrezeptoren aktiviert werden. Dadurch kommt es zum Formwandel der Thrombozyten. Funktionelle Störungen im Bereich der Signaltransduktionskaskade sind bis heute schwierig zu diagnostizieren. Für diese Diagnostik werden funktionelle Untersuchungen, wie z.B. die Aggregometrie nach Born, benutzt, die bis heute als Goldstandard der Thrombozytenfunktionstests gilt (15, 16, 17, 18). Seit einigen Jahren sind durch eine Vielzahl von Genomanalysen – wie z.B. der “Bridge-Studie“ aus Cambridge die genetische Ursache für Thrombozytenfunktionsdefekte identifiziert worden. Diese Identifizierung von genetischen Defekten in Thrombozyten ist jedoch auf eine möglichst genaue und teure Phänotyp-Charakterisierung angewiesen (19, 20, 21). Häufig bleiben auch heute noch Funktionsdefekte unerkannt und fallen erst im Zusammenhang mit anderen Co-Faktoren, wie beispielsweise der Einnahme von Aspirin oder Ibuprofen, durch klinisch relevante Blutungen auf. Basierend auf dem Wissen und den Erfahrungen der Darstellung von morphologischen Thrombozytendefekten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie entstand der Gedanke, durch das Anfärben von phosphorylierten Kinasen, die an der Signaltransduktionskaskade in Thrombozyten beteiligt sind, auch funktionelle Defekte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachweisen zu können. Dieses Ziel der Visualisierung und damit der Darstellung der funktionellen Defekte, sollte mit Hilfe von drei verschiedenen Kinasen (SRC, SYK und AKT) durchgeführt werden. Jede einzelne der Kinasen spielt in unterschiedlichen Aktivierungswegen der Thrombozyten eine Rolle. Dazu wurden dem antikoagulierten Vollblut des Probanden¹ oder Patienten zusätzlich verschiedene Agonisten (z.B. Convulxin, Arachidonsäure, TRAP-6, ADP, Adrenalin, U46619 und Kollagen) sowie Antagonisten (z.B. Losartan, Telmisartan, Valsartan, Candesartan und Vorapaxar) zugefügt.

Parallel zu dem Ansatz der angefertigten Blutausrichungen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurden, wurde ein Ansatz im Durchflusszytometer durchgeführt und ausgewertet.

Im Folgenden werden exemplarisch einige für die fluoreszenzmikroskopischen sowie durchflusszytometrischen Untersuchung verwendeten Kinasen und gezielte Inhibitoren kurz vorgestellt. Die SRC-Kinase (Abb. 2) gehört zu den SFK, dazu gehören wiederum SRC, Yes, Lyn, Hck, Fyn, Fys und Lck.

¹ In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden ausdrücklich mit eingeschlossen, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

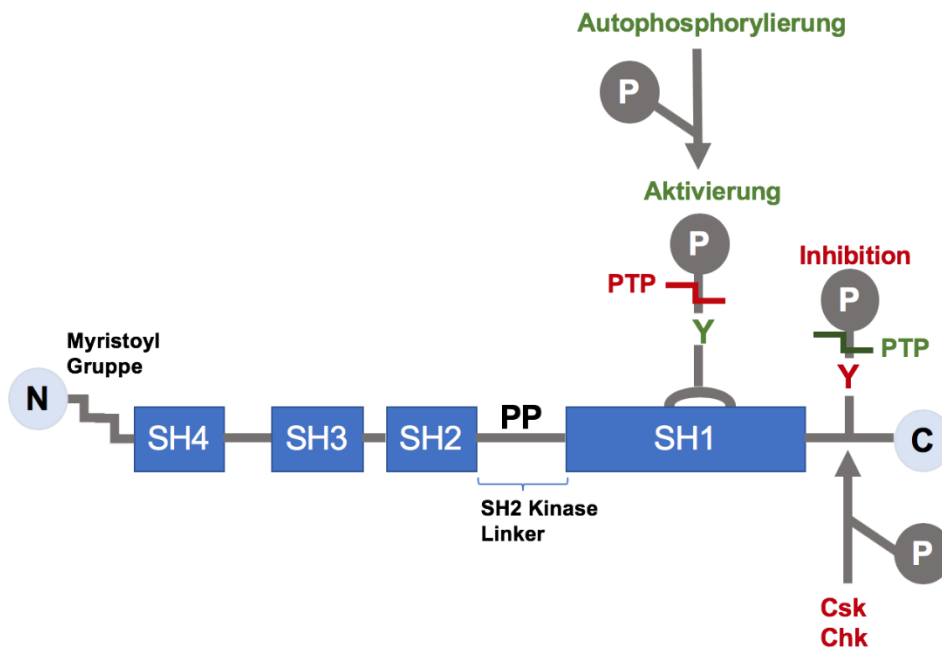


Abbildung 2: Grundstruktur SRC-Kinase, eigene Darstellung in Anlehnung an Senis et al. (2014), S.4. Die Myristoyl-Gruppe am N-terminalen Ende ist mit einer SH4-Domäne verbunden. SH4- und SH3- Domäne sind durch eine „Unique Region“ verbunden. Zwischen der SH2- und SH1-Domäne befindet sich eine prolinreiche Verbindungsregion. Jeweils ein Tyrosin befindet sich am C-terminalen Ende und am Aktivierungsarm. Eine Phosphorylierung des Tyrosins am Aktivierungsarm führt zu einer Zunahme der SRC-Aktivität, während die Phosphorylierung des Tyrosins am C-terminalen Ende zu einer Inhibition führt. Dephosphorylierung führt zu einer Zunahme oder Abnahme der SRC-Aktivität. **Grün** stellt die Aktivierung und **Rot** die Inhibition dar. Csk = C-terminale SRC-Kinase, Chk = Csk-homologe Kinase, PTP = Protein-Tyrosin-Phosphatase, Y = Tyrosin, PP = prolinreich)

Die SFK übersetzen, wie in Abb. 3 exemplarisch dargestellt, verschiedene Bindungen von Liganden an den Thrombozytenrezeptoren GPIIb/IIIa, GPVI und GPIb/IX in eine Thrombozytenaktivierung (22). Durch den Anstieg der SFK-Aktivität kommt es durch eine Tyrosin-Phosphorylierung von Enzymen und Zytoskelettproteinen, die für die Koordination und Steuerung der Thrombozytenaktivierung wichtig sind. Zusätzlich bewirken SFK eine Aktivierung von G_q- und G_i- Rezeptorsignalen, was einen ergänzenden Effekt besitzt und dadurch eine maximale Aktivierung und thrombotische Wirkung der Thrombozyten bewirkt.

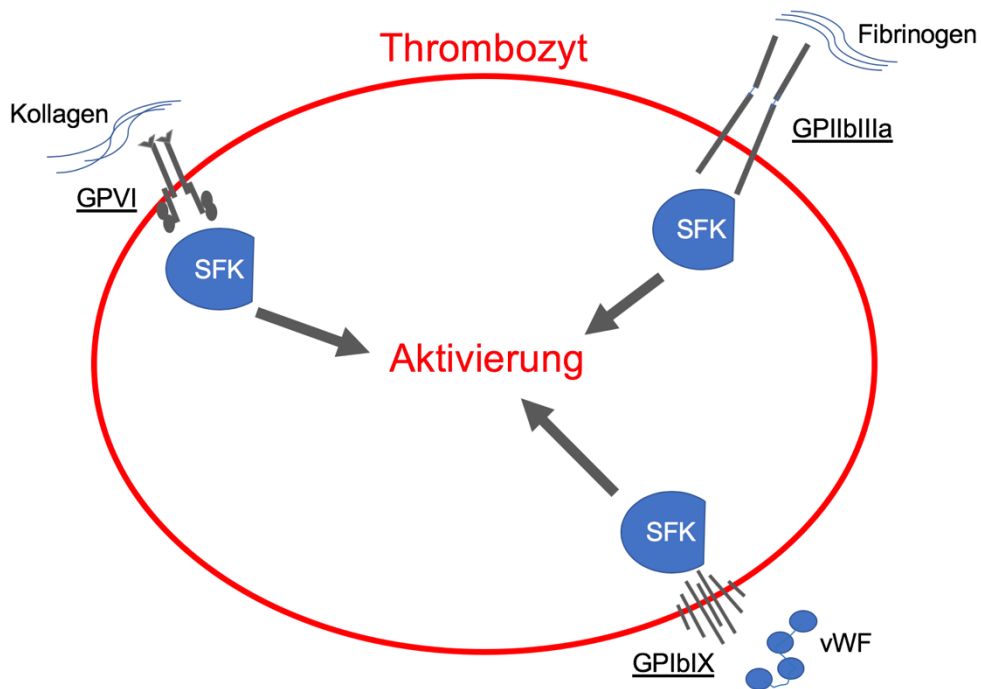


Abbildung 3: SRC-Familie-Kinasen (SFK) und zugehörige Rezeptoren im Überblick, eigene Darstellung in Anlehnung an Senis et al. (2014), S.2.

Darüber hinaus werden durch bestimmte SFK auch inhibitorische Wege aktiviert, die die Größe der Thromben und Aktivität limitieren, wodurch eine überschießende Reaktion verhindert wird. Die SRC- und Fyn-Kinase besitzen nur positive regulatorische Effekte, während die Lyn-Kinase positive und negative regulatorische Wirkung zeigt (22).

Die ebenfalls zu betrachtende AKT1/2- Kinase besitzt in Thrombozyten eine doppelte Funktion (Abb. 4). Zum einen aktiviert sie Thrombozyten, zum anderen steuert sie die Apoptose. GPIb α ist eine Untereinheit des GPIbIX-Rezeptors am N-Terminus und bindet vWF oder Thrombin (23, 24).

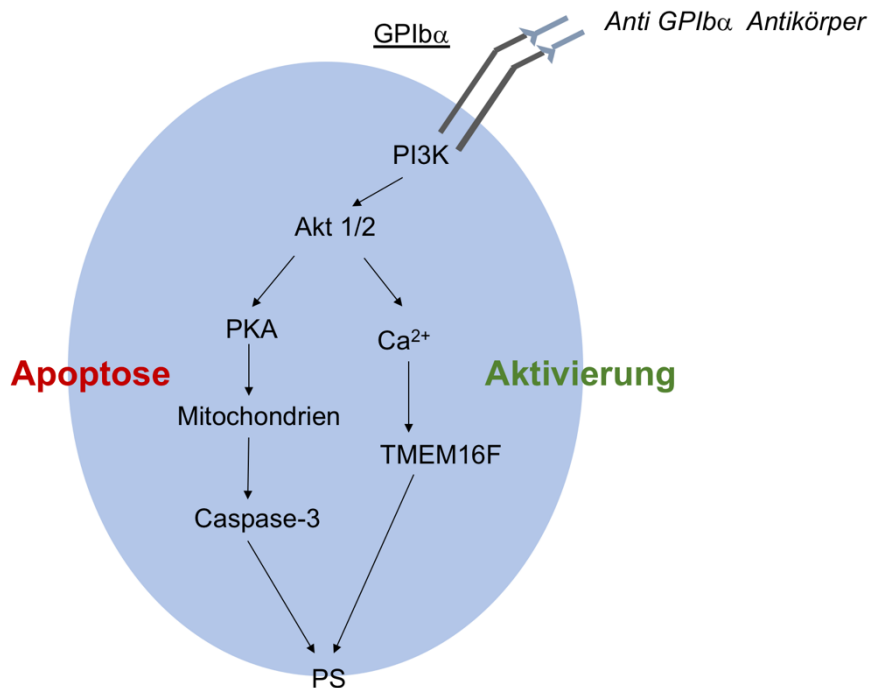


Abbildung 4: Die doppelte Funktion der AKT-Kinase, eigene Darstellung in Anlehnung an Mengxing Chen et al. (2018), S.7. Durch die Bindung von Anti-GPIb α -Antikörper kommt es durch PI3K zur Aktivierung von AKT 1/2. Dies führt auf der einen Seite durch PKA-Inhibition zur Apoptose und auf der anderen Seite durch Ca²⁺-Anstieg zur Aktivierung des Thrombozyten. PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen, PS = Phosphatidylserin, TMEM16F = Transmembranprotein 16F.

Die AKT-Kinase spielt dazu eine Schlüsselrolle bei der idiopathischen Thrombozytopenie (ITP) mit Autoantikörpern gegen GPIbIX. Durch die apoptotische Wirkung mit Hilfe von AKT wird Phosphatidylserin exprimiert, welches zur Phagozytose durch Makrophagen in der Leber führt. Dieses Wissen ergibt heute neue Möglichkeiten für therapeutische Strategien in der Behandlung der ITP (23).

Durch das bisherige Wissen über die verschiedenen Signalwege, den daran beteiligten Kinasen und den heute bereits vorhandenen spezifischen Inhibitoren lassen sich Wege gezielt inhibieren. Ziel ist es, einzelne Signalwege gesondert zu betrachten und deren Funktion zu beurteilen. Dies gelingt durch gezieltes Blockieren anderer Signalwege (Abb. 5). Für den GPVI-Rezeptor haben wir uns für die Medikamentengruppe der Sartane entschieden, da diese in der Literatur als geeignete Inhibitoren beschrieben werden. Die Sartane besitzen zusätzlich zur GPVI-Rezeptor-Inhibition auch eine Wirkung auf den TxA₂-Rezeptor (25). Für den PAR1-Rezeptor eignet sich das Medikament Vorapaxar als Inhibitor (26, 27, 28, 29). Um den PAR4-Rezeptor zu inhibieren, existiert die Substanz BMS-986120 (28, 30).

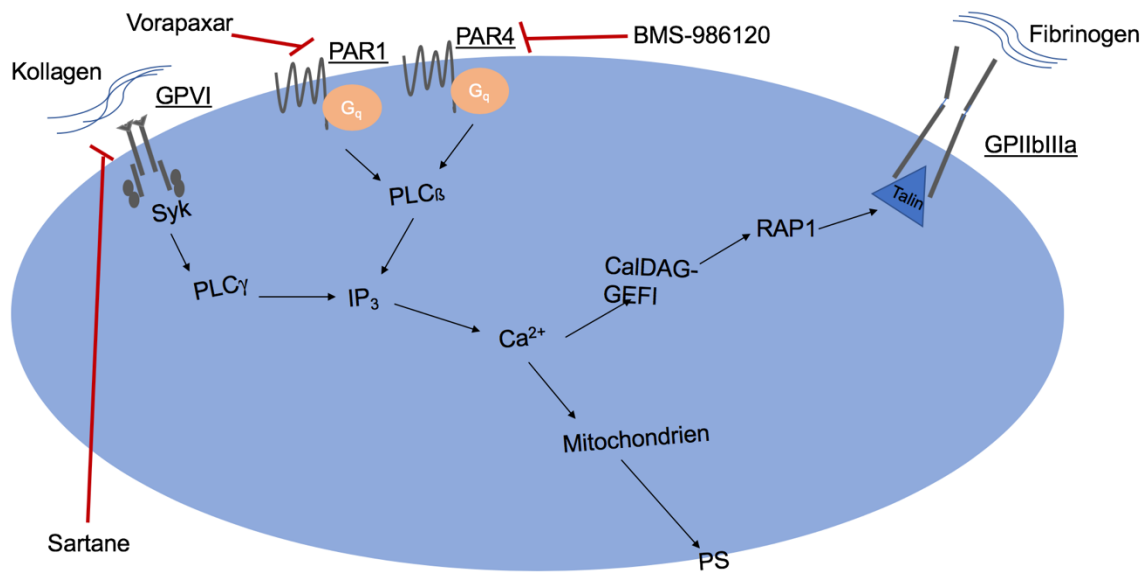


Abbildung 5: Ausgewählte Rezeptoren inklusive möglicher Inhibitoren, eigene Darstellung in Anlehnung an Grover et al. (2018), S.2. CalDAG-GEFI=RASGRP2 (RAS Guanyl Releasing Protein 2)

Mit Hilfe dieser Arbeit könnte eine bessere Charakterisierung der Signalwege der Thrombozyten beispielsweise dabei helfen, Blutungs- bzw. Thromboserisiken bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und der Indikation zur Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern besser vorausszusagen. Vor allem bei multimorbiden Patienten spielt dieser Gedanke im Zusammenhang mit der Risikostratifizierung eine große Rolle. Ein Haupteinsatzpunkt eröffnet sich auch dadurch, dass bei dieser Methode nur kleinste Blutmengen benötigt werden, was sie besonders für den pädiatrischen Bereich attraktiv macht. Ebenso profitieren auch andere Patientengruppen, bei denen eine Anämie oder andere größere Verluste oder Störungen mit dem Blutvolumen bestehen. Es wäre ein weiterer Schritt in die personalisierte Medizin. Die Personalisierte Medizin ist heute ein Teil der Zukunft der Medizin, die die konventionelle Medizin ergänzt und spezifisch das einzelne Individuum in den Vordergrund der Betrachtung stellt. Sie hilft auch, die Prozesse zu verbessern und ist eine Möglichkeit, die Kosteneffizienz zu steigern (31, 32).

Infolge der bereits oben erläuterten Zielsetzungen dieser Arbeit lassen sich zusammenfassend folgende Forschungsfragen formulieren:

Forschungsfrage 1:

Welchen Einfluss besitzt der Lagerungszeitraum von einem Blutausstrich unter Berücksichtigung unterschiedlich verwendeter Antikoagulantien auf etwaige Lagerungsartefakte?

Forschungsfrage 2:

Können funktionelle Thrombozytendefekte in der Signalkaskade mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie oder der Durchflusszytometrie durch den Nachweis von phosphorylierten Kinasen dargestellt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeiner Ablauf

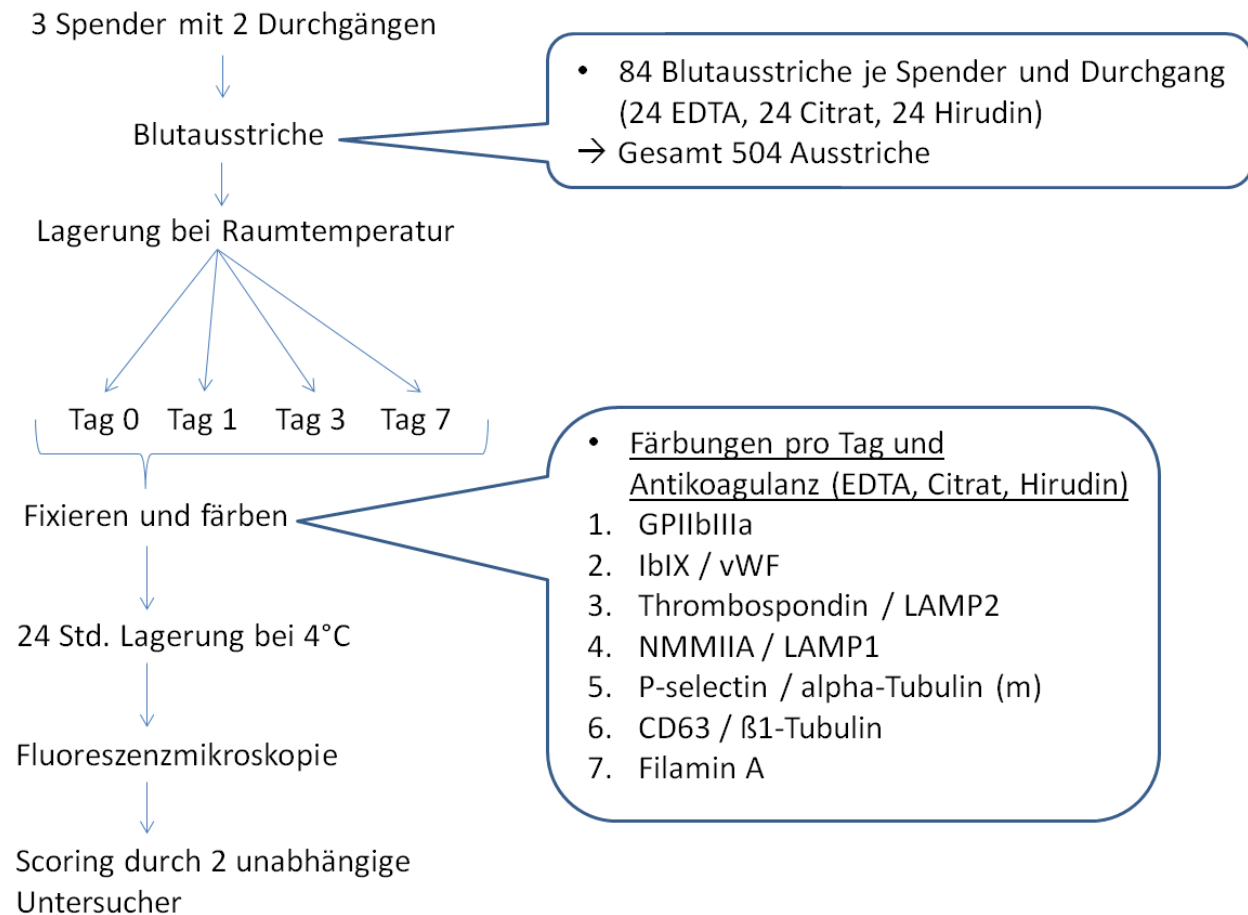


Abbildung 6: Allgemeiner Ablaufplan

2.2 Humanes Vollblut – Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei gesunden Probanden, die mindestens 14 Tage keine Medikamente eingenommen haben, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Es wurde möglichst auf Stauung verzichtet, um die Thrombozyten nicht zu aktivieren. Pro Spender und Durchgang wurden jeweils ein EDTA-, Citrat- und Hirudin-antikoaguliertes Blutröhrchen entnommen. Für die Lagerungsversuche erfolgte die Entnahme von insgesamt drei Spendern in zwei Durchgängen. Weitere Blutentnahmen waren für die Versuche mit humanem Vollblut im Durchflusszytometer nötig.

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Hautdesinfektion, octeniderm	Schülke & Mayr, Norderstedt, DE
BD Vacutainer, Safety-Lok, Blood Collection Set, 21Gx3/4x7	BD, Franklin Lakes, USA
9NC Citrat, BD Vacutainer 1,8mL	BD, Franklin Lakes, USA
K2E EDTA, BD Vacutainer 4mL	BD, Franklin Lakes, USA
S-Monovette Hirudin	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.3 Blutausstriche

Zum Anfertigen der Blutausstriche wurden EDTA-, Citrat- und Hirudin antikoaguliertes Blut verwendet. Um in der Ausstrichdiagnostik mit antikoaguliertem Blut eine Thrombozytenaggregation zu verhindern, wurden 500 µL Vollblut mit 1 µL Abciximab (2 µl/mL) versetzt und 3 min inkubiert (7).

3,5 µL des Vollblutes wurden auf einen Superfrost-Objektträger gegeben und mit einem FlexiStrip ausgestrichen und mindestens 30 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Um aktivierte Blutausstriche zu erhalten, wurden 90 µL des mit Abciximab inkubierten Vollblutes mit 10 µL Arachidonsäure (final 1,5 mmol/L) versetzt und bei 37 °C im Brutschrank für 3 min und 500 rpm auf dem Orbitalrüttler inkubiert. Dann erfolgte das Ausstreichen wie bereits beschrieben.

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Objektträger Superfrost	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Ausstreichspatel FlexiStrip	Heinz Herenz, Hamburg, DE

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
NaCl 0,9%	B.Braun, Melsungen, DE
ReoPro/Abciximab	Centocor, Leiden, NL
Arachidonsäure	MöLab, Langenfeld, DE

2.4 Blutausstriche fixieren

Die getrockneten und bei Raumtemperatur gelagerten Blutausstriche wurden in -20°C kaltem Aceton für 2 min permeabilisiert und für mindestens 3 h trocknen gelassen.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Acetone	Sigma, St. Louis, USA

2.5 Blutausstriche färben

Für die Färbung wurde eine Feuchtkammer benötigt, um das Austrocknen der Blutausstriche während der Inkubationszeiten zu verhindern. Als erstes wurde mit einem Liquidblocker-Pen auf dem fixierten Blutausstrich der Endbereich des Ausstriches, auch Fahnenende genannt, umrandet. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden $50\ \mu\text{L}$ ZNS-10% auf jeden Blutausstrich in den umrandeten Bereich pipettiert und gleichmäßig mit der Pipettenspitze verteilt. Mit PBS wurde das Ziegennormalserum zu ZNS-10% verdünnt und auf einen pH-Wert von 7,25 titriert.

Die Blutausstriche wurden dann in einer Feuchtkammer 30 min inkubiert.

Die primären Antikörper für die Färbungen wurden in den unten aufgeführten Verdünnungen aus dem Stock hergestellt. Es wurde darauf geachtet, möglichst immer eine Gegenfärbung mit einem zweiten primären Antikörper zu verwenden, z.B. Maus-gegen Kaninchen-Antikörper. Das birgt zum einen den Vorteil, dass auf einem Blutausstrich zeitgleich zwei Strukturen beurteilt werden können. Zum anderen zeigt diese doppelte Färbung, bei fehlender Darstellung einer der beiden Strukturen bei zeitgleicher Darstellbarkeit der zweiten Struktur, dass der Färbeprozess erfolgreich war.

1. anti- GPIIbIIIa final 1/2000
2. anti-IbIX final 1/500
3. anti-Von-Willebrand-Faktor final 1/2000
4. anti-Thrombospondin final 1/400
5. anti-Lamp 2 final 1/20
6. anti-Lamp 1 final 1/20
7. anti-Myosin final 1/20000
8. anti- P-Selectin final 1/400
9. anti-CD63 final 1/5000

10. anti-alpha-Tubulin (R) final 1/200
11. anti-alpha-Tubulin (M) final 1/2000
12. anti-β1-Tubulin final 1/5000
13. anti p-SRC-Antikörper final 1/100
14. anti p-SYK-Antikörper final 1/100
15. anti p-AKT1/2/3 final 1/100

Von dem primären Antikörper wurden anschließend jeweils 50 µL auf den Blutausschrieb pipettiert und erneut in der Feuchtkammer für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blutausschriebe für 3x5 min mit PBS gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden wie folgt verdünnt:

1. Goat-anti-Rabbit-IgG, AF568 final 1/400
2. Goat-anti-Mouse-IgG, AF488 final 1/400

Je Blutausschrieb wurde eine Gesamtmenge von 50 µL aufgetragen und im Dunkeln erneut für eine Stunde inkubiert. Die Blutausschriebe wurden erneut 3x5 min mit PBS gewaschen und danach mit einem Tropfen Fluorescent Mounting Medium und einem Deckgläschen versehen. Bis zur Mikroskopie wurden sie bei 4°C im Dunkeln über Nacht gelagert. (Ablaufschema siehe Anhang 7.1)

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua dest	Millipor Reinstwasseranlage, Greifswald, DE
DPBS (+Mg ²⁺ +Ca ²⁺)	Life technologies, Carlsbad, USA
ReoPro/Abciximab	Centocor, Leiden, NL
Roti-Mount FluorCare	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
ZNS, Goat Serum Donor Herd	Sigma, St. Louis, USA

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Myosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-AKT1/2/3, (phospho Y315,316,312) antibody	abcam, Cambridge, UK
Anti-alpha-Tubulin antibody(RM113)	abcam, Cambridge, UK

Anti-alpha-Tubulin antibody, DM1A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-SYK (phosphoY323) antibody	abcam, Cambridge, UK
Anti-Thrombospondin 1 antibody	abcam, Cambridge, UK
CD62P (P-Selectin)	BD, Franklin Lakes, USA
Goat anti-Mouse-IgG, AF488	ThermoFisher, Waltham, USA
Goat anti-Rabbit-IgG, AF568	ThermoFisher, Waltham, USA
GPIIbIIIa	Beckman Coulter, Brea, USA
Monoclonal anti- β -Tubulin (TUB2.1)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mouse-anti-Human-CD42a antibody (IbIX)	Bio Rad, Hercules, USA
Mouse-anti-Human-Filamin 1 antibody	santa cruz, Dallas, USA
Mouse-IgG1-LAMP-1 antibody (H5G11)	santa cruz, Dallas, USA
Mouse-IgG1-LAMP-2 antibody (H4B4)	santa cruz, Dallas, USA
Purified Mouse-anti- Human-CD63	BD, Franklin Lakes, USA
Purified Mouse-anti-Human,	
Rabbit anti-Human p-c-SRC (Tyr419)	santa cruz, Dallas, USA
Rabbit anti-Human-von-Willebrand-Factor	Dako, Agilent, Santa Clara, USA

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Feuchtkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Liquid Blocker Super Pap Pen	Daido Sangyo Co., Tokyo, JP
Deckgläschen 24x24mm, Dicke 0,13-01,16mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DE

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, DE
Labor pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz, DE
Magnetrührer IKA RH basic 2	IKA-Werke, Staufen, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.6 Lagerung der Blutausstriche

Die unfixierten und ungefärbten Blutausstriche wurden bei Raumtemperatur bis Tag 1,3 und 7 gelagert. Die fixierten und gefärbten Blutausstriche wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezialisierte Form der Lichtmikroskopie. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden. Diese Antikörper strahlen dann Licht anderer Wellenlängen ab (= Stoke-shift) (33).

Die gefärbten Blutausstriche wurden am Fluoreszenzmikroskop mit Immersionsöl bei 60-facher Vergrößerung mikroskopiert.

Jeder Blutausstrich wurde durch zwei Personen bewertet. Es wurden jeweils drei Gesichtsfelder begutachtet. Von jedem Blutausstrich wurden Fotos gemacht, waren Doppelfärbungen vorhanden, wurde jede Färbung einzeln fotografiert. Die Bewertung der Bilder basierte auf einem Scoring-Prinzip, bei dem die Intensität und die strukturelle Verteilung bewertet und in einer Exceltabelle dokumentiert wurden. Die Intensität wurde auf einer Skala von 0 (nicht vorhanden) bis 3 (starke Intensität) bewertet. Bei der strukturellen Verteilung dienten ebenfalls Zahlen als Codierung für bestimmte Strukturanordnungen.

0 = nicht vorhanden

1 = granulär

2 = peripher

3 = diffus

4 = Ringstruktur

5 = unterbrochene Ringstruktur

6 = intrazellulär, knäuelig verteilt

7 = normal

8 = vermindert

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Immoil-F30CC Immersionsöl	Olympus, Hamburg, DE
<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Objektiv UPLSAPO60XO	Olympus, Hamburg, DE
Olympus BX40 Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg, DE

2.8 Durchflusszytometrie mit dem Cystomics FC 500 von Beckman Coulter

Mit dem Durchflusszytometer können einzelne Zellen detektiert werden. Zudem erlaubt es die Identifizierung und Quantifizierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene. Mit Hilfe von verschiedenen Lasern können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Die Zellen werden nacheinander in einer Kapillare transportiert und von verschiedenen Laser- und Detektionseinheiten erfasst. Damit können einerseits Merkmale wie die Größe durch das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und andererseits die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) erfasst werden. Die einzelnen Signale werden durch eine Software ausgewertet (34).

Ziel dieser Arbeit war es, die Phosphorylierung der Thrombozyten im Vollblut nachzuweisen. Dies geschah mit Hilfe eines Durchflusszytometers und dem Einsatz von immunfluoreszierenden Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen. Um spezifisch die Thrombozyten nachzuweisen, wurde in jedem Ansatz ein anti-Human-CD31-Plättchenmarker (1/140) verwendet, der AF647-markiert ist und zusätzlich die Antikörper gegen die phosphorylierten Kinasen. Diese verschiedenen phosphorylierten Kinase-Antikörper (anti-p-SRC-Ak (1/40), anti-p-SYK-Ak (1/100), anti-p-AKT1/2/3(1/100)) sind AF488-markiert und damit optimal für die Anregungswellenlänge des im Durchflusszytometer verwendeten Argonlasers (488nm).

Für alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde mit EDTA-, Citrat- oder Hirudin-antikoagulierten Vollblut als Ausgangsmaterial gearbeitet. Das PerFix-nc-assay-Kit diente als Grundlage. Das Vollblut wurde für 3 min mit 2µL/mL Abciximab inkubiert. Je nach Versuchsprotokoll wurde für ein Tube Blut mit 1 zu 10 NaCl 0,9% versetzt und als Negativkontrolle verwendet. Weitere Tubes wurden mit unterschiedlichen Induktoren und ggf. weitere Tubes mit Induktor und einem spezifischen Inhibitor, wie z.B. Aspirin, Losartan, Telmisartan, Valsartan, Candesartan

oder Vorapaxar, versetzt. Um den optimalen Zeitraum der Aktivierungen der phosphorylierten Antikörper zu finden, wurden zu Beginn Zeitreihenversuche durchgeführt. Bei diesen wurden verschiedene Inkubationszeiten bei 37 °C und 500 rpm auf dem Orbitalrüttler mit den Induktoren getestet. Nach der Inkubation wurde jedes sample mit 1 zu 10 mit PerFix-nc Buffer 1 (Fixativ Reagenz) für 15 min fixiert. In der Inkubation wurde ein Mastermix - bestehend aus dem anti-Human-CD31-Pättchenmarker, dem AK gegen die spezielle phosphorylierte Kinase und dem PerFix-nc-Buffer 2 (Permeabilisierungsreagenz) -hergestellt. Zusätzlich wurden FACS-tubes mit Isotypkontrollen und den Soloantikörpern vorbereitet. Auf die Menge von 20µL Vollblut kamen 150µL PerFix-nc-Buffer 2. Das Gemisch aus AK, Vollblut und PerFix-nc-Buffer 2 wurde mit dem Vortex vermischt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1,5 mL des 1 zu 10 mit Aqua dest. verdünnten PerFix-nc Buffers 3 (Finale 10x Lösung) in jedes FACS-tube pipettiert. Im Anschluss konnten die FACS-tubes mit dem Durchflusszytometer gemessen werden (Ablaufschema siehe Anhang 7.2).

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua dest	Millipor Reinstwasseranlage, Greifswald, DE
Aspirin i.v. 500mg	Bayer, Leverkusen, DE
NaCl 0,9%	B.Braun, Melsungen, DE
ReoPro/Abciximab	Centocor, Leiden, NL
Losartan	Tocris, Bristol, UK
Telmisartan	Tocris, Bristol, UK
Candesartan	Tocris, Bristol, UK
Valsartan	Tocris, Bristol, UK
Vorapaxar (PAR1-Blocker)	BIOZOL Diagnostika Vertrieb GmbH, Eching, DE
PFA 4%	Morphisto, Frankfurt am Main, DE

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-SYK(phospho Y323) – AF488	abcam, Cambridge, UK
Anti-AKT1/2/3 – AF488	Bioss Antibodies, Woburn, USA
Rabbit IgG, monoclonal – Isotype AF488	abcam, Cambridge, UK

Mouse anti-SRC (pY418) AF488	BD, Franklin Lakes, USA
Mouse IgG1, K Isotyp Ctrl AF488	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD31 antibody AF647	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG1, K Isotyp Antibody AF647	BioLegend, San Diego, USA
PE/Cy5 anti-human CD41 antibody	BioLegend, San Diego, USA
Swine anti-Rabbit FITC	Dako, Agilent, Santa Clara, USA

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE
FACS-tubes	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Magnetrührer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE

<u>Induktoren</u>	<u>Hersteller</u>
ADP	Mölab, Langenfeld, DE
Adrenalin/Epinephrin	MöLab, Langenfeld, DE
Arachidonsäure	MöLab, Langenfeld, DE
Convulxin	Santa Cruz, Dallas, USA
Kollagen Reagenz HORM Susp.	Tekada Austria GmbH, Linz, A
TRAP-6	Bachem, Bubendorf, CHF
U46619	Sigma, St. Louis, USA

<u>Kits</u>	<u>Hersteller</u>
PerFix-nc assay Kit	Beckmann Coulter, Brea, USA

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Cell counter Sysmax-poch-100i	Sysmax Coporation, Kobe, Japan
Durchflusszytometer Cystomics FC500	Beckmann Coulter, Brea; USA
Inkubator (37°)	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Orbital Rüttler CM-9	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.9 Aggregometrie nach Born

Mit der Aggregometrie nach Born wird die Thrombozytenaggregation analysiert. Sie ist eine Standarduntersuchung, um die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten zu testen. Bei Zugabe von verschiedenen Induktoren wird die Lichtdurchlässigkeit von einer Thrombozytenlösung bestimmt. Durch die Induktoren kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten, wodurch Aggregate entstehen. Durch die Aggregatbildung steigt die Lichtdurchlässigkeit (Abb. 7). Der Aggregationsverlauf wird aufgezeichnet und in einer Kurve dargestellt. Unterschiedliche Induktoren zeigen unterschiedliche Kurvenverläufe, da verschiedene Rezeptoren angesprochen werden. Durch die verschiedenen Rezeptoren werden auch verschiedene korrespondierende intrazelluläre Signalkaskaden angesteuert. Mit Hilfe der Aggregometrie nach Born lassen sich so Aussagen zu den unterschiedlichen Thrombozytenfunktionsstörungen treffen (15, 16, 17, 18). Um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten, wurde Citrat-Vollblut für 20 min bei 120xg zentrifugiert und dann auf 300.000/ μ L PLT mit AB-Plasma eingestellt.

Um thombozytenarmes Plasma (PPP) zu erhalten wurde PRP für 7 min und 13000 rpm (BioFuge) zentrifugiert. Das Aggregometer wurde mit 180 μ L PPP + 20 μ L NaCl 0,9% (=100% Transmission) und 180 μ L PRP + 20 μ L NaCl 0,9% (=0% Transmission) vor der Messung kalibriert. Die Messungen wurden mit 1000 rpm bei 37°C in drei Küvetten parallel durchgeführt. 180 μ L PRP wurde min für 360 s inkubiert und nach 30 s mit 20 μ L Convulxin 5 ng/mL, 20 μ L U46619 10 μ g/mL, 20 μ L TRAP-6 20 μ mol/L versetzt und gemessen.

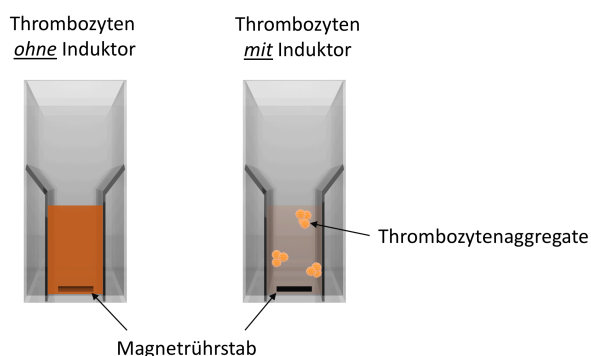


Abbildung 7: Aggregometrie nach Born.

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Küvette mit Mixer	LAbiTec, Ahrensburg, DE

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Aggregometer APACT4	Pass Engineering
Standzentrifuge Rotanta 460RF	Hettich, Tuttlingen, DE
BioFuge fresco	Heraeus, Osterode, DE

2.10 Software und Datenbank

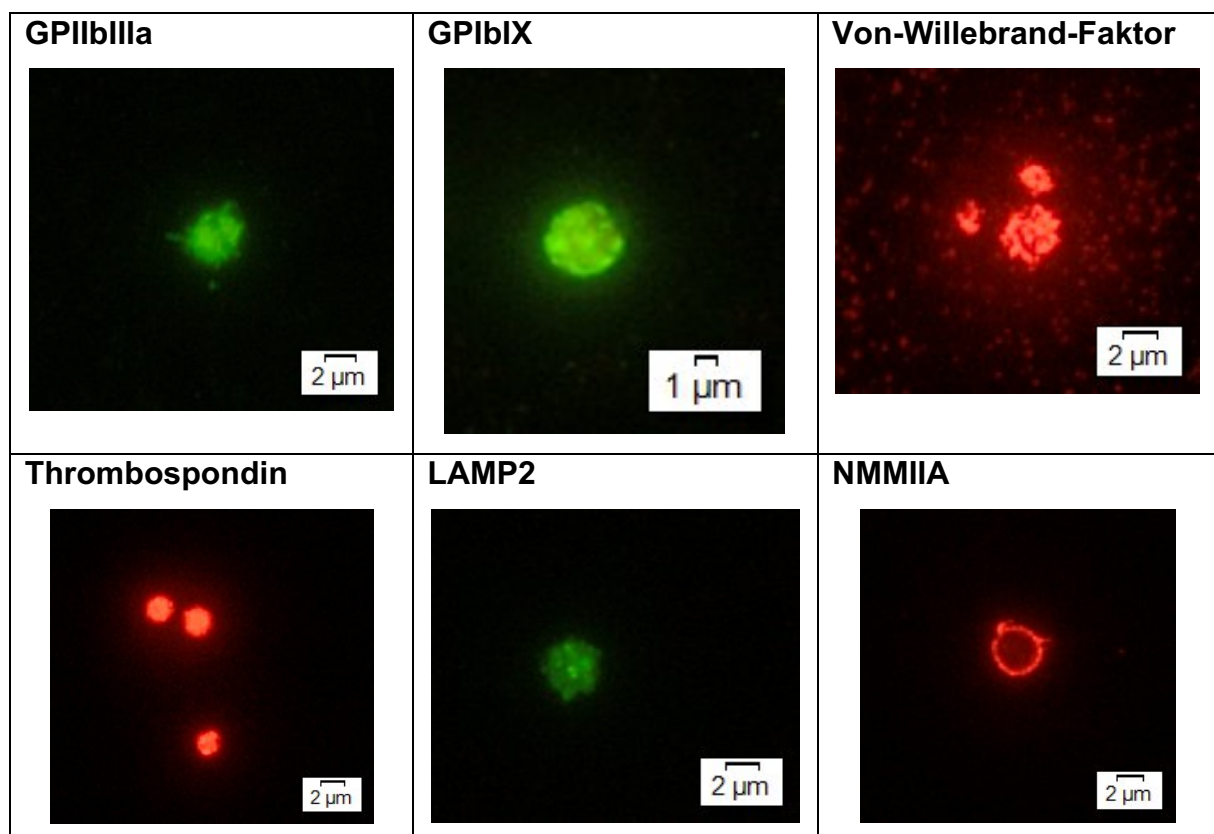
<u>Software und Datenbank</u>	<u>Hersteller</u>
Graphpad Version 5.03	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
Olympus cellSense Standart 1.11	Olympus, Hamburg, DE
Aggregometrie Software	AS-IS-Version 1.21C

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von Thrombozytenproteinen und Strukturen im Blutausstrich

Durch die Fluoreszenzmikroskopie wurden verschiedene Antikörper, einzelne Thrombozytenproteine und Strukturen visualisiert. Dadurch ließen sich morphologische Defekte des Thrombozyten darstellen. Es wurden elf verschiedene Antikörper zur Darstellung von Thrombozytenbestandteilen verwendet (Abb. 8). GPIIb/IIIa stellte sich als gleichmäßige Struktur mit homogener Anfärbung dar. Die Thrombozyten wiesen Pseudopodien auf, die auf eine Aktivierung der Zelle am Objektträger hindeuteten. Der IbIX-Rezeptor zeigte eine diffuse, jedoch ebenfalls gleichmäßige Anfärbung der Thrombozyten. Der von-Willebrand-Faktor lag in der Zelle granulär verteilt vor. Thrombospondin war als homogene, teils feingranuläre Struktur sichtbar. P-Selektin stellte sich überwiegend feingranulär dar. Die Delta-Granula und die Marker der Lysosomen LAMP1, LAMP2, CD63 waren granulär im Thrombozyten verteilt.

Die Zytoskelettstrukturen Filamin A, NMMIIA und β 1-Tubulin lagen als Ringform vor.



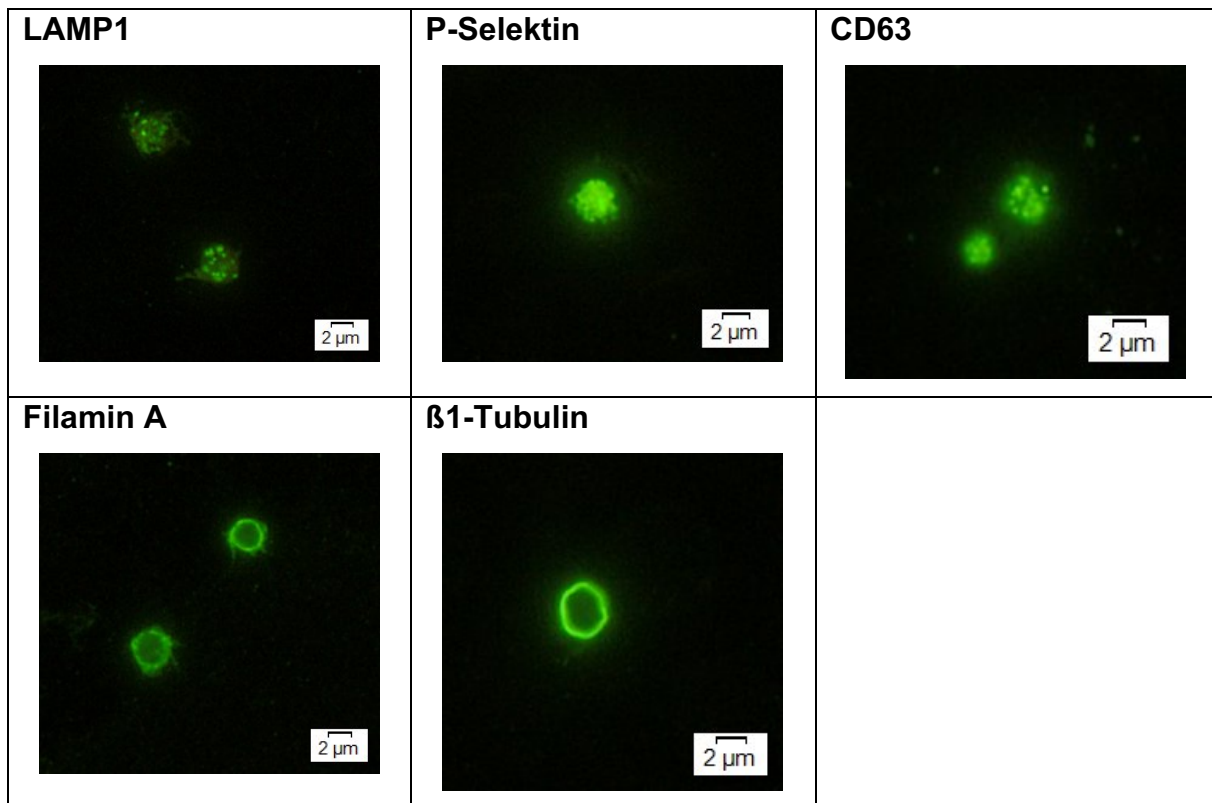


Abbildung 8: Normalstrukturen in der Fluoreszenzmikroskopie.

3.2 Standardisierung der Lagerung von Blutausrichen bei Raumtemperatur

Bei der Untersuchung mithilfe von Antikörpern für verschiedene Bestandteile des Thrombozyten (GPIIb/IIIa, GPIb/IX, alpha Granula Marker und Zytoskelett Strukturen) innerhalb des Lagerungszeitraums von Tag 0 bis Tag 7 sind mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie folgende Ergebnisse generiert worden, die die Forschungsfrage 1 dieser Arbeit beantworten:

Innerhalb des Lagerungszeitraums von Tag 0 bis Tag 7 nahm die Intensität bei allen gefärbten Strukturen ab. Bei einzelnen Strukturen konnte eine schnellere Abnahme, bei anderen eine längere Konstanz der Intensität beobachtet werden. In den folgenden Abbildungen werden die verschiedenen Marker und Strukturen einzeln grafisch dargestellt und erläutert.

Auf der y-Achse ist die Intensität und auf der x-Achse die Tage der Lagerung bis zur Fixation und Färbung aufgetragen. Die unterschiedlichen Farben der Graphen stellen die drei unterschiedlichen verwendeten Antikoagulantien dar (grün = Citrat-antikoaguliertes Blut, blau = EDTA-antikoaguliertes Blut, rot = Hirudin-antikoaguliertes

Blut). Sterne stellen die Einzelwerte dar. Die Mittelwerte sind durch Linien miteinander verbunden und die Standardabweichungen durch senkrechte Linien dargestellt.

GPIIb/IIIa

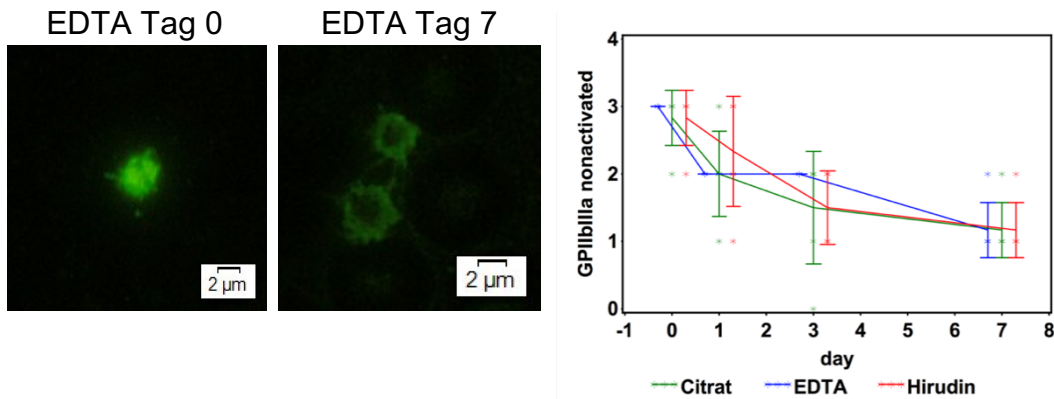


Abbildung 9: Intensität von GPIIb/IIIa

In Abb. 9, zeigt GPIIb/IIIa eine kontinuierliche Abnahme der Intensität. Es besteht kein Unterschied des Intensitätsabfalls in den verschiedenen Antikoagulantien.

IbIX

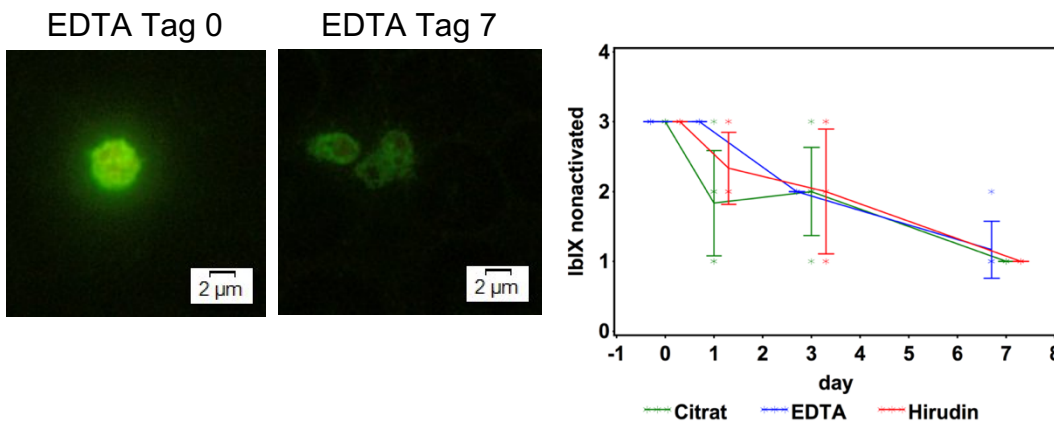


Abbildung 10: Intensität von IbIX

In Abb. 10 zeigt sich eine direkte Abnahme der Färbungsintensität von IbIX von Tag 0 bis Tag 1. Bei Citrat sieht man im Vergleich zu den Antikoagulantien EDTA und Hirudin innerhalb der ersten 24 Stunden eine aus allen Einzelwerten gemittelte stärkere Intensitätsabnahme.

Von-Willebrand-Faktor

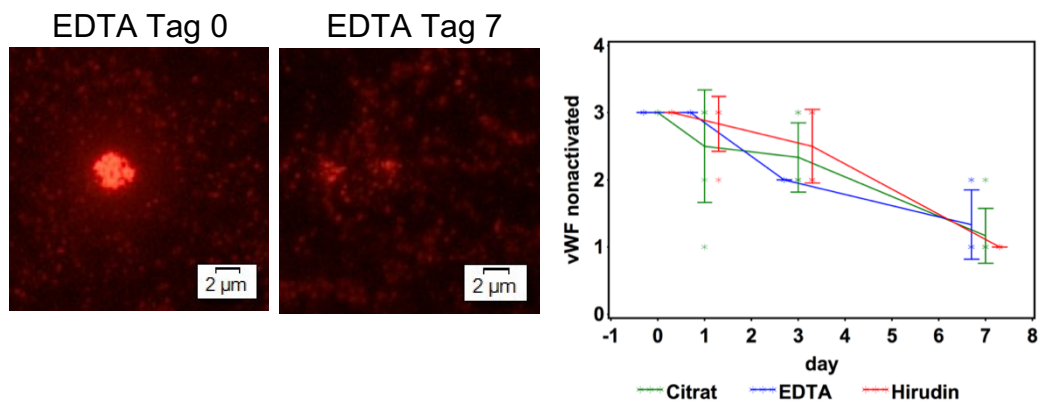


Abbildung 11: Intensität von von-Willebrand-Faktor

In Abb. 11 nimmt die Intensität der indirekten Darstellung des von-Willebrand-Faktor kontinuierlich ab. Es besteht kein Unterschied in den verschiedenen Antikoagulantien.

Thrombospondin

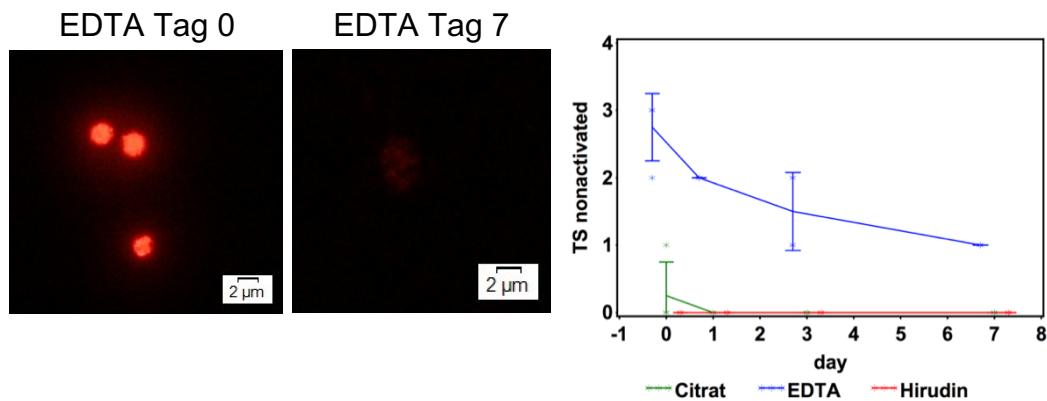


Abbildung 12: Intensität von Thrombospondin

Abb. 12 zeigt, dass Thrombospondin nur im EDTA-antikoagulierten Blut darstellbar ist. Im Fall von EDTA-antikoaguliertem Blut ist ebenfalls eine Intensitätsabnahme innerhalb des Lagerungszeitraums erkennbar. Im Hirudin-antikoagulierten Blut ist Thrombospondin bei 24 Blutaussstrichen von drei verschiedenen gesunden Spendern nicht darstellbar. Bei mit Citrat antikoaguliertem Blut lediglich bei einem einzigen Blutaussstrich an Tag 0.

LAMP 1

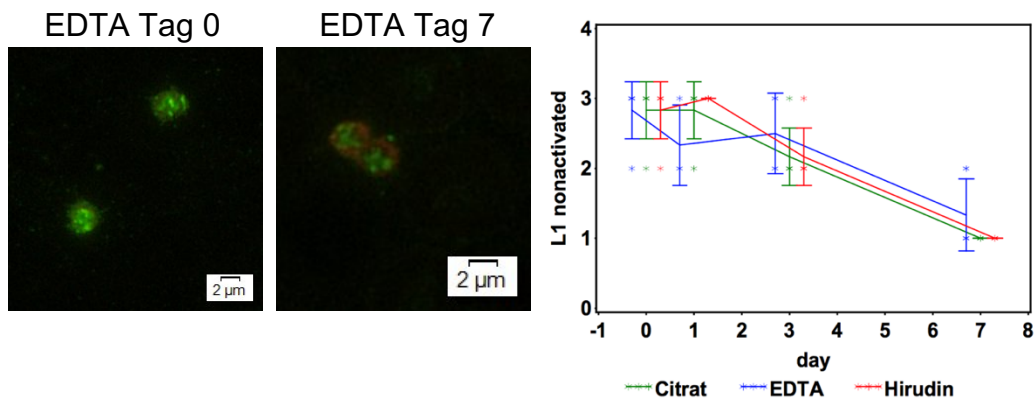


Abbildung 13: Intensität von LAMP1

In Abb. 13 ist erkennbar, dass die Intensität von LAMP1 in allen drei Antikoagulantien über den Lagerungszeitraum abnimmt.

LAMP 2

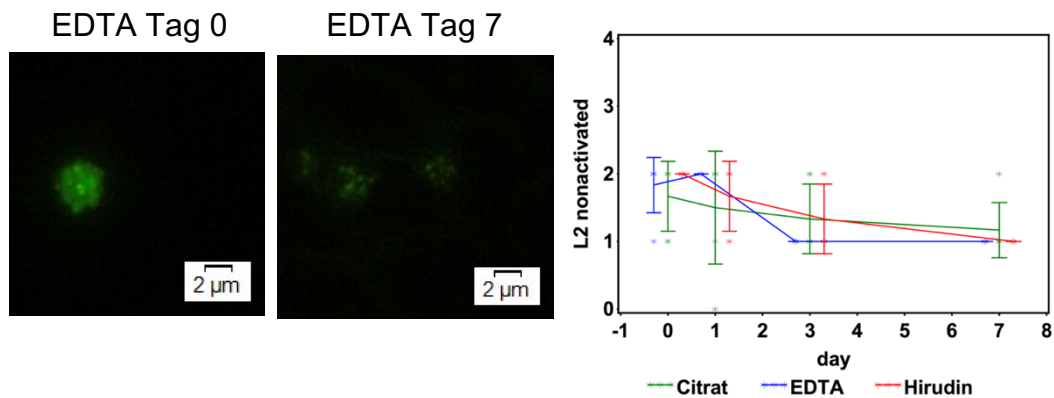


Abbildung 14: Intensität von LAMP2

In Abb. 14 zeigt LAMP 2 bei allen drei Antikoagulantien im Vergleich zu den anderen untersuchten Strukturen eine geringere Ausgangsintensität sowie eine Abnahme der Intensität über den Lagerungszeitraum.

CD63

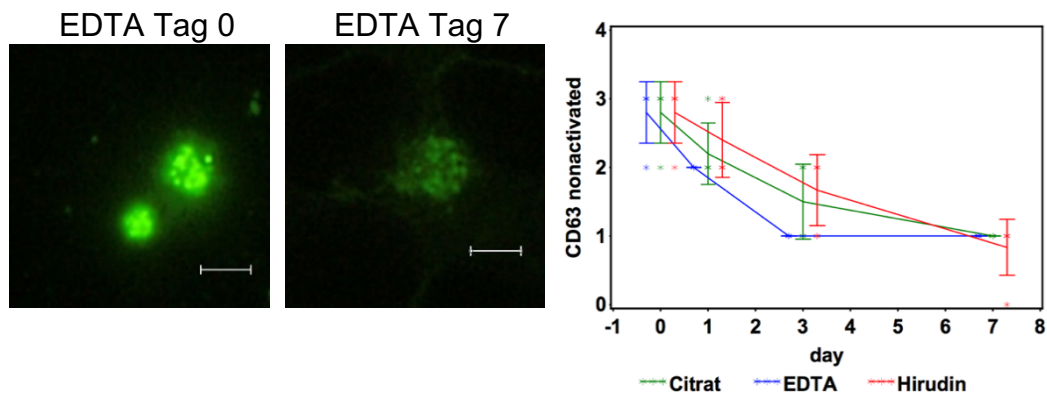


Abbildung 15: Intensität von CD63

In Abb. 15 zeigt CD63 bei allen drei Antikoagulantien eine rasche Abnahme der Intensität von Tag 0 bis Tag 7.

P-Selektin

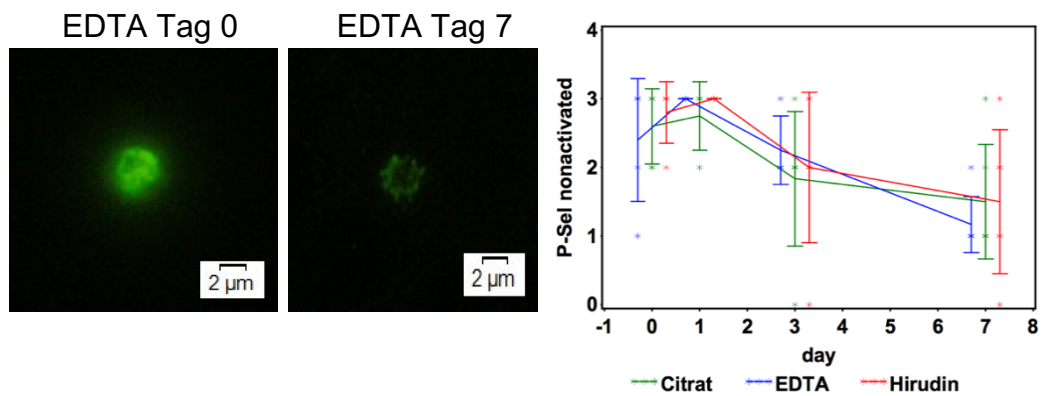


Abbildung 16: Intensität von P-Selektin

In Abb. 16 zeigt P-Selektin zunächst am Tag 1 der Lagerung eine Zunahme der Intensität, fällt dann aber ebenfalls in der weiteren Lagerung ab.

NMMIIa

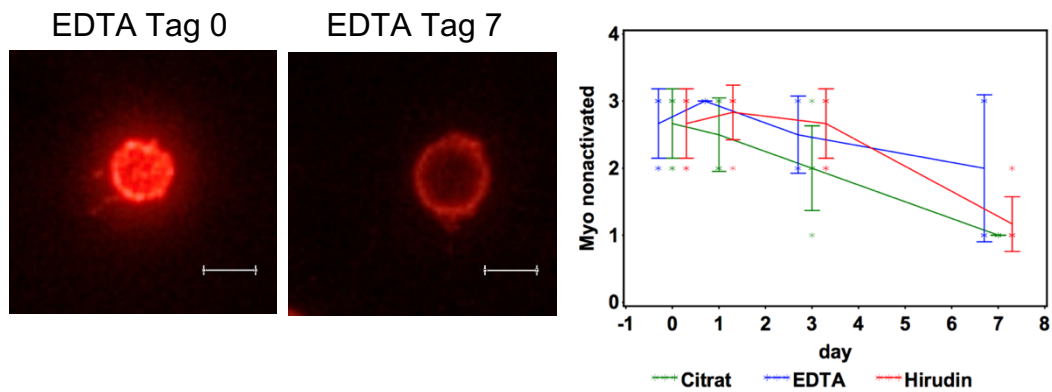


Abbildung 17: Intensität von NMMIIa

In Abb. 17 erkennt man bei NMMIIa eine geringere Intensitätsabnahme von Tag 0 bis Tag 7, die im Vergleich zu anderen Strukturen von Tag 0 bis Tag 3 der Lagerung jedoch fast gleichbleibend stabil ist. EDTA-antikoaguliertes Blut zeigt eine große Varianz der Intensität der einzelnen Werte.

Filamin A

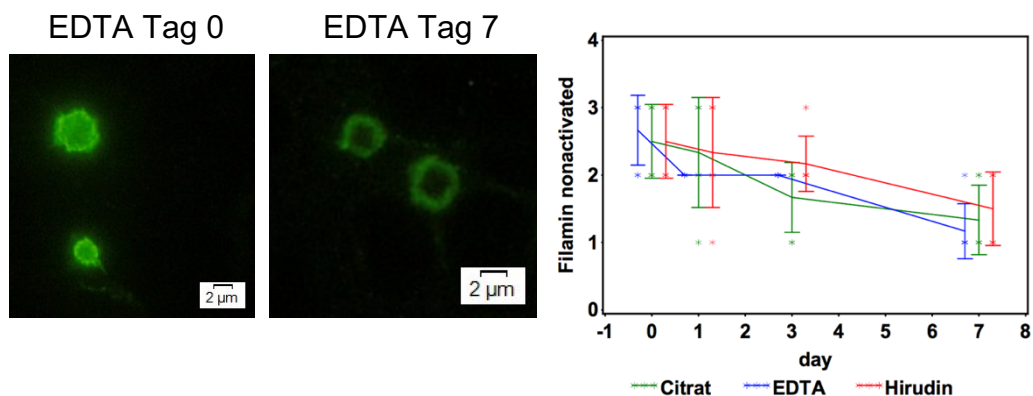


Abbildung 18: Intensität von Filamin A

Bei Filamin A sieht man in Abb. 18 bei allen drei Antikoagulantien eine Intensitätsabnahme.

β 1-Tubulin

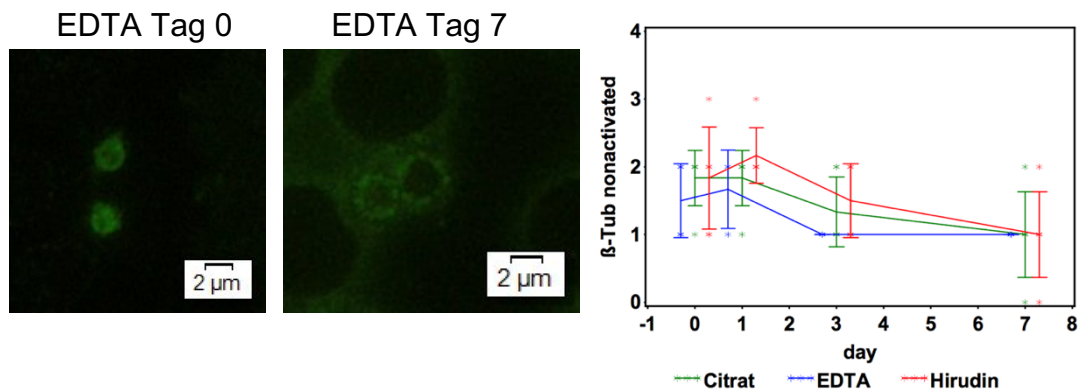


Abbildung 19: Intensität von β 1-Tubulin

In Abb. 19 erkennt man am Lagerungstag 0 eine spenderabhängige unterschiedlich starke Intensität von β 1-Tubulin. Im Vergleich zu Filamin A ist die Ausgangsintensität an Tag 0 bei allen drei Antikoagulantien geringer und nimmt bis Tag 7 weiterhin ab.

Die Gesamtübersicht aller untersuchten Strukturen und ihrer Intensitäten zum Zeitpunkt der verschiedenen Lagerungstage und den verschiedenen Antikoagulantien wurden in einer Heatmap dargestellt (Abb. 20). Die maximal zu erreichende Intensität von 3 ist rot dargestellt, die geringste Intensität 0 in grün. Die gezeigten Intensitätswerte sind als arithmetisches Mittel aus den Einzelwerten der untersuchten Blutausrüche dargestellt. So berechnet sich dieser Mittelwert aus jeweils sechs ($n=3$ und zwei identischen Replikaten) einzelnen Intensitätswerten. In dieser Darstellungsform erkennt man anhand der Farbabstufung von Tag 0 bis Tag 7 der Lagerung die Abnahme der Intensität bei allen untersuchten Strukturen.

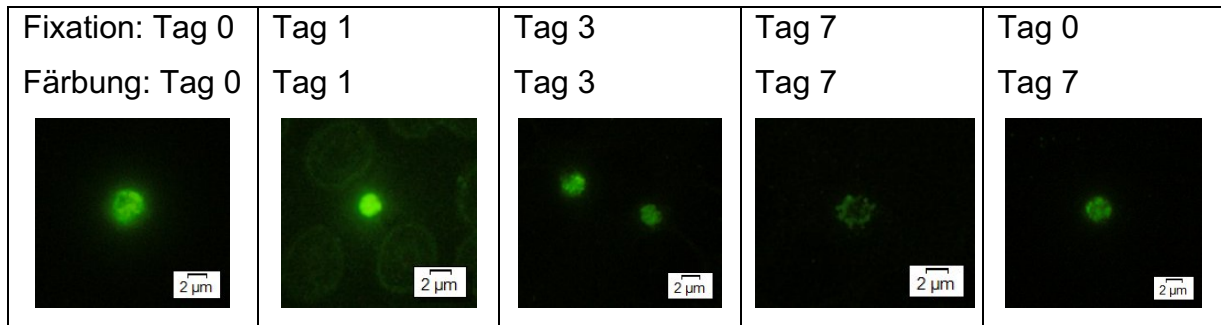
Tag	0			1			3			7		
Antikoagulanz	EDTA	Cit.	Hir.	EDTA	Cit.	Hir.	EDTA	Cit.	Hir.	EDTA	Cit.	Hir.
GPIIb/IIIa	3,0	2,8	2,8	2,0	2,0	2,1	2,0	2,0	1,3	1,4	1,4	1,4
GPIb/IX	3,0	3,0	3,0	3,0	1,8	2,3	2,0	2,0	2,0	1,2	1,0	1,0
vWF	3,0	3,0	3,0	3,0	2,5	2,8	2,0	2,3	2,5	1,2	1,1	1,0
Thrombospondin	2,8	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
LAMP2	1,8	1,6	2,0	2,0	1,5	1,6	1,0	1,3	1,3	1,0	1,1	1,0
LAMP1	2,8	2,8	2,8	2,5	2,8	3,0	2,3	2,1	2,1	1,4	1,0	1,0
NMIIA	2,6	2,6	2,6	3,0	2,5	2,8	2,6	2,1	2,5	2,2	1,0	1,1
P-Selektin	2,4	2,2	2,4	3,0	2,7	3,0	2,3	1,8	1,8	1,2	1,5	1,5
CD63	2,8	2,8	2,8	2,0	2,2	2,4	1,0	1,5	1,6	1,0	1,0	0,8
Filamin A	2,6	2,5	2,5	2,0	2,3	2,3	2,0	1,6	2,1	1,2	1,3	1,5
β1-Tubulin	1,5	1,8	1,8	1,6	1,8	2,1	1,0	1,3	1,5	1,0	1,0	1,0

Abbildung 20: Zeigt eine Heatmap. Dargestellt sind Mittelwerte der Intensität einzelner mit Antikörpern angefarbter Strukturen an den verschiedenen Lagerungstagen mit unterschiedlich antikoaguliertem Blut (EDTA, Cit = Citrat, Hir = Hirudin)

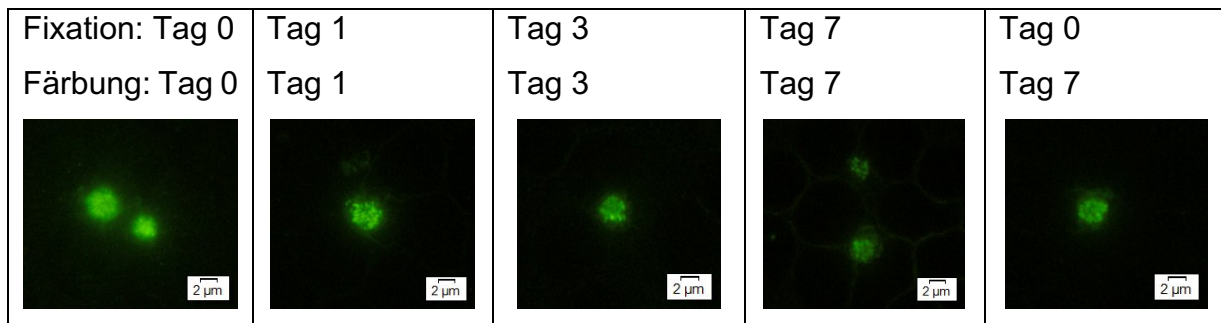
In weiteren Untersuchungen wurden Blutausrüche mit EDTA-, Hirudin- und Citrat antikoaguliertem Blut angefertigt und an Tag 0 fixiert und bis Tag 7 bei Raumtemperatur gelagert. Erst am Lagerungstag 7 wurden die Blutausrüche mit den Antikörpern gefärbt und nach 24 Stunden mit der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Dies wird in den folgenden zwei exemplarischen Beispielen mit P-Selektin und NMIIA anhand von Bildern zur Visualisierung dargestellt. Es zeigte sich, dass die Intensität der Strukturen bei den an Tag 0 ausgestrichenen und fixierten und erst am Tag 7 gefärbten Blutausrüchen stärker war. Man sah, dass die Intensität bei den an Tag 0 fixierten und an Tag 7 gefärbten Blutausrüchen nicht die Intensität, der an Tag 0 oder an Tag 1 fixiert und gefärbten Blutausrüche erreichte, jedoch der Intensität der Blutausrüche, die bis Tag 3 gelagert wurden, ähnlich waren.

P-Selektin

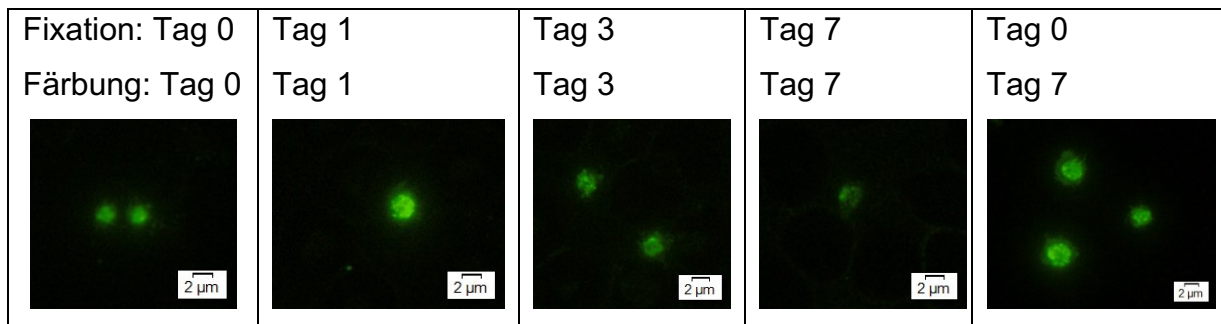
a) ETDA-antikoaguliertes Blut



b) Citrat-antikoaguliertes Blut

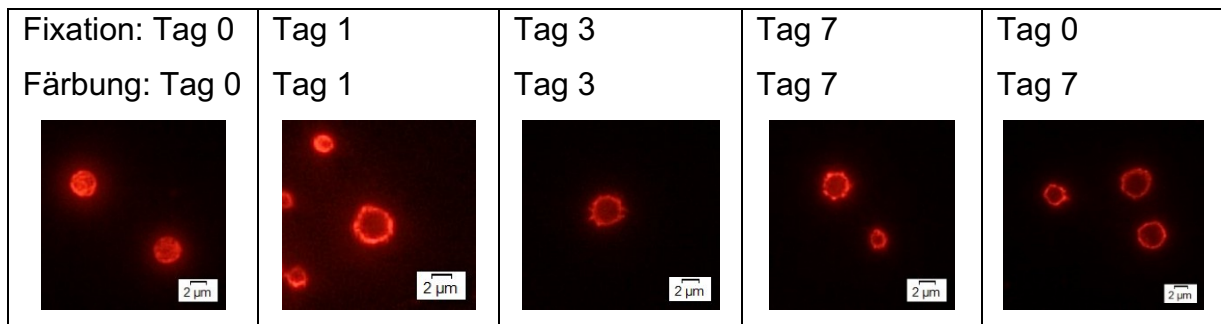


c) Hirudin-antikoaguliertes Blut

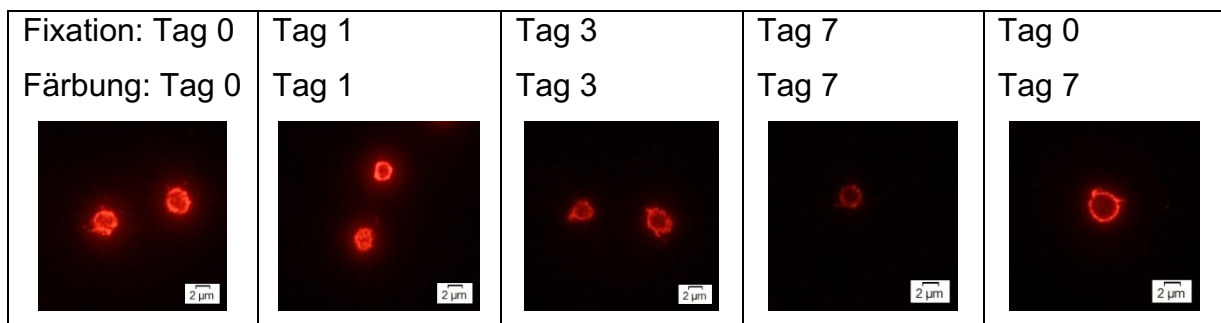


NMMIIA

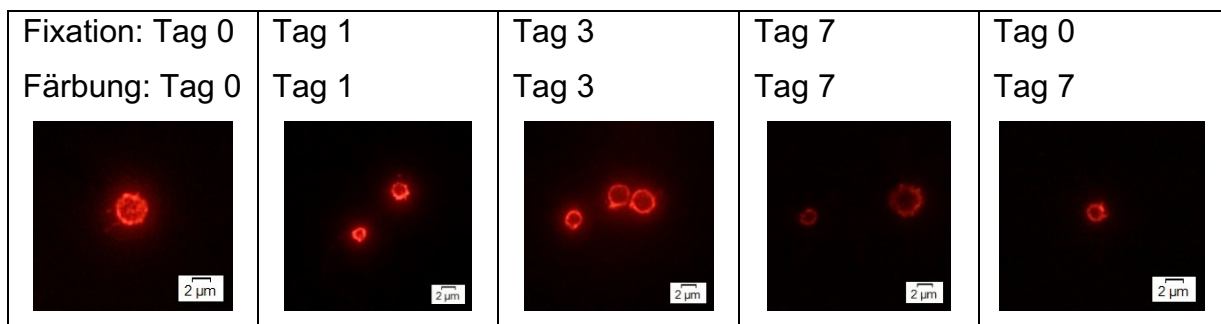
a) ETDA-antikoaguliertes Blut



b) Citrat-antikoaguliertes Blut



c) Hirudin-antikoaguliertes Blut



Dies wird auch noch einmal in Form einer weiteren Heatmap Darstellung deutlich. In dieser Heatmap in Abb. 21 werden erneut die Mittelwerte der Intensitäten der einzelnen mit Antikörpern angefärbten Strukturen Dargestellt. Die maximal zu erreichende Intensität von 3 ist erneut rot dargestellt, die geringste Intensität 0 in grün. Die an Tag 0 fixierten und an Tag 7 gefärbten Mittelwerte berechnen sich aus $n=3$. Dies wird erneut für die drei unterschiedlichen Antikoagulanzen gezeigt. Es werden hier nun die Intensitäten von Blutaussstrichen die an Tag 0 und Tag 7 fixiert und gefärbt wurden mit den Intensitäten von Blutaussstrichen die an Tag 0 fixiert und dann nach fixierter Lagerung erst an Tag 7 gefärbt wurden verglichen. Hier zeigt sich vor allem an dem Lagerungstag 7 bei den Versuchen von GPIIBIIIA, GPIbIX, vWF, LAMP1 und NMMIIA je nach Fixierungszeitpunkt ein deutlicher Unterschied in der Stabilität der Intensität über den Lagerungszeitraum.

Tag der Fixierung und Färbung	Tag 0 fixiert, Tag 0 gefärbt			Tag 7 fixiert, Tag 7 gefärbt			Tag 0 fixiert, Tag 7 gefärbt		
	EDTA	Citrat	Hirudin	EDTA	Citrat	Hirudin	EDTA	Citrat	Hirudin
GPIIBIIIA	3,0	2,8	2,8	1,4	1,4	1,4	2,0	1,6	2,0
GPIbIX	3,0	3,0	3,0	1,2	1,0	1,0	2,3	2,0	2,3
vWF	3,0	3,0	3,0	1,2	1,1	1,0	2,3	2,0	2,3
Thrombospondin	2,8	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0
LAMP2	1,8	1,6	2,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,3	1,3
LAMP1	2,8	2,8	2,8	1,4	1,0	1,0	2,3	2,0	2,3
NMMIIA	2,6	2,6	2,6	2,2	1,0	1,1	2,0	2,0	2,0
P-Selectin	2,4	2,2	2,4	1,2	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6
CD63	2,8	2,8	2,8	1,0	1,0	0,8	1,3	1,3	1,3
Filamin A	2,6	2,5	2,5	1,2	1,3	1,5	1,6	1,3	1,6
β1-Tubolin	1,5	1,8	1,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,3

Abbildung 21: Zeigt eine Heatmap. Dargestellt sind Mittelwerte der Intensität einzelner mit Antikörpern angefärbter Strukturen an den Lagerungstagen 0 und 7 je nach Fixierungstag mit unterschiedlich antikoagulierte Blut.

:

Im Folgenden werden weitere Beobachtungen der Untersuchung beschrieben, die zusätzlich zur Beantwortung der Forschungsfrage 1 beitragen:

Bei verschiedenen dargestellten Strukturen waren an unterschiedlichen Lagerungstagen unterschiedliche Strukturverteilungen und Ausprägungen darstellbar. So zeigte Filamin A Auffälligkeiten während des Lagerungszeitraums. Innerhalb der untersuchten Spender gab es bei diesem Ergebnis keinen Unterschied. Nach Fixierung und Färbung an Tag 0 war die Filamin A Struktur bei allen drei verwendeten Antikoagulantien (EDTA, Citrat, Hirudin) diffus im gesamten Thrombozyten verteilt (6 von 6 beurteilten Blutausstrichen je Antikoagulans).

Nach Lagerung bei Raumtemperatur, Fixierung sowie Färbung an Tag 1, lag Filamin A bei allen beurteilten Blutausstrichen als Ringstruktur im Thrombozyten vor (5/5 bei EDTA, 6/6 bei Citrat und 6/6 bei Hirudin).

An den folgenden Tagen der Lagerung behielt Filamin A die Ringstruktur bei. Zu beobachten war, dass es zum Lagerungszeitpunkt Tag 7 erneut zu einer Veränderung in der darzustellenden Struktur des Filamin A kam. Bei EDTA-antikoagulierte Blut war bei 3/5 Blutausstrichen weiterhin eine Ringstruktur erkennbar und bei den anderen beiden Ausstrichen erneut eine diffuse Verteilung.

Bei Citrat-antikoagulierte Blut war bei 1/6 Blutausstrichen eine unterbrochene Ringstruktur darstellbar, während die anderen fünf Blutausstriche weiterhin eine Ringstruktur zeigten (siehe Abb. 22-24).

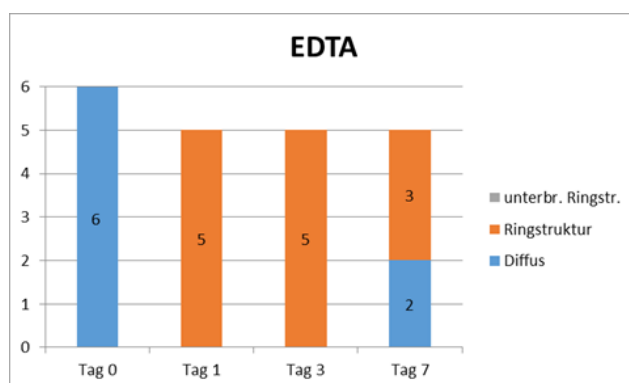


Abbildung 22: Strukturverteilung von Filamin A bei EDTA-antikoagulierte Blut. X-Achse= Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutausstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

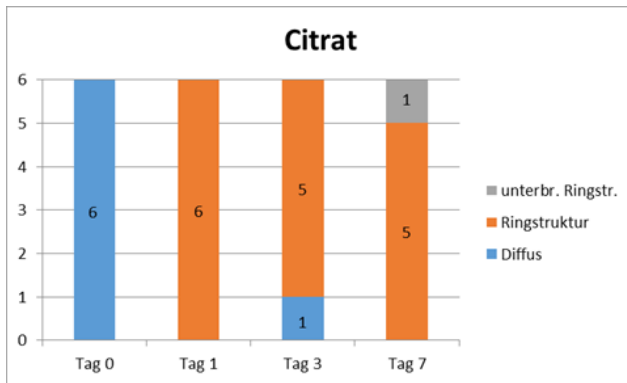


Abbildung 23: Strukturverteilung von Filamin A bei Citrat-antikoagulierte Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

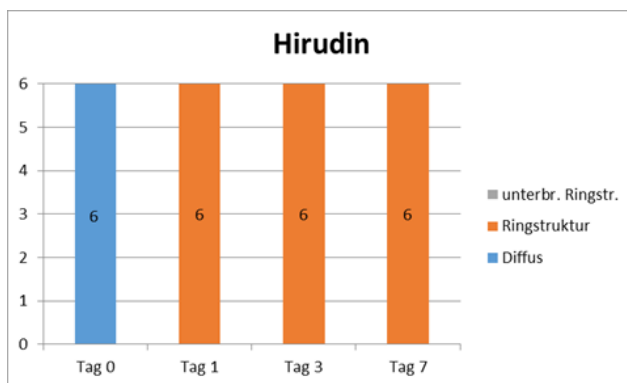


Abbildung 24: Strukturverteilung von Filamin A bei Hirudin-antikoagulierte Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

Ein ähnliches Bild fand sich auch bei NMMIIA. Hier fiel auf, dass bei EDTA- und Hirudin-antikoagulierte Blut jeweils 5/6 Blutaussstriche bereits an Tag 0 eine Ringstruktur und lediglich jeweils ein Blutaussstrich eine diffuse Verteilung von NMMIIA zeigten. An den weiteren Tagen der Lagerung, zeigte sich bis auf einen Ausstrich bei EDTA Blut an Tag 1, bei allen anderen Ausstrichen mit EDTA- und Hirudin-antikoagulierte Blut eine Ringstruktur.

Im Citrat-antikoagulierte Blut hingegen zeigte sich bei 3/6 Blutaussstrichen an Tag 0 eine diffuse Struktur, bei den weiteren drei Ausstrichen trat eine Ringstruktur auf. Im Verlauf der Lagerung ab Tag 1 lag NMMIIA häufiger in Ringstruktur vor (siehe Abb. 25-27).

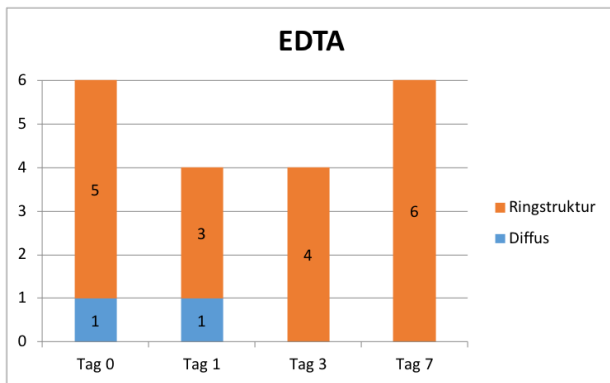


Abbildung 25: Strukturverteilung von NMMIIA bei EDTA-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

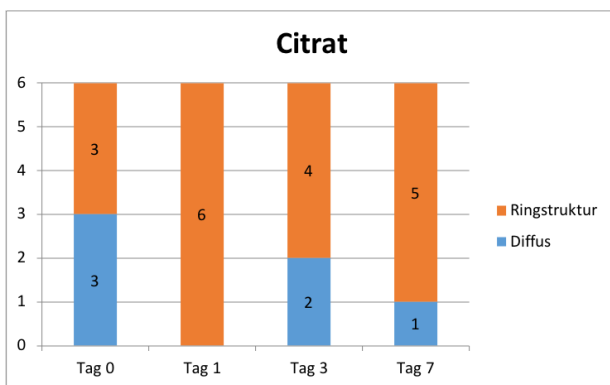


Abbildung 26: Strukturverteilung von NMMIIa bei Citrat-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

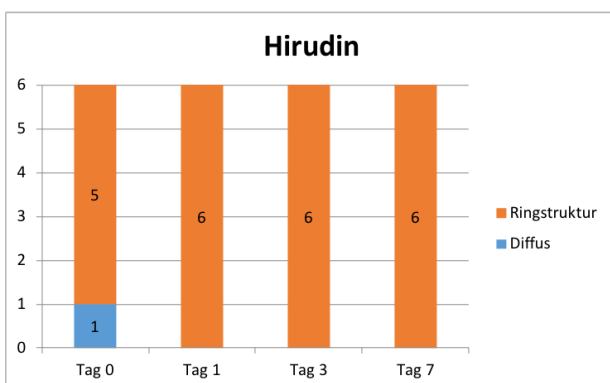


Abbildung 27: Strukturverteilung von NMMIIa bei Hirudin-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

Ebenso zeigte β 1-Tubulin eine Veränderung der Strukturverteilung im Verlauf des Lagerungszeitraums. Im Vergleich zu Filamin A und NMMIIa fand sich eine größere Varianz in der Strukturverteilung. Auffällig war, dass unabhängig von der Antikoagulation am Tag 1 β 1-Tubulin bei allen Blutaussstrichen in Ringstruktur vorlag. Am Tag 3 lag β 1-Tubulin ebenfalls überwiegend als Ringstruktur vor, abgesehen von einem Blutaussstrich, auf dem es in unterbrochener Ringstruktur vorlag (siehe Abb. 28-30).

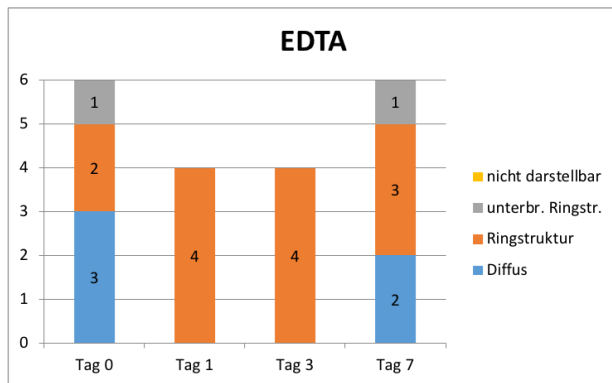


Abbildung 28: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei EDTA-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

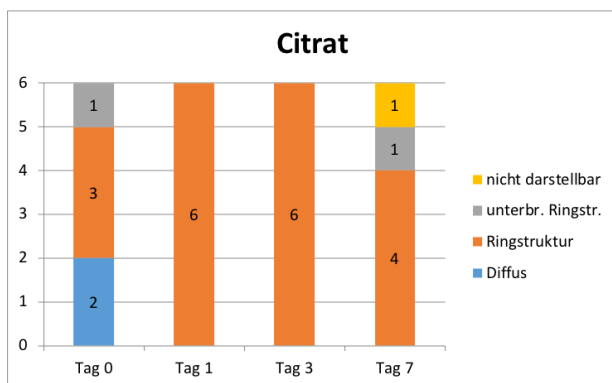


Abbildung 29: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei Citrat-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

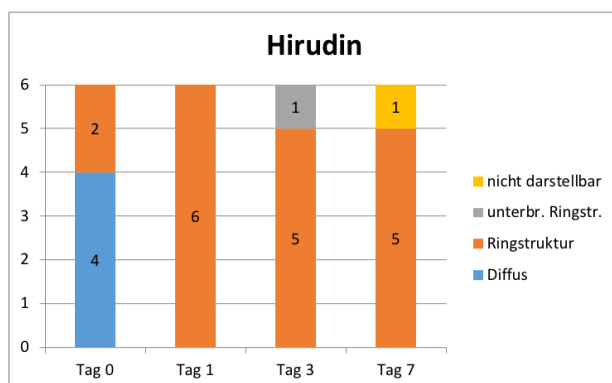


Abbildung 30: Strukturverteilung von β 1-Tubulin bei Hirudin-antikoaguliertem Blut. X-Achse = Lagerungszeitraum (Tage). Y-Achse = Gesamtanzahl der Blutaussstriche (0 bis 6). Lagerungszeitraum.

Im Gegensatz zu diesen drei Strukturen der Thrombozyten lagen die anderen untersuchten Blutaussstriche in der uns bekannten Normalstruktur vor. Die Normalstrukturen der einzelnen nachgewiesenen Thrombozytenproteine und Strukturen sind in Abschnitt 3.1 genauer erläutert.

3.3 Visualisierung der Signalkaskade mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen (anti-p-SRC-Ak, anti-p-SYK-Ak, anti-p-AKT1/2/3-Ak)

Zur Beantwortung der Forschungsfrage 2 werden in den folgenden Abschnitten die in dieser Arbeit genierten Ergebnisse dargestellt.

3.3.1 Visualisierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse der Visualisierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie dar. Eine Visualisierung der Phosphorylierung auf Blutausstrichen erschien mit einem direkt konjugiertem SRC (pY⁴¹⁸) im Vorversuch als möglich, erwies sich jedoch im wiederholten Versuchen sowohl für SRC (pY⁴¹⁹)-Kinase als auch die Kinasen SYK und AKT als ungeeignet (Abb. 31-33). Mit Ausnahme der Phosphorylierung der SYK-Kinase durch Epinephrin, Convulxin und TRAP-6 (Abb. 32), ließ sich eine Zunahme in der Fluoreszenzintensitätsverteilung der Thrombozyten oder Morphologieänderung unter Verwendung diverser Induktoren (10 µM ADP, 10 µM Epinephrin, 1,5 mM Arachidonsäure, 5 ng/mL Convulxin, 5 µg/mL Kollagen, 20 mM TRAP-6 oder 10 µg/mL U46619) im Vergleich zum Kontrollansatz nicht wiederholt beobachten. Als Induktoren wurden dabei 10 µM ADP, 10 µM Epinephrin, 1,5 mM Arachidonsäure, 5 ng/mL Convulxin, 5 µg/mL Kollagen, 20 mM TRAP-6 und 10 µg/mL U46619 verwendet. Um die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der Kinasen in Abhängigkeit von Agonisten und Antagonisten zu analysieren, wurde aufgrund dieser Darstellungsprobleme mit der Fluoreszenzmikroskopie, die durchflusszytometrische Durchführung verfolgt.

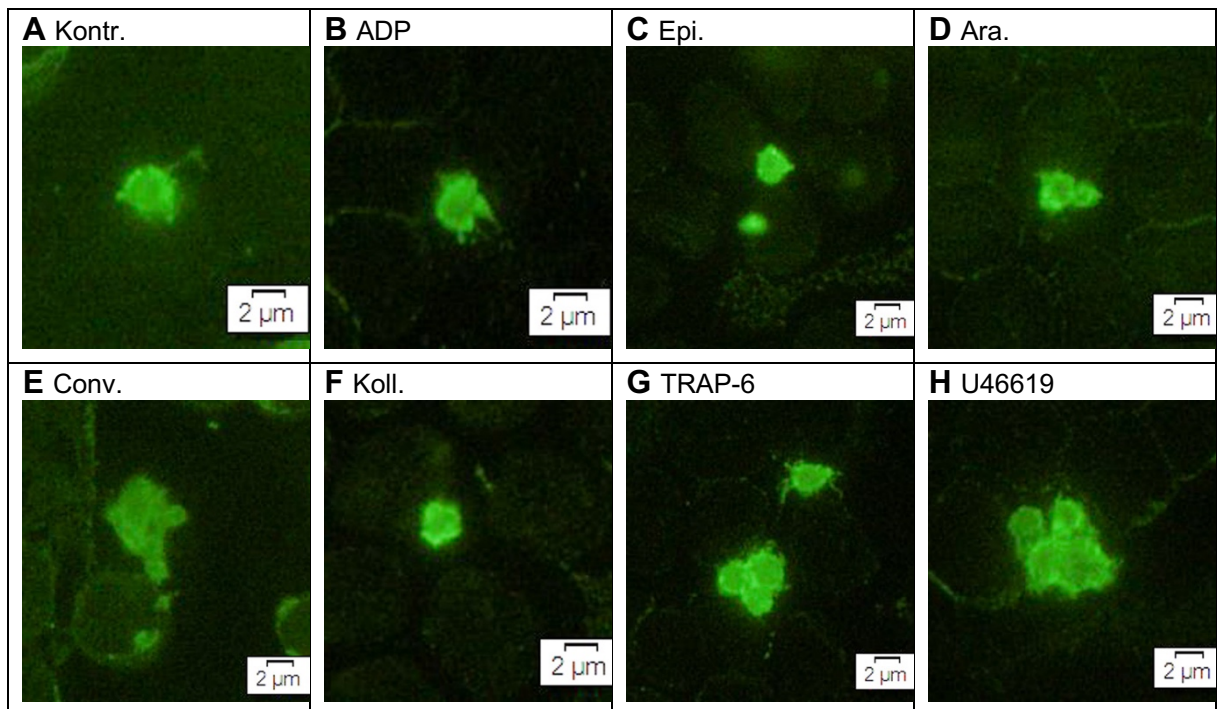


Abbildung 31: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von Kinase SRC mit und ohne Aktivierung von Thrombozyten in Vollblut mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. **A:** Kontrolle ohne Induktor, **B:** ADP, **C:** Epinephrin, **D:** Arachidonsäure, **E:** Convulxin, **F:** Kollagen, **G:** TRAP-6, **H:** U46619

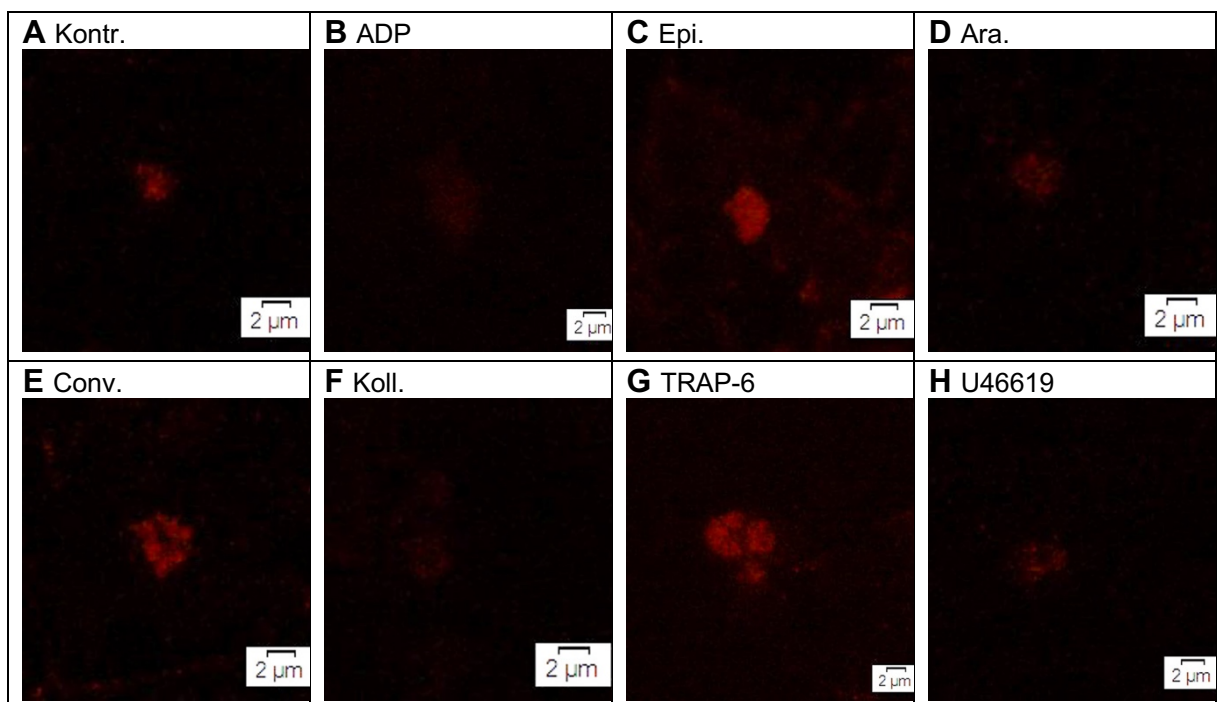


Abbildung 32: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von Kinase SYK mit und ohne Aktivierung von Thrombozyten in Vollblut mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. **A:** Kontrolle ohne Induktor, **B:** ADP, **C:** Epinephrin, **D:** Arachidonsäure, **E:** Convulxin, **F:** Kollagen, **G:** TRAP-6, **H:** U46619

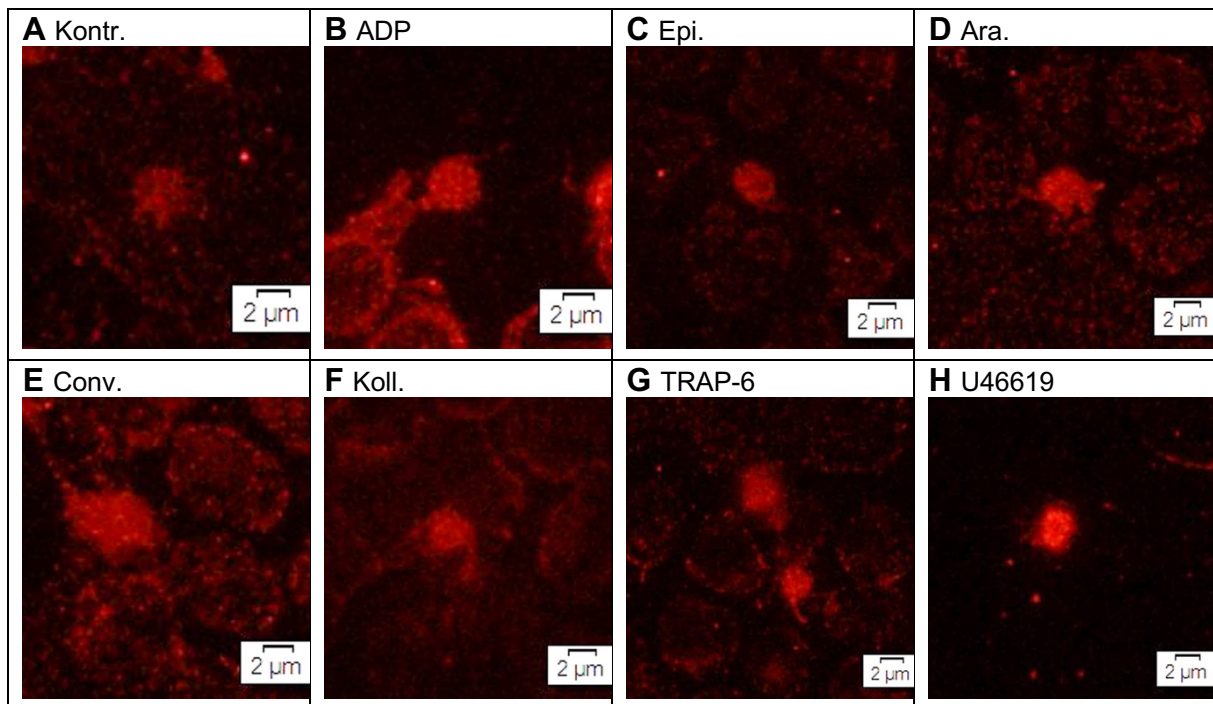


Abbildung 33: Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von Kinase AKT mit und ohne Aktivierung von Thrombozyten in Vollblut mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. **A:** Kontrolle ohne Induktor, **B:** ADP, **C:** Epinephrin, **D:** Arachidonsäure, **E:** Convulxin, **F:** Kollagen, **G:** TRAP-6, **H:** U46619

3.3.2 Visualisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Visualisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie dargestellt.

3.3.2.1 Zeitreihen mit Antikörpern gegen phosphorylierte Kinasen

Zu Beginn der folgenden Experimente wurde in Zeitreihen (30 s bis 10 min) der optimale Inkubationszeitraum des Vollbluts für die Phosphorylierung der drei Kinasen bei der Verwendung von Arachidonsäure (p-SRC und p-SYK) bzw. TRAP-6 (p-AKT) bestimmt (Abb. 34). Der Inkubationszeitraum von 3 min zeigte eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung, bevor ein Plateau erreicht wurde (Abb. 34 A und B). Bei der Zeitreihe des anti-p-AKT1/2/3-Ak konnte kein optimaler Zeitpunkt gefunden werden (Abb. 34 C). Aufgrund der Erfahrungen mit den anti-p-SRC-Ak und anti-p-SYK-Ak, wurde auch hier die Inkubationszeit von 3 min gewählt.

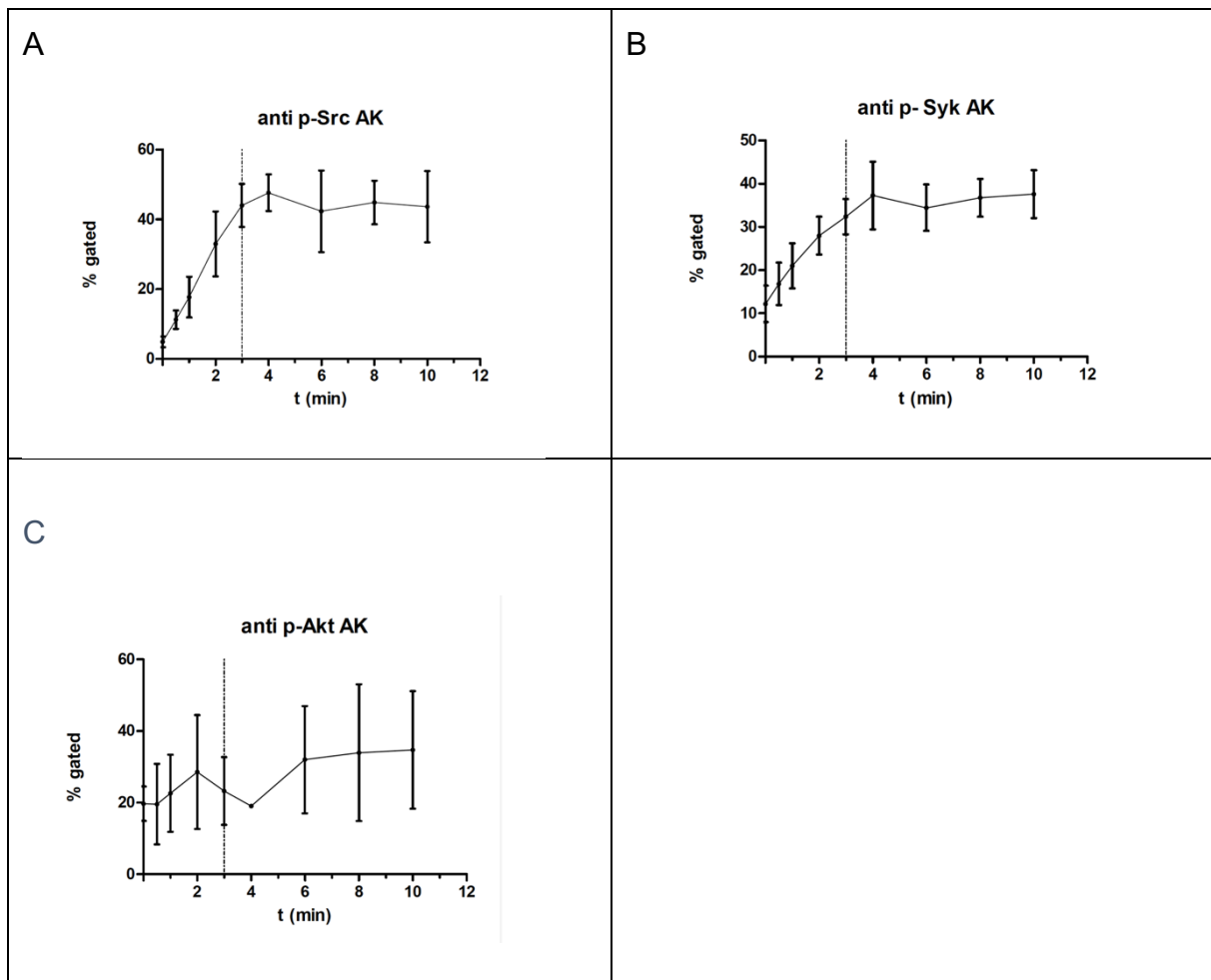


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse (n=4) der Phosphorylierungs-Zeitreihe nach Aktivierung von Thrombozyten im Vollblut durch 1,5 mM Arachidonsäure (A und B) bzw. 20 mM TRAP-6 (C) über 10 min mit A: anti-p-SRC-AK, B: anti-p-SYK-AK und C: anti-p-AKT1/2/3-AK. Die Thrombozytenpopulation wurde mittels CD31-AF647 gegated und gegenüber der Negativkontrolle (0,9% NaCl) in %-positiven Ereignissen dargestellt. Eine Inkubationsdauer von 3 min (Markierung) wurde für weitere Analysen gewählt.

3.3.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen von anti-p-SRC-Ak, anti-p-SYK-Ak und anti-p-AKT1/2/3-Ak mit verschiedenen Induktoren

Nachdem die Voruntersuchungen und weiteren Experimente einerseits gezeigt hatten, dass phosphorylierte Kinasen in der Durchflusszytometrie darstellbar sind und andererseits deren Optimum der Inkubationszeit ermittelt werden konnte, folgten weitere Experimente mit unterschiedlichen Induktoren. Sie dienten der Bestimmung der potentesten Agonisten für eine maximal darstellbare Phosphorylierung. Die stärksten SRC-Phosphorylierungen nach 3 min zeigten sich durch die Induktoren TRAP-6 (87%), U46619 (78%), Kollagen (74%) und ADP (59%) (Abb. 35). Bei SRC kam es bei der Negativkontrolle mit 0,9 % NaCl zur höchsten Hintergrund-Phosphorylierung, die ca. 14% entsprach (Abb. 35).

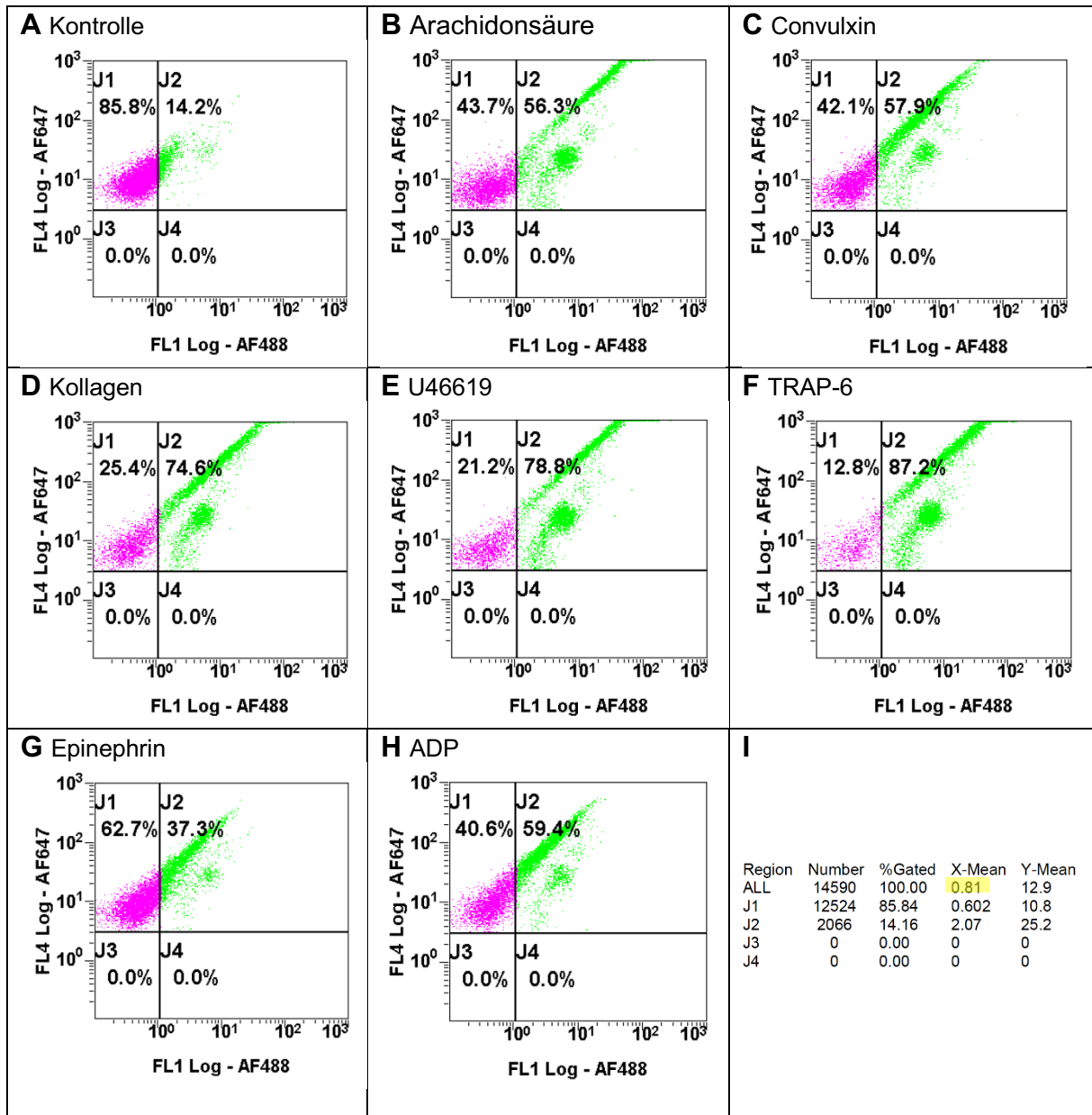


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von SRC (FL1 – AF488) nach Aktivierung von Thrombozyten im Vollblut mit **A**: 0,9% NaCl (Negativkontrolle), **B**: 1,5 mM Arachidonsäure, **C**: 5 ng/mL Convulxin, **D**: 5 µg/mL Kollagen, **E**: 10 µg/mL U46619, **F**: 20 µmM TRAP-6, **G**: 10 µmM Epinephrin, **H**: 5 µmM ADP. Die Auswertung bezieht sich auf CD31-AF647 positiv gategete Thrombozyten. **I**: Exemplarisch alle Einzelwerte der Kontrolle **A**.

Vergleichbar dazu wurden die stärksten SYK-Phosphorylierungen durch die Induktoren U46619 (86%), TRAP-6 (81%), Convulxin (69%) und ADP (65%) erreicht (Abb. 36).

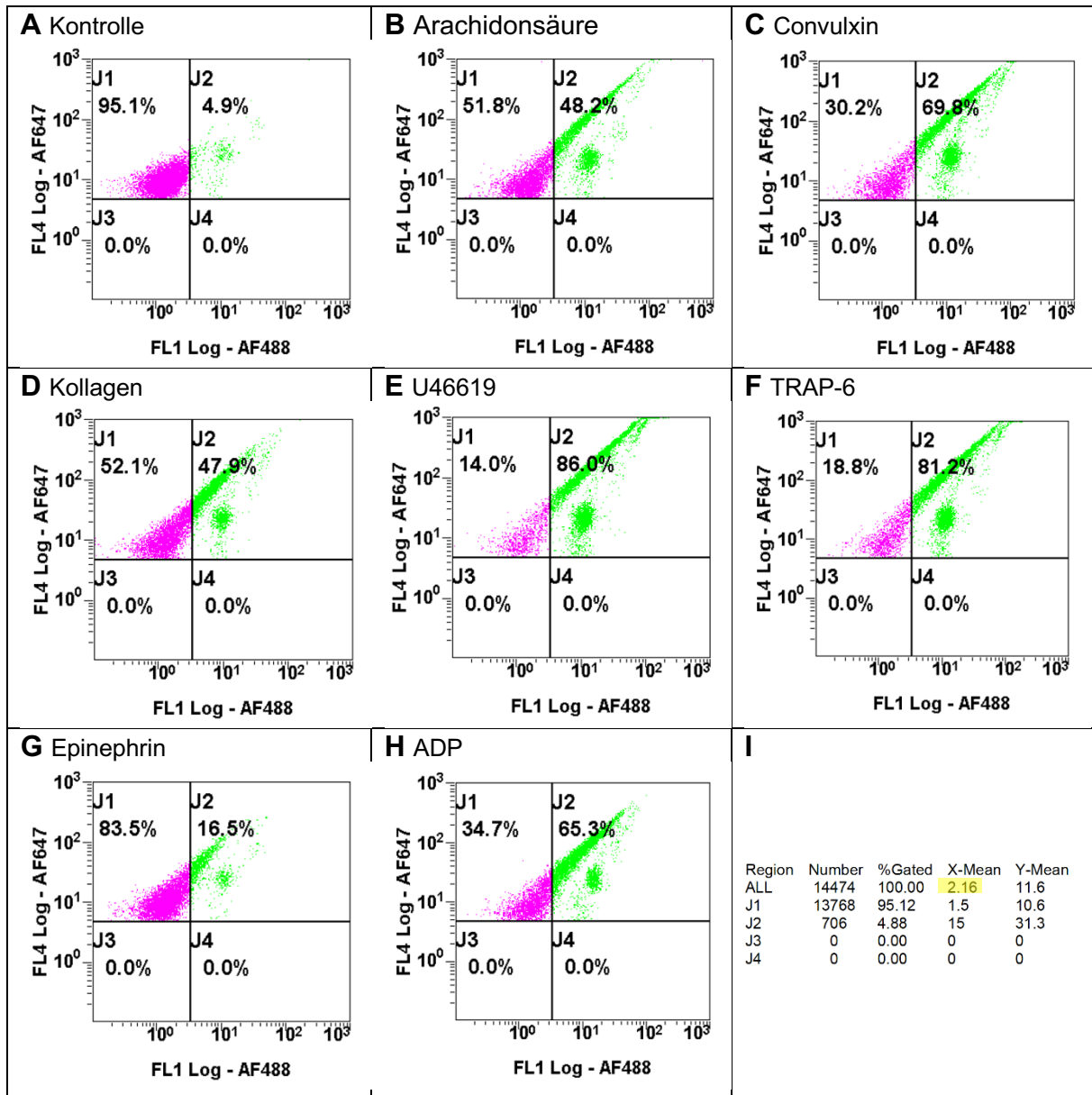


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von SYK (FL1 – AF488) nach Aktivierung von Thrombozyten im Vollblut mit **A**: 0,9% NaCl (Negativkontrolle), **B**: 1,5 mM Arachidonsäure, **C**: 5 ng/mL Convulxin, **D**: 5 µg/mL Kollagen, **E**: 10 µg/mL U46619, **F**: 20 µM TRAP-6, **G**: 10 µM Epinephrin, **H**: 5 µM ADP. Die Auswertung bezieht sich auf CD31-AF647 positiv getagete Thrombozyten. **I**: Exemplarisch alle Einzelwerte der Kontrolle **A**.

Bei AKT1/2/3 (Abb. 37) kam es zur niedrigsten nachweisbaren Phosphorylierung. Die Induktoren TRAP-6 (69%), U46619 (45%) und Arachidonsäure (43%) zeigten dabei den höchsten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle (ca. 10%).

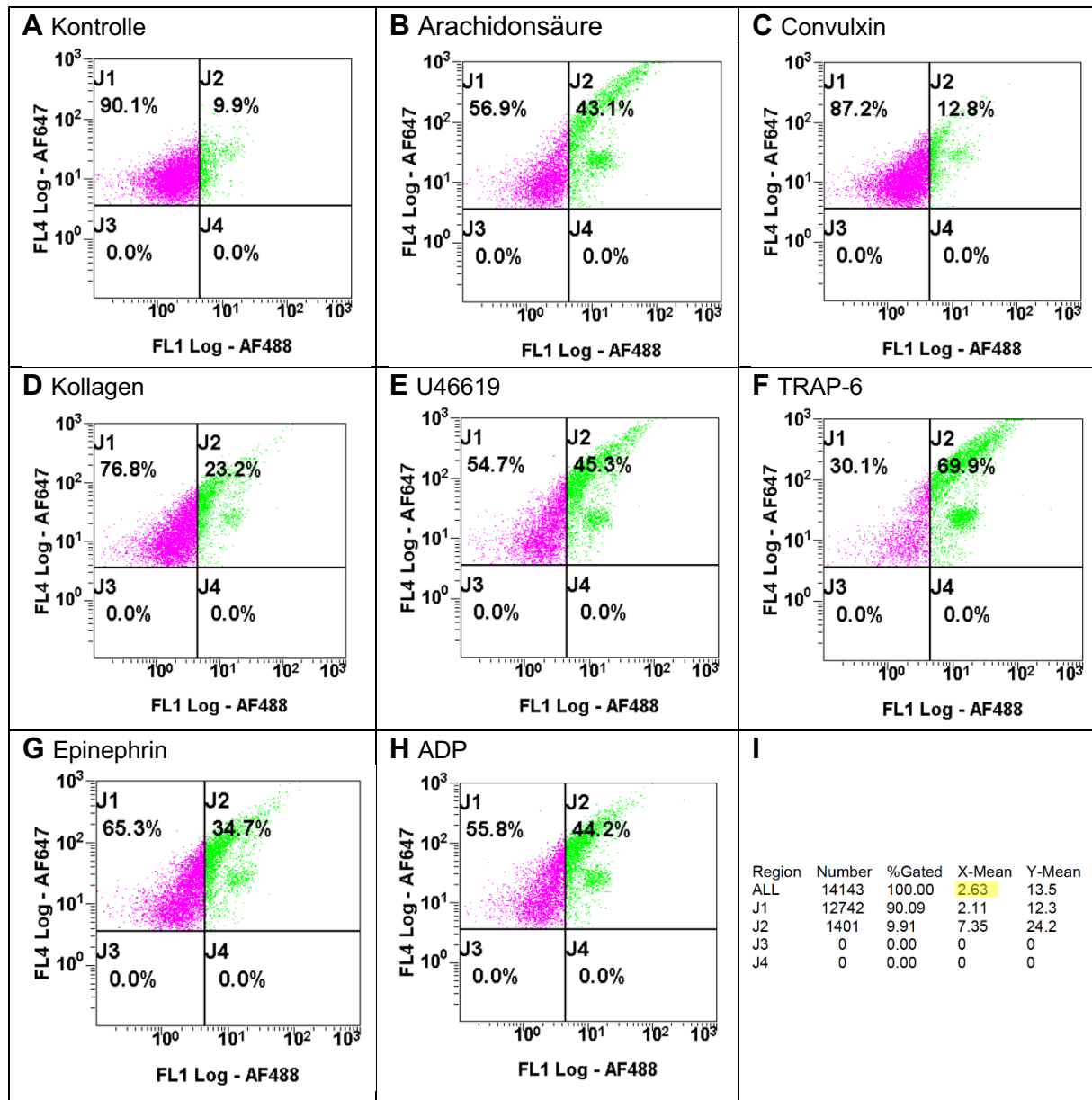


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von AKT1/2/3 (FL1 – AF488) nach Aktivierung von Thrombozyten im Vollblut mit **A**: 0,9% NaCl (Negativkontrolle), **B**: 1,5 mM Arachidonsäure, **C**: 5 ng/mL Convulxin, **D**: 5 µg/mL Kollagen, **E**: 10 µg/mL U46619, **F**: 20 µM TRAP-6, **G**: 10 µM Epinephrin, **H**: 5 µM ADP. Die Auswertung bezieht sich auf CD31-AF647 positiv gatede Thrombozyten. **I**: Exemplarisch alle Einzelwerte der Kontrolle **A**.

3.4 Spezifische Rezeptorinhibition von wichtigen an der Signalkaskade des Thrombozyten beteiligten Rezeptoren

Für eine *in vitro*-Validierung der Analyse von Thrombozytensignalwegdefekten wurde im Folgenden der Einfluss von Antagonisten im Vollblut bei gleichzeitiger Aktivierung durch verschiedene Agonisten untersucht. Verwendet wurde einerseits die Medikamentenfamilie der Sartane (Losartan, Telmisartan, Candesartan, Valsartan), um den GPVI-Rezeptor zu inhibieren. Außerdem wurde der PAR1-Rezeptorblocker Vorapaxar verwendet. Parallel wurde die Aggregometrie nach Born durchgeführt.

3.4.1 Durchflusszytometrie mit Sartanen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie unter Verwendung der GPVI-Rezeptorblocker dargestellt. Dazu wurde das Vollblut mit je 300 µM Losartan bzw. Telmisartan, Candesartan oder Valsartan für 1 min vorinkubiert. Die durchflusszytometrisch erfassten prozentualen Anteile phosphorylierter Plättchen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Durchflusszytometrische Analyse der Inhibition der Phosphorylierung spezifischer Kinasen im Vollblut durch die GPVI-Inhibitoren Losartan, Telmisartan, Candesartan und Valsartan. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der Plättchen in % mit nachgewiesener Phosphorylierung. Vorinkubation (1 min) des Vollbluts mit je 300 µM Antagonist; Kontr: Kontrolle mit 0,9% NaCl, Ara: 1,5 mM Arachidonsäure, Conv: 5 ng/mL Convulxin, Koll: 5 µg/mL Kollagen, U46619: 10 µg/mL U46619, TRAP-6: 20 µM TRAP-6, Epi: 10 µM Epinephrin, ADP: 5 µM ADP.

Kinase	Antagonist	Kontr.	Ara.	Conv.	Koll.	U46619	TRAP	Epi	ADP
p-Src	ohne	15,5	50,1	37,9	60,1	54,0	80,3	30,1	52,9
	Losartan	13,5	38,7	67,8	27,1	11,9	66,0	41,6	56,0
	Telmisartan	9,2		12,6	6,2	17,4			
	Candesartan	8,9		7,6	6,9	9,4			
	Valsartan	7,7		8,2	7,4	12,6			
p-Syk	ohne	12,7	50,5	45,2	41,2	72,8	70,5	31,1	56,3
	Losartan	11,5	39,6	49,8	22,0	15,9	64,7	39,3	46,9
p-Akt1/2/3	ohne	6,7	34,1	10,0	22,9	42,8	53,0	27,9	39,4
	Losartan	7,0	25,0	28,8	22,8	6,2	41,3	29,4	34,1

Eine deutliche Inhibition der Phosphorylierung zeigte sich bei allen getesteten Kinasen bei der Aktivierung mittels U46619 unter Verwendung von Losartan, Telmisartan, Candesartan und Valsartan. Mit Kollagen war dies bei p-SRC und p-SYK ebenfalls deutlich. Im Gegensatz zu Losartan konnten Telmisartan, Candesartan und Valsartan auch die Phosphorylierung von SRC durch Convulxin deutlich inhibieren. Die Inhibition bei Arachidonsäure- oder TRAP-6-Aktivierung fiel bei allen Kinasen schwächer aus. Unter Verwendung von Convulxin wurde eine gesteigerte Phosphorylierung aller drei

Kinasen durch Zugabe von Losartan beobachtet. Mit Epinephrin stieg die Phosphorylierung von SRC und SYK. Telmisartan, Candesartan und Valsartan zeigten im Vergleich zum Losartan insgesamt die stärkste Inhibition bei Convulxin und Kollagen.

Zusätzlich zu der Darstellung der prozentualen Anteile phosphorylierter Plättchen in Tabelle 1, findet sich in Abb. 38 eine Darstellung des Medians inklusive Range (n=3) des MFI Fold increase der einzelnen Kinasen mit Induktoren und Inhibitoren. Bei Abb. 38 wurde der x-Mean ALL (siehe Beispiel Darstellung der Werte in Abb. 35-37 I, **gelbe Markierung**) der einzelnen Messungen zur Berechnung verwendet.

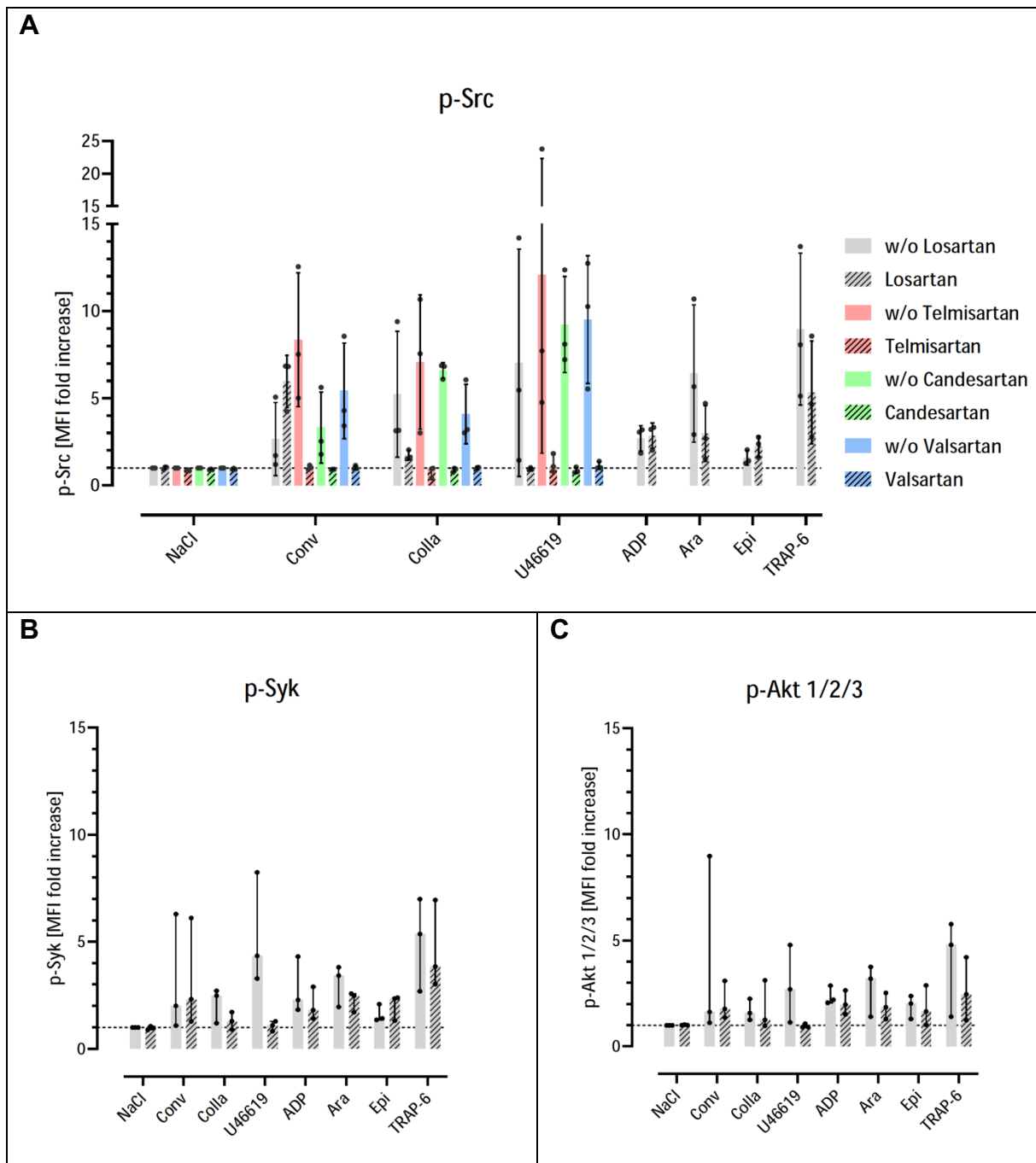


Abbildung 38: Darstellung des Medians inklusive Ranges des MFI fold increase mit verschiedenen Induktoren und Inhibitoren. Durchflusszytometrische Analyse n=3. A: p-SRC-Kinase, B: p-SYK-Kinase, C: p-AKT 1/2/3-Kinase. Gestrichelte Linie stellt den Wert der Kontrolle mit NaCl 0,9% dar. Conv.= Convulxin, Colla. = Kollagen, Ara. = Arachidonsäure, Epi. = Epinephrin.

Abb. 38 zeigt im Vergleich zu Tabelle 1 ähnliche Ergebnisse. Wie auch schon bei den Experimenten, die in Tabelle 1 dargestellt sind, beobachtet wurde, war ein Anstieg des MFI fold increase bei den drei getesteten Kinasen nur bei Convulxin als Induktor im Vergleich zu Convulxin mit vorheriger Inkubation mit dem GPVI-Inhibitor Losartan zu

beobachten. Ähnliches zeigte sich bei dem Induktor Epinephrin und den Kinasen p-SRC und p-SYK.

Bei allen anderen Versuchen der drei Kinasen, fand sich eine Zunahme des MFI fold increase bei Verwendung der Induktoren und eine Abnahme des MFI fold increase bei den Inhibitoren. In Abb. 38 A ist die p-SRC-Kinase gezeigt. Dort ist erkennbar, dass mit den GPVI-Inhibitoren (Losartan, Telmisartan, Candesartan, Valsartan) bei Convulxin, Kollagen und U46619 ein MFI fold increase im Bereich der Kontrolle mit NaCl 0,9% gemessen werden konnte. Eine Ausnahme hiervon bildeten Convulxin mit Losartan.

Mit dem Wissen und den Ergebnissen aus den *in vitro*-Experimenten, die in Tabelle 1 und Abb. 38 dargestellt sind, wurde eine Untersuchung mit Patientenblut (n=1) durchgeführt. Die starke Inhibition der SRC-Phosphorylierung durch Telmisartan in den oben dargestellten *in vitro*-Experimenten konnte teilweise auch im Patienten-Vollblut gezeigt werden.

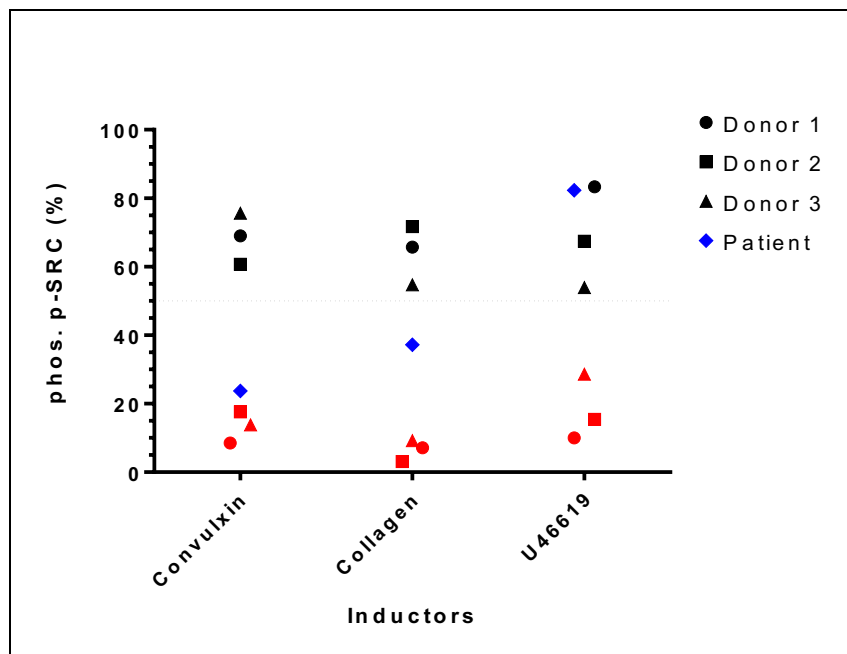


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse drei gesunder Spender (Donor 1-3) und eines Spenders, der Telmisartan einnimmt (Patient) hinsichtlich der Phosphorylierung von p-SRC in prozentalem Anteil positiver Thrombozyten. Schwarze Symbole = ohne Telmisartan; rote Symbole = 300 µM Telmisartan in vitro-Zugabe.

Die Werte des Telmisartan einnehmenden Patienten zeigten bei Convulxin und Kollagen im Vergleich zu den normalen Spendern (Donor 1-3) eine deutlich niedrigere SRC-Phosphorylierung. Mit U46619 war dieser Effekt hingegen nicht darstellbar, dort lag der Wert der Phosphorylierung bei dem Telmisartan-Patienten im Bereich der

Spender ohne Telmisartan-Zugabe (Abb. 39). Auch die Darstellung des MFI fold increase (Abb. 40) zeigt diese Beobachtung.

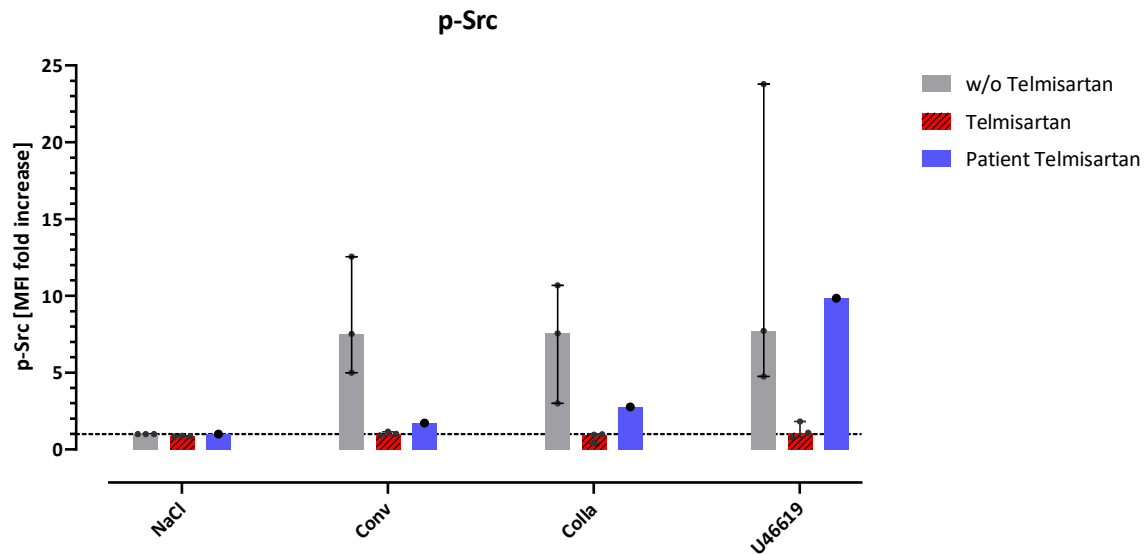


Abbildung 40: Darstellung des Medians inklusive Range des MFI fold increase mit verschiedenen Induktoren. Durchflusszytometrische Analyse mit p-SRC-Kinase, w/o Telmisartan und Telmisartan n=3, Patient Telmisartan n=1. Gestrichelte Linie stellt den Wert der Kontrolle mit NaCl 0,9% dar.

3.4.2 Aggregometrie nach Born mit Sartanen

3.4.2.1 Losartan

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit dem GPIV-Rezeptorblocker Losartan in der Aggregometrie nach Born vorgestellt. In diesem Versuch wurde mit Convulxin und zwei unterschiedlichen Losartan-Konzentrationen (30 μM und 300 μM) gearbeitet. In Abb. 41 zeigt Convulxin eine Thrombozytenaggregation von ca. 70 %. Durch die Inkubation (1 min) mit 30 μM Losartan, bevor anschließend Convulxin 5 ng/mL hinzugegeben wurde, zeigte sich eine Abnahme der Aggregation auf ca. 30 %, bei 300 μM Losartan eine Aggregation von ca. 0 %. Verglichen mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, bei denen keine Inhibition der Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, zeigt sich in der Aggregometrie eine deutliche Reduktion der Thrombozytenaggregation

In der Aggregometrie mit U46619 zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Convulxin. Abb. 42 zeigt bei U46619 eine Thrombozytenaggregation von ca. 60 %. Bei 30 μM Losartan zeigt sich eine Abnahme auf ca. 45 % und bei 300 μM Losartan keine Aggregation. Vergleicht man die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und die Aggregometrie nach Born, zeigt sich, dass in der Durchflusszytometrie eine Abnahme der Phosphorylierung bis auf den Wert der Negativkontrolle erreicht werden konnte. Dies konnte ebenfalls in

der Aggregometrie bei gleicher Konzentration des Losartans von 300 μM Losartan gezeigt werden.

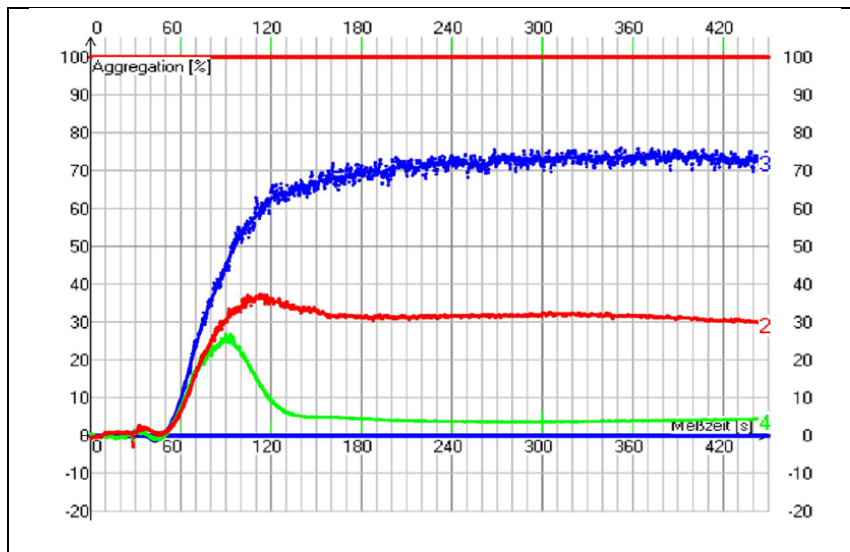


Abbildung 41: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor Convulxin 5 ng/mL (blaue Kurve). Inhibition mit 30 μM (rote Kurve) und 300 μM (grüne Kurve) Losartan.

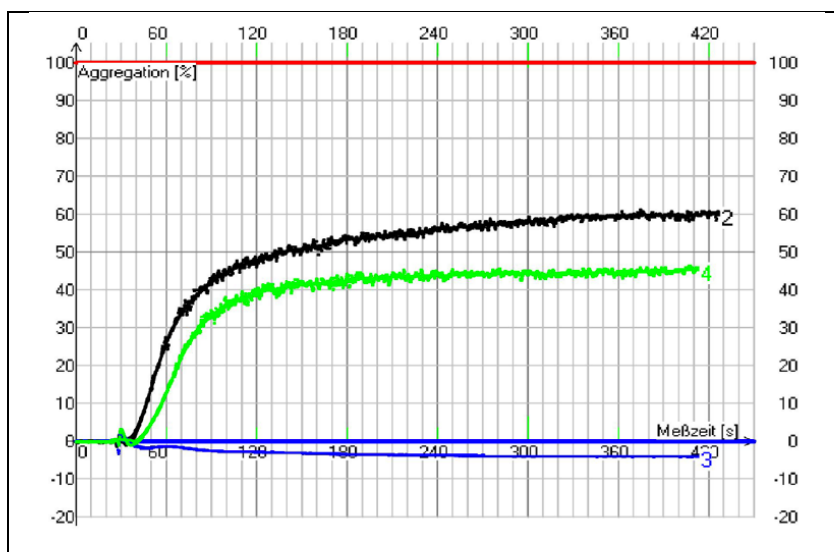


Abbildung 42: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (schwarze Kurve). Inhibition mit 30 μM (grüne Kurve) und 300 μM (blaue Kurve) Losartan.

3.4.2.2 Candesartan

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit dem GPIV-Rezeptorblocker Candesartan vorgestellt. Die in Abb. 43 und 44 dargestellten Experimente zeigen bei Convulxin und U46619 eine Thrombozytenaggregationen von

ca. 30%. Nach Inkubation (1 min) mit 30 μM und 300 μM Candesartan konnte keine Aggregation mehr nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Aggregometrie zeigten, dass eine Inhibition der Phosphorylierung der p-SRC im Durchflusszytometer zu erkennen war, sowie eine Inhibition der Aggregation im Parallelansatz der Aggregometrie.

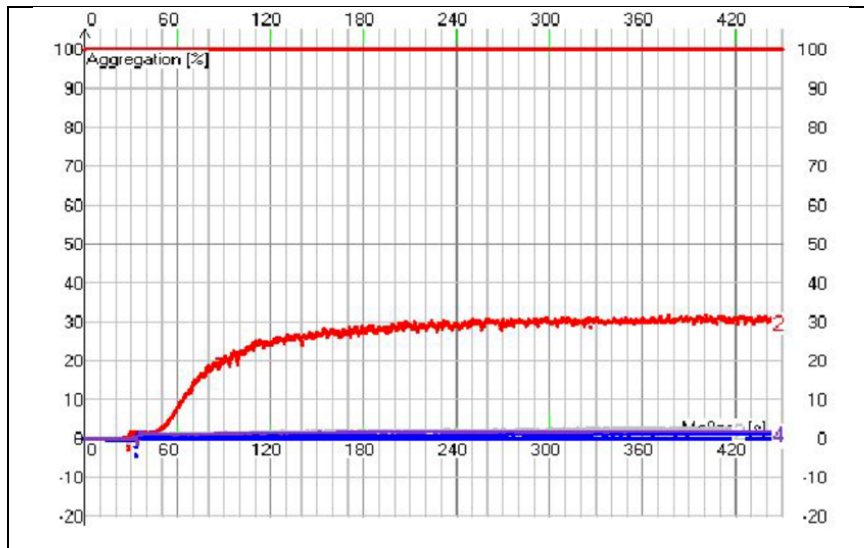


Abbildung 43: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor Convulxin 5 ng/mL (rote Kurve). Inhibition mit 30 μM (blaue Kurve) und 300 μM (violette Kurve) Candesartan. Negativkontrolle NaCl 0,9% (graue Kurve).

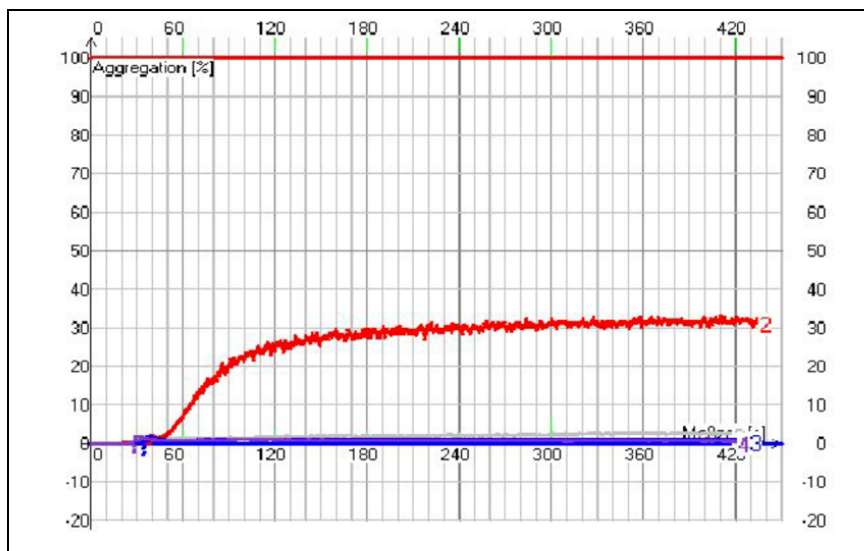


Abbildung 44: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 $\mu\text{g/mL}$ (rote Kurve). Inhibition mit 30 μM (blaue Kurve) und 300 μM (violette Kurve) Candesartan. Negativkontrolle NaCl 0,9% (graue Kurve).

3.4.2.3 Valsartan

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit dem GPIV-Rezeptorblocker Valsartan vorgestellt. Convulxin und U46619 zeigen in den Experimenten von Abb. 45 und 46 eine Aggregation von ca. 70% (Convulxin) bzw. ca. 60% (U46619). Bei Inkubation (1 min) mit 30 μM und 300 μM Valsartan zeigte sich keine Thrombozytenaggregation. Im parallelen durchflusszytometrischen Ansatz konnte eine vergleichbare Inhibition der Phosphorylierung der p-SRC-Kinase durch Valsartan gezeigt werden.

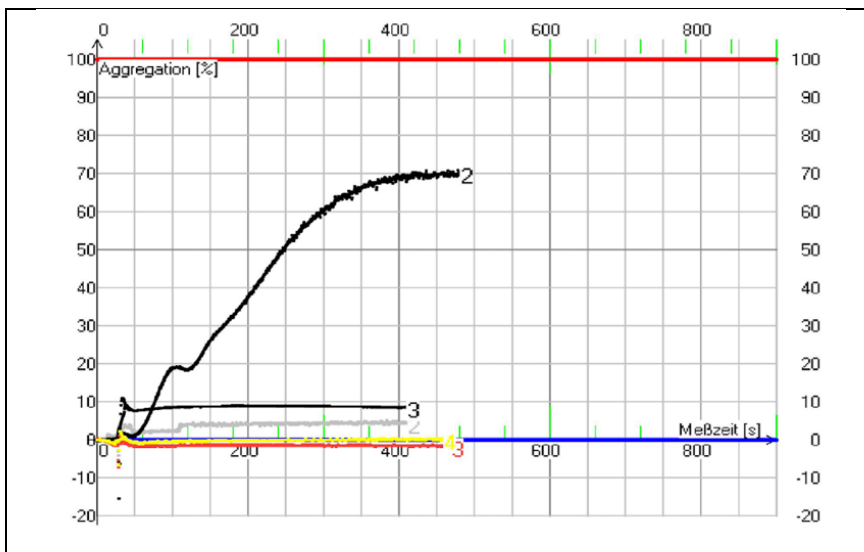


Abbildung 45: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor Convulxin 5ng/mL (**schwarze Kurve 2**), kein Induktor, sondern nur 300 μM Valsartan (**schwarze Kurve 3**). Inhibition mit 30 μM (**rote Kurve**) und 300 μM (**gelbe Kurve**) Valsartan.

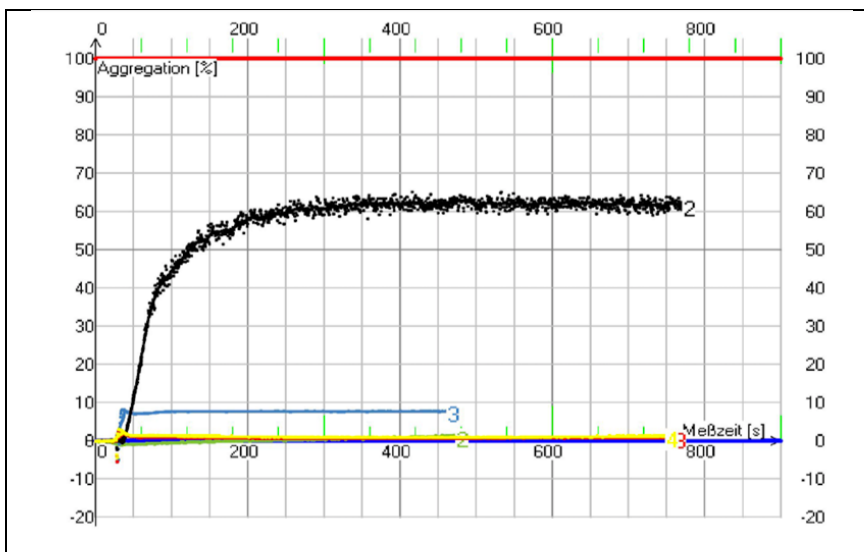


Abbildung 46: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 $\mu\text{g/mL}$ (**schwarze Kurve**). Inhibition mit 30 μM (**rote Kurve**) und 300 μM (**gelbe Kurve**) Valsartan. Negativkontrolle NaCl 0,9% (**grüne Kurve**) und nur 300 μM Valsartan (**blaue Kurve**).

3.4.2.4 Telmisartan

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente mit dem GPIV-Rezeptorblocker Telmisartan vorgestellt. Die Experimente in Abb. 47 und 48 zeigen, dass Convulxin und U46619 alleine zu einer Aggregation von ca. 55 % (Convulxin) bzw. ca. 60 % (U46619) führten. Bei Inkubation (1 min) mit 30 μM bzw. 300 μM Telmisartan zeigte sich keine Thrombozytenaggregation.

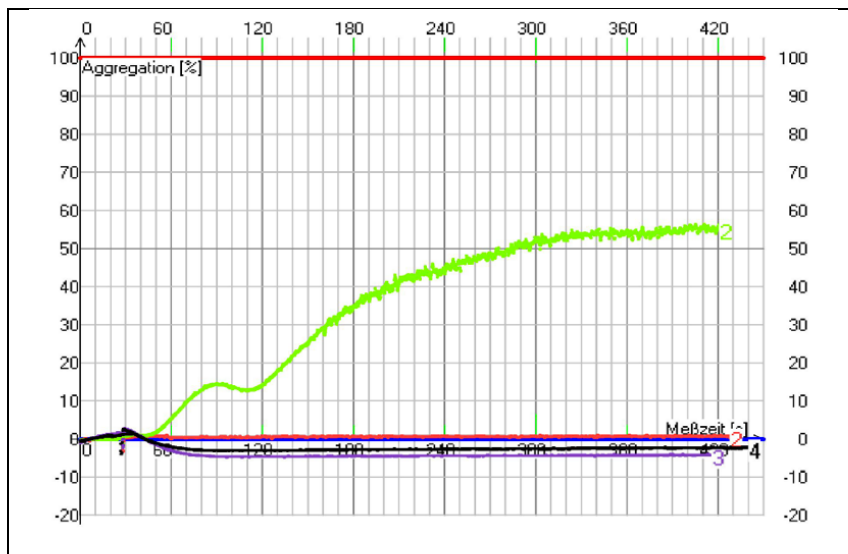


Abbildung 47: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor Convulxin 5 ng/mL (**grüne Kurve**). Inhibition mit 30 μM (**violette Kurve**) und 300 μM (**schwarze Kurve**) Telmisartan. Negativkontrolle NaCl 0,9% (**rote Kurve**).

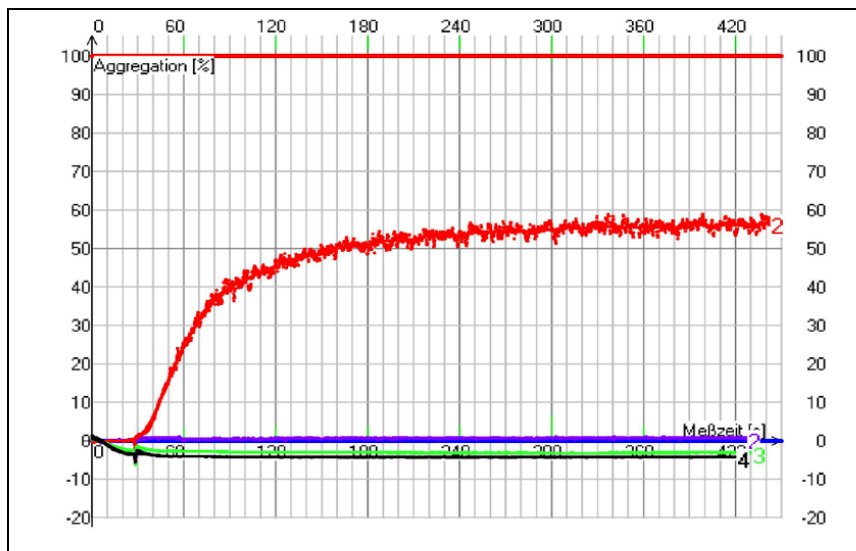


Abbildung 48: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 $\mu\text{g/mL}$ (**rote Kurve**). Inhibition mit 30 μM (**grüne Kurve**) und 300 μM (**schwarze Kurve**) Telmisartan. Negativkontrolle NaCl 0,9% (**violette Kurve**).

Bei der Aggregometrie (Abb. 49) mit dem Patientenblut aus Abb. 39 und 40 zeigte sich, dass die Thrombozytenaggregation durch Convulxin und U46619 mit ca. 40 % in Abb. 49 um ca. 15 % geringer war als in Abb. 47 und 48.

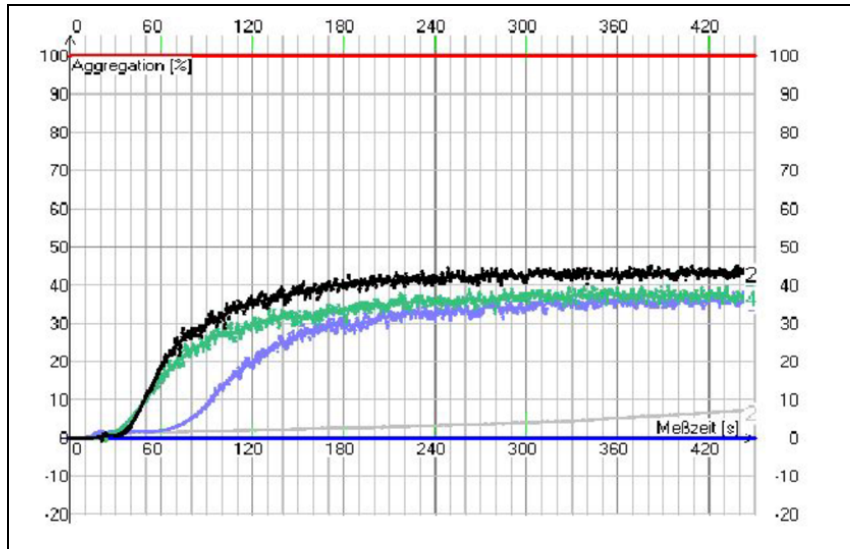


Abbildung 49: Aggregometrie nach Born mit Patientenvollblut bei Telmisartaneinnahme. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 µg/mL (grüne Kurve), Convulxin (schwarze Kurve) und Kollagen (violette Kurve).

3.4.3 Vorapaxar

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit dem PAR1-Rezeptorblocker Vorapaxar dargestellt. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde anti-p-AKT1/2/3 mit den Induktoren U46619 und TRAP-6 verwendet. Durch die Zugabe von Vorapaxar stieg die Phosphorylierung der AKT-Kinase bei U46619 und TRAP-6. Die Kontrolle mit NaCl 0,9 % und 500 nM Vorapaxar zeigte im Vergleich dazu einen geringen Anstieg der Phosphorylierung von 7,6 % auf 11,9 %, wie in Tabelle 2 visualisiert ist.

Tabelle 2: Durchflusszytometrische Analyse der Inhibition der Phosphorylierung p-AKT1/2/3 im Vollblut durch den PAR1-Rezeptorblocker Vorapaxar. Dargestellt sind Mittelwerte (n=2) der Plättchen in Prozent mit nachgewiesener Phosphorylierung. Vorinkubation (20 min.) des Vollbluts mit 100 nM, 250 nM oder 500 nM Rezeptorblocker; Kontr. (Kontrolle): 0,9% NaCl, 10 µg/mL U46619 und 20 µM TRAP-6.

Kinase	Antagonist	Kontr.	U46619	TRAP
p-Akt1/2/3	ohne	7,6	41,7	48,5
	100 nM Vorapaxar		57,7	47,3
	250 nM Vorapaxar		64,1	45,9
	500 nM Vorapaxar	11,9	66,5	58,2

In der Aggregometrie führte eine Induktion durch TRAP-6 zur Thrombozytenaggregation von ca. 45 %. Bei Vorinkubation mit 100 nM Vorapaxar zeigte sich keine Abnahme, bei Verwendung von 250 nM Vorapaxar eine Abnahme auf 35 % und bei 500 nM Vorapaxar eine Abnahme auf 0 % der Thrombozytenaggregation (Abb. 50). Die Vorinkubation von Vorapaxar und Induktion mit U46619 zeigte einen leichten Anstieg der Thrombozytenaggregation bis etwa 50 %. Bei Verwendung von U46619 ohne Vorapaxar lag die Thrombozytenaggregation lediglich bei ca. 40 % (Abb. 51).

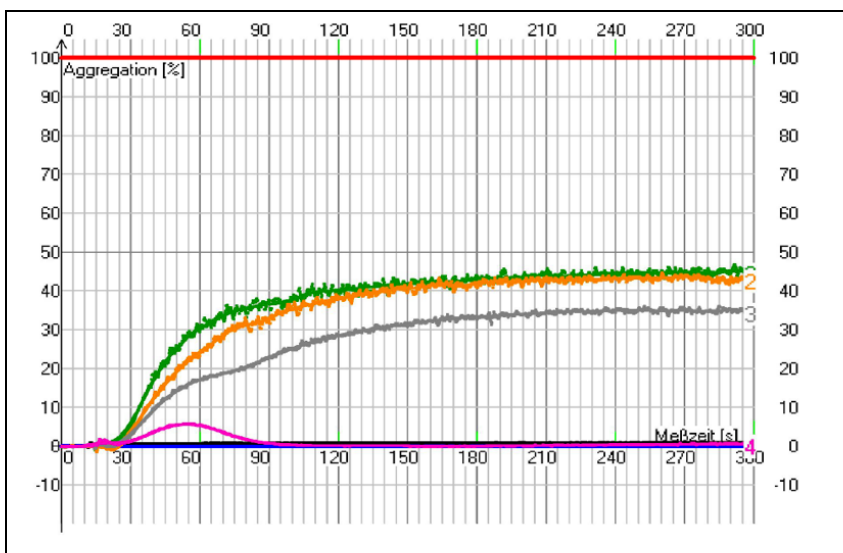


Abbildung 50: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse = Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor TRAP-6 20 µmol/L (grüne Kurve). Inhibition mit 100 nM (orange Kurve), 250 nM (graue Kurve) und 500 nM (pinke Kurve) Vorapaxar. Negativkontrolle NaCl 0,9% (schwarze Kurve).

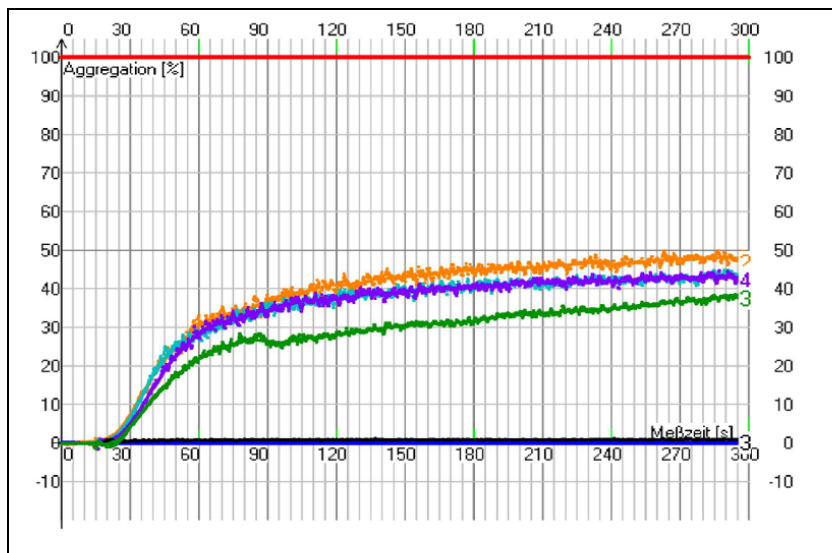


Abbildung 51: Aggregometrie nach Born. X-Achse = Zeit in Sekunden (s), Y-Achse Thrombozytenaggregation in Prozent. Induktor U46619 10 µg/mL (grüne Kurve). Inhibition mit 100 nM (orange Kurve), 250 nM (blaue Kurve) und 500 nM (violette Kurve) Vorapaxar. Negativkontrolle NaCl 0,9% (schwarze Kurve).

3.5 Lagerungsversuch mit dem Durchflusszytometer

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente zu Lagerungsversuchen mit den phosphorylierten Kinasen in der Durchflusszytometrie dargestellt. Der Versuchsaufbau bis zur Fixierung der Proben war identisch zu den vorherigen beschriebenen durchflusszytometrischen Untersuchungen. Als Induktoren wurden Convulxin, Kollagen, TRAP-6 und U46619 verwendet. Das fixierte Blut wurde bei 4 °C gelagert und an den Tagen 0, 1, 3 und 7 mit den Antikörpern SRC, SYK, AKT1/2/3 (AF488) und CD31(AF647) versetzt, inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen. An Tag 0 waren die höchsten prozentualen Anteile an Thrombozyten bei der Kontrolle (81,1 %) sowie bei U46619 (74,2 %) nachweisbar. Die höchste Phosphorylierung der SRC-Kinase zeigte sich an Tag 0 bei TRAP-6 (79,8 %), Convulxin (65,1 %) und Kollagen (64,1 %). Bei U46619 zeigte sich die geringste Phosphorylierung (24,7 %). Im Laufe der Lagerungstage sank die Anzahl der Thrombozyten. An Tag 7 lag der höchste gemessene Thrombozytenwert bei 3%. Dies geschah unter Verwendung von Convulxin. Im Vergleich zur SYK- und AKT-Kinase ist bei der SRC-Kinase der Abfall der Thrombozytenzahl von Tag 0 bis Tag 1 am größten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-SRC zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten im durch Induktoren aktivierten Vollblut. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der Plättchen in Prozent (% PLT) und der Plättchen mit nachgewiesener Phosphorylierung in Prozent (% phos.). Kontrolle 0,9% NaCl, 5 ng/mL Convulxin, 10 µg/mL Kollagen, 20 µM TRAP-6 und 10 µg/mL U46619.

Mittelwerte (n=3): p-Src		Kontrolle	Convulxin	Kollagen	TRAP	U46619
Tag 0	% PLT	81,1	43,2	49,2	29,5	74,2
	% phos.	4,2	65,1	64,1	79,8	24,7
Tag 1	% PLT	16,7	15,7	20,1	17,5	36,2
	% phos.	5,1	49,7	47,6	65,4	19,3
Tag 3	% PLT	1,1	8,2	18,6	4,4	8,5
	% phos.	48,5	55,2	51,3	69,5	33,5
Tag 7	% PLT	0,8	3,0	1,6	0,4	0,6
	% phos.	19,1	56,8	71,9	80,8	55,2

Bei der SYK-Kinase waren an Tag 0 die meisten Thrombozyten bei der Kontrolle (65,8%) und U46619 (74,2 %) nachweisbar. Die höchste Phosphorylierung der SYK-Kinase zeigte sich bei TRAP-6 (95,2 %), Convulxin (90 %) und Kollagen (88,1 %). Bei der SYK-Kinase zeigte sich im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Kinasen in der Negativkontrolle die größte Hintergrundphosphorylierung (61,9 %). Bei U46619 zeigte sich die geringste Phosphorylierung (73,2 %). Im Laufe der Lagerungstage sank die Anzahl der Thrombozyten. An Tag 7 waren die meisten Thrombozyten mit einem Anteil von 3,6 % bei der Verwendung von Convulxin vorhanden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-SYK zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten im durch Induktoren aktivierten Vollblut. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der Plättchen in Prozent (% PLT) und der Plättchen mit nachgewiesener Phosphorylierung in Prozent (% phos.). Kontrolle 0,9% NaCl, 5 ng/mL Convulxin, 10 µg/mL Kollagen, 20 µM TRAP-6 und 10 µg/mL U46619.

Mittelwerte (n=3): p-Syk		Kontrolle	Convulxin	Kollagen	TRAP	U46619
Tag 0	% PLT	65,8	44,8	57,3	34,0	74,2
	% phos.	61,9	90,0	88,1	95,2	73,2
Tag 1	% PLT	48,4	35,5	49,9	23,9	57,7
	% phos.	85,2	96,8	95,9	98,5	88,1
Tag 3	% PLT	2,0	7,4	21,3	7,3	10,8
	% phos.	95,8	93,5	99,7	99,8	98,4
Tag 7	% PLT	0,7	3,6	1,9	0,8	0,7
	% phos.	95,2	97,7	99,1	99,4	99,3

An Tag 0 waren die meisten Thrombozyten bei der Kontrolle (79,1 %) und U46619 (69,9 %) nachweisbar. Die höchste Phosphorylierung der AKT-Kinase zeigte sich bei TRAP-6 (89,8 %), Convulxin (79,1 %) und Kollagen (76,2 %). Bei U46619 lag die geringste Phosphorylierung (47,3 %) vor. Im Laufe der Lagerungstage sank die Anzahl der Thrombozyten. An Tag 7 waren die meisten Thrombozyten mit einem Anteil von 0,7 % bei Kollagen vorhanden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Durchflusszytometrische Analyse der phosphorylierten Kinase p-AKT1/2/3 zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten im durch Induktoren aktivierten Vollblut. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der Plättchen in Prozent (% PLT) und der Plättchen mit nachgewiesener Phosphorylierung in Prozent (% phos.). Kontrolle 0,9% NaCl, 5 ng/mL Convulxin, 10 µg/mL Kollagen, 20 µM TRAP-6 und 10 µg/mL U46619.

Mittelwerte (n=3): p-Akt		Kontrolle	Convulxin	Kollagen	TRAP	U46619
Tag 0	% PLT	79,1	43,6	52,7	28,8	69,9
	% phos.	48,6	79,1	76,2	89,8	47,3
Tag 1	% PLT	29,2	38,7	48,1	29,5	41,7
	% phos.	40,3	85,6	79,7	93,1	55,4
Tag 3	% PLT	0,7	13,7	25,9	10,0	8,2
	% phos.	93,2	98,2	94,5	99,0	92,7
Tag 7	% PLT	0,0	0,4	0,7	0,4	0,3
	% phos.	0,0	100,0	99,8	100,0	100,0

Bei allen drei untersuchten Kinasen (SRC, SYK und AKT) waren die nachgewiesenen Thrombozytenzahlen ab Tag 3 der Lagerung gering. Unter einer Induktion durch Kollagen waren an Tag 3 noch die meisten Thrombozyten vorhanden (SRC 18,6 %, SYK 21,3 % und AKT 25,9 %). Eine aussagekräftige Untersuchung bezüglich der Phosphorylierung der Kinasen SRC, SYK und AKT ist bei dem verwendeten Versuchsaufbau für SRC lediglich an Tag 0 möglich.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zur Beantwortung der Forschungsfrage 1 Lagerungsversuche durchgeführt. Diese zeigten, dass bei einem Lagerungszeitraum von bis zu sieben Tagen die Intensität aller gefärbten Strukturen mit der Zeit abnahm. Die Abnahme der Intensität war bei den meisten angefärbten Strukturen bereits ab dem ersten Lagerungstag zu beobachten. Zudem zeigte sich, dass Thrombospondin nur mit EDTA-antikoaguliertem Blut darstellbar war. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte aber nicht nur die Abnahme der Intensität über den Lagerungszeitraum nachgewiesen werden, sondern auch, dass es innerhalb des Lagerungszeitraums zu Veränderungen der Strukturverteilung der angefärbten Strukturen kam. Filamin A und NMMIIA lagen an Tag 0 fixiert und gefärbt noch diffus verteilt im Thrombozyten vor und stellten sich im Anschluss ab dem ersten Lagerungstag vermehrt als eine Ringstruktur dar. Veränderungen der Struktur über den Lagerungszeitraum fand sich ebenso bei β 1-Tubulin. Alle weiteren Strukturen blieben über den gelagerten Zeitraum unverändert. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit Blutausstriche nach ihrer Intensität und Struktur beurteilt, die an Tag 0 fixiert wurden und im Anschluss fixiert bis Tag 7 gelagert wurden. Erst nach der fixierten Lagerung bis zu dem entsprechenden Lagerungstag wurden die Blutausstriche gefärbt. Bei dieser Methode, der an Tag 0 fixierten Blutausstriche, zeigte sich eine stärkere Intensität der angefärbten Strukturen, als wenn sie unfixiert gelagert wurden.

Zur Beantwortung der Forschungsfrage 2 wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Visualisierung der Signalkaskade mit Hilfe von phosphorylierten Kinasen und der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Durch die Anfärbung der phosphorylierten Kinasen in der Fluoreszenzmikroskopie konnte keine ausreichende Sensitivität und Spezifität erreicht werden und wurde aus diesem Grund nicht weiterverfolgt. Der parallele Ansatz mit der Durchflusszytometrie zeigte hingegen erfolgreiche Ergebnisse. Mit Hilfe von Zeitreihen konnte der optimale Zeitpunkt der Inkubation mit den Induktoren vor der durchflusszytometrischen Untersuchung bestimmt werden. Dieser lag bei drei Minuten. Durch die Verwendung verschiedener Induktoren konnte eine Phosphorylierung der SRC-, SYK- und AKT1/2/3-Kinasen gezeigt werden. Bei der SRC-Kinase eigneten sich besonders TRAP-6, U46619 und Kollagen als potente Induktoren. Bei der SYK-Kinase waren es U46619, TRAP-6, Convulxin und ADP. Zusätzlich zeigte die SYK-Kinase in der Negativkontrolle die geringste Hintergrund-

Phosphorylierung. Zur niedrigsten nachweisbaren Phosphorylierung kam es bei der AKT1/2/3-Kinase. Eine Induktion mit TRAP-6 zeigte dabei die für AKT1/2/3 stärkste Phosphorylierung. Durchflusszytometrisch war somit eine gute Darstellung der Phosphorylierung der verwendeten drei Kinasen durch kleinsten Blutmengen möglich. Für die gezielten Inhibitionsversuche dieser Arbeit wurde unter anderem die Medikamentenfamilie der Sartane zur GPVI-Rezeptorinhibition verwendet. Es zeigte sich, dass besonders bei der Induktion mit U46619 und Verwendung eines Vertreters der Familie der Sartane bei allen drei Kinasen die Phosphorylierung der Kinase deutlich gesenkt werden konnte. Die Phosphorylierung lag durch die Inkubation (1 min) mit einem Sartan auf dem Niveau der Negativkontrolle. Bei Induktion mit Convulxin und Verwendung von Losartan steigerte sich hingegen die Phosphorylierung bei allen drei Kinasen. Bei durchflusszytometrischer Untersuchung von Patientenblut, bei *in vivo*-Einnahme von Telmisartan, konnte im Vergleich mit drei gesunden Spendern gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der SRC-Kinase bei Convulxin und Kollagen deutlich reduziert ist. In der Aggregometrie nach Born konnte bei allen verwendeten Sartanen eine Reduktion der Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden.

Die weiteren Versuche mit dem PAR4-Rezeptorblocker Vorapaxar, zeigte im Durchflusszytometer bei der AKT1/2/3-Kinase keine Reduktion. Stattdessen konnte hier in der höchsten verwendeten Konzentration, sogar eine Zunahme der Phosphorylierung beobachtet werden. In der parallel durchgeführten Aggregometrie nach Born zeigte sich hingegen eine komplette Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Um festzustellen, ob Proben für die Untersuchungen mit dem Durchflusszytometer versendet werden können, wurden in einem letzten Schritt erneut Lagerungsversuche durchgeführt. Durch die verwendeten Lagerungszeiträume sollte die Dauer, die durch den Transport bei einer Zentralisierung zustande kommt, imitiert werden. In dem durchgeführten Untersuchungsansatz war eine Lagerung über den Tag 0 nicht möglich. Zu einem späteren Zeitpunkt waren nur noch wenige bis keine Thrombozyten nachweisbar.

5. Diskussion und Ausblick

5.1 Blutausstriche und Fluoreszenzmikroskopie

Das Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die Standardisierung der Lagerung von Blutausstrichen und zum anderen die Visualisierung von funktionellen Prozessen in Thrombozyten mit Hilfe von phosphorylierten Kinasen zu ermöglichen. Obwohl die Pathophysiologie von vielen angeborenen und erworbenen Thrombozytopathien mittlerweile sehr gut charakterisiert ist, gestaltet sich die Diagnostik dieser Erkrankungen immer noch schwierig. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich wie in Kapitel 1 beschrieben, als besonders geeignet bei der Diagnostik von Thrombozytenerkrankungen wie z.B. dem Bernard Soulier Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann, Gray-Platelet Syndrom und der Gruppe der MYH9-Defekte (14, 35). Funktionelle Thrombozytendefekte können mit der Mikroskopie jedoch nicht dargestellt werden.

Das erste Ziel der Arbeit bestand darin, die Reliabilität der Methode Mikroskopie darzustellen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Lagerungsversuche zeigten, dass es zu Problemen der Beurteilbarkeit von Blutausstrichen kommen kann, wenn der Lagerungszeitraum zunimmt. Das kann zum Beispiel durch eine längere Transportdauer passieren. Die durch die Zeit auftretenden Veränderungen, betreffen vor allem die Intensität und weniger die Struktur der unterschiedlichen Marker. Durch diese Arbeit ist bekannt, dass dieser Zeiteffekt mit in die Beurteilung einfließen muss, um dadurch möglichst sichere und aussagekräftige Bewertungen der Ergebnisse treffen zu können. Mithilfe dieser neuen Erkenntnisse kann ein Teil dieser Störgröße beseitigt werden. Außerdem zeigte sich, dass Thrombospondin nur mit EDTA-antikoaguliertem Blut darstellbar war. Der Grund hierfür könnte der verwendete Antikörper *Anti-Thrombospondin 1 antibody* der Firma *abcam*, Cambridge, UK sein, der eventuell nur ein Epitop auf Thrombospondin erkennt, das durch Ca^{2+} Entzug zugänglich wird. Andere Antikörper, die sich gegen Thrombospondin richten, wurden jedoch nicht ausprobiert.

Neben der zu langen Lagerung von Blutausstrichen kann auch die zu kalte Lagerung des Blutes vor dem Ausstreichen bei 4°C zu Artefakten führen. So zeigten z.B. Thrombozytenkonzentrate, die bei 4°C gelagert werden, deutliche morphologische Veränderungen gegenüber den bei Raumtemperatur gelagerten Thrombozyten (36).

Bei vereinzelt untersuchten Markern zeigte sich nicht nur eine Veränderung der Intensität, sondern auch der strukturellen Anordnung- wie beispielsweise bei dem untersuchten Filamin A. Wird Filamin A unmittelbar an Tag 0 fixiert und gefärbt liegt es im Thrombozyten diffuse verteilt vor, hingegen ab dem Lagerungszeitpunkt > 24 Std als Ringstruktur. Daraus lässt sich schließen, dass beide Verteilungsformen je nach Lagerungszeitraum als physiologisch anzusehen und zu bewerten sind. Ähnliches zeigte sich bei NMMIIA und β_1 -Tubulin. Das Zytoskelett allgemein zeigt eine große Variabilität in den Thrombozyten. So kann z.B. die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Zentralisierung und diffusen Verteilung des Zytoskeletts führen (37).

Diese Ergebnisse und Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, erlaubten uns folgende Empfehlung: Blutaufstriche sollten so früh wie möglich fixiert und gefärbt werden. Der durchgeführte Versuch, die Blutaufstriche so früh wie möglich zu fixieren und die fixierten Blutaufstriche zu lagern, zeigte eine verbesserte Stabilität der Intensität nach 7 Tagen. Die Intensität entsprach aber nicht der Intensitätshöhe der Blutaufstriche, die an Tag 0 fixiert und gefärbt wurden.

Trotz der eben genannten Erkenntnisse zum Lagerungszeitraum, soll an dieser Stelle ein Verweis zu dem in Kapitel 1 erwähnten möglichen Vorteil eines zentralisierten Speziallabors mit der Expertise der Fluoreszenzmikroskopie für beispielsweise Regionen mit einer geringen Dichte an Speziallaboren erfolgen. Durch das Wissen der Intensitätsabnahme sowie der Strukturveränderung können diese Aspekte bei der Beurteilung von Blutaufstrichen mit einbezogen werden, sodass die eben genannten Störgrößen bei einer Zentralisierung nicht unberücksichtigt bleiben. Dies bedeutet beispielsweise, dass die Intensität nach dem Lagerungszeitraum bis zu Tag 3 geringer ist als an Tag 1, jedoch ausreichend zur Bewertung der Struktur ist. Die Befunde dieser Arbeit geben hierbei Orientierung in Bezug auf die einzelnen Marker und ihrer Intensität sowie Strukturverteilung zu unterschiedlichen Lagerungszeiträumen. Die Berücksichtigung dieser Erkenntnisse führt dazu, dass in einem gewissen Umfang die Veränderung über den Lagerungszeitraum nicht zu einer Fehleinschätzung der untersuchten Marker führt.

In Bezug der obigen Ausführungen lässt sich ein weiteres Forschungspotential erkennen, um zu untersuchen, ob es durch die Verwendung anderer Fixierungsverfahren möglich ist, eine bessere Stabilität über den Lagerungszeitraum

zu erzielen. Hierbei könnte die von der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V) vorgeschlagene Alternative zur Fixierung berücksichtigt werden. In der Leitlinie-Thrombozytopathien wird zur Fixierung mit Aceton die Verwendung von Formalin oder Methanol vorgeschlagen (38). Ein zusätzlich beschriebenes Reagenz zum Fixieren, welches an dieser Stelle noch genannt werden soll, ist Ethylalkohol (39).

Soll die Gefahr von Lagerungsartefakte zukünftig vermieden werden, wäre die Entwicklung eines Fixierungs-Kit für externe Labore eine Möglichkeit, mithilfe derer diese bereits vor Ort die ersten Schritte einleiten könnten, um Blutausstriche über den Zeitraum des Transports möglichst frei von Lagerungsartefakten zu halten. Sollte dies nicht möglich oder ausreichend sein, könnte ein komplett vorgefertigtes Combi-Kit aus Fixierung und Färbung eine weitere Möglichkeit darstellen. Dadurch könnten externe Labore die Blutausstriche anhand eines vorgegebenen Protokolls sowie den dazugehörigen Reagenzien so weit bearbeiten (Fixation und Färbung), sodass die Proben lediglich zur Beurteilung durch einen erfahrenen Mitarbeitenden eines Speziallabors mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie versandt werden müssen.

Mit der in Kapitel 1 erläuterten Forschungsarbeit „Diagnosis of inherited platelet disorders on blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders“ von A.Greinacher et al. (14), konnte gezeigt werden, dass die Ausstrichdiagnostik eine einfache, vielversprechende und vielseitige Methode in der Diagnostik von morphologischen Thrombozytendefekten darstellt. Da sich die Methode der Fluoreszenzmikroskopie als eine gute sowie kostengünstige Untersuchung im Vergleich zu teuren und aufwendigen molekulargenetischen Methoden (40,41) bei der Diagnostik von strukturellen Thrombozytendefekten erwies, bestand die Überlegung, mit ihrer Hilfe auch funktionelle Defekte in den Signalkaskaden der Thrombozyten zu diagnostizieren. Dabei sollte die Visualisierung von phosphorylierten Kinasen helfen. Die Visualisierung der Phosphorylierung auf Blutausstrichen schien in den Vorversuchen mit dem direkt konjugiertem SRC(p⁴¹⁸) möglich, stellte sich dann aber in den darauffolgenden Versuchen als nicht zielführend dar. Die generelle Darstellung bzw. das Vorhandensein durch Färbung der SRC(p⁴¹⁹), der SYK und AKT 1/2/3 Kinasen war möglich, es konnte aber kein Unterschied zwischen Blutausstrichen, die im Voraus durch einen Induktor aktiviert wurden und derer, die nicht aktiviert wurden,

gezeigt werden. Intensität und Struktur blieben trotz Aktivierung gleich. Um diese Beobachtung zu reproduzieren und einen einzelnen Induktor als Fehlerquelle auszuschließen, wurden die Versuche mit verschiedenen Induktoren durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass einzig bei der SYK-Kinase mit Ephinephrin, Convulxin und TRAP-6 als Induktoren eine geringe Intensitätszunahme zeigte. Zum jetzigen Zeitpunkt können auf eingesandten Blutaussstrichen auf Grund der technischen Probleme somit weder der Aktivierungsstatus noch die Signaltransduktionswege der Thrombozyten ausreichend sensitiv und spezifisch dargestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist dieser Ansatz nicht weiterverfolgt worden. Jedoch zeigten einzelne Vorversuche bereits einen Lösungsansatz für zukünftige Versuche. Es wurde beobachtet, dass durch andere Methoden sowie Reagenzien bei der Fixierung der Weg der Visualisierung der Phosphorylierung auf Blutaussstrichen möglich ist. Ein Grund hierfür könnte die Permeabilisierung von Thrombozyten durch Azeton sein.

5.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Mithilfe der Durchflusszytometrie können einzelne für den Thrombozyten spezifisch exprimierte Oberflächenrezeptoren sowie intrinsischen und exogenen Granulainhaltsstoffen bereits untersucht und die Verteilung der einzelnen Parameter ausgewertet werden. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um die Freisetzungsuntersuchungen wie die Freisetzung von CD62P, vWF, CD63, Serotonin mit Stimulation der Thrombozyten. Bei angeborenen Defekten oder auch erworbenen Defekten kann es hilfreich sein, spezifische Rezeptordefekte näher einzugrenzen und Signalwege besser zu verstehen (42).

Aktuell ist nur bei einigen hereditären Thrombozytenerkrankungen wie dem Bernard Soulier Syndrom, der Thrombasthenie Glanzmann oder dem Gray-Platelet Syndrom die durchflusszytometrische Untersuchung zum Standardverfahren etabliert (43). Ebenso kann mittels der Durchflusszytometrie durch die Bestimmung retikulärer Thrombozyten zwischen einer Verbrauchsthrombozytopenie und einer Bildungsstörung von Thrombozyten unterschieden werden (44). Auch einfache Standardexpressionsmarker, wie z.B. die CD62P Expression und die CD63 Expression mit und ohne Aktivierung oder die Mepacrinaufnahme gehören mittlerweile in einigen Laboren zu den Standardmethoden der Thrombozytenfunktionsuntersuchungen (45,46,47). Zudem ergibt sich ebenso wie bereits bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Vorteil, dass nur

geringe Blutvolumina benötigt werden. Dies stellt erneut einen Vorteil bei pädiatrischen Patienten sowie Patienten mit einem Thrombozytenmangel dar. Die durchflusszytometrische Untersuchung unabhängig von der absoluten Thrombozytenzahl der zu untersuchenden Person und liefert schnelle Ergebnisse. Bei vielen Protokollen ist eine Fixierung mit anschließendem Versand möglich, was eine Verschickung ebenfalls möglich macht. Es bestehen aber nicht nur Vorteile und positive Aspekte dieser viel verwendbaren und weitreichend einsetzbaren Untersuchungsform. Erhöhte Kosten sowie speziell geschultes Personal im Umgang mit umfangreichen Untersuchungsansätzen stellen nur zwei der Nachteile dieses Verfahrens dar.

Auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten können mithilfe der Durchflusszytometrie Aktivierungsmarker wie z.B. die P-Selectin-Expression (CD62P) aus den α -Granula oder die CD63-Expression aus den lysosomalen Granula ausgewertet werden (19). Die Expression und die Freisetzung von Inhaltsstoffen nach Aktivierung stellt jedoch nie eine vollständige Phänotypisierung dar. So können Einschränkungen in der Phosphorylierung bestimmter Kinasen zu Blutungs- oder Thrombozytose neigungen führen (48,49,50). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hingegen gezielt die Phosphorylierung einzelner Kinasen mit Hilfe der durchflusszytometrischen untersucht.

Die Durchflusszytometrie stellte sich dabei im Vergleich zur vorher in der Diskussion beschriebenen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung als zielführende Methode dar. Phosphorylierungsprozesse von SRC, SYK und AKT stellen komplexe Signaltransduktionswege in den Thrombozyten dar (51,52,53). Die Kenntnis dieser komplexen Prozesse liefern auch neue therapeutische Optionen in den Behandlungen von verschiedensten Erkrankungen (54,55,56). Jedoch ist die Visualisierung dieser Phosphorylierungsprozesse wenig standardisiert und bisher wenig in der Routinediagnostik verwendet. Wir konnten bei allen drei untersuchten Kinasen einen deutlichen reproduzierbaren Anstieg der Phosphorylierung mithilfe verschiedener Induktoren zeigen. Die Phosphorylierung der Kinasen ist ein zeitabhängiger Prozess mit unterschiedlicher Kinetik. Wichtig war es, zu Beginn den optimalen Inkubationszeitpunkt der drei Kinasen mit den Induktoren zu finden, da die Fachliteratur in dieser Fragestellung kein einheitliches und zielführendes Bild zeigte. Durch unsere Zeitreihen in dieser Arbeit konnten wir den optimalen Inkubationszeitpunkt zeigen, welches eine standardisierte Darstellung und damit auch

Einsatz von Inhibitoren ermöglicht. Unklar bleibt ob, die Visualisierung der Phosphorylierung auf alle Signaltransduktionsprozesse im Thrombozyten übertragbar ist, da das bestehende Protokoll mit fixierten Proben arbeitet. Nicht für alle Prozesse im Thrombozyten ist eine Fixierung möglich. So erfolgt z.B. die Bestimmung der PAC-1 Bindung an den GPIIb/IIIa Rezeptor nur an unfixierten Thrombozyten und ist damit nicht für Lagerung und Versand geeignet.

Aktuell erscheint die Methode zusätzlich auch nur im Forschungsbereich Anwendung zu finden, um sowohl pharmakologische Wechselwirkungen von Medikamenten in Thrombozyten und Signaltransduktionsstörungen bei Erkrankungen besser verstehen zu können. Kaum ein verwendetes Reagenz ist ein zugelassenes in vitro Diagnostikum gemäß der aktuell gültigen EU-Richtlinie. Die Methode ist jedoch eine zukunftsweisende Methode zur vollständigen Phänotypisierung von Patienten und zur differenzierten Betrachtung von Signaltransduktionsstörungen. So kann im letzten Abschnitt einen Ausblick auf die weiterführende Anwendung des Ansatzes zur besseren Charakterisierung verschiedener Inhibitoren gegeben werden.

5.3 Erste weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem Einsatz verschiedener Inhibitoren

Der durchflusszytometrische Ansatz stellt eine gute Methode dar, Signaltransduktionsstörungen zu identifizieren und besser zu charakterisieren. Nachdem durch Versuche die Phosphorylierung im Durchflusszytometer detektierbar war, konnte mit dem gezielten Einsatz von Inhibitoren als Ausblick gezeigt werden, dass die Methode ein großes Potential z.B. bei der Identifikation von medikamentösen Funktionsdefekten darstellt. Mit Hilfe der Inhibitoren kann durch das Eingreifen in einzelne Signalwege, die Ab- oder Zunahme der Phosphorylierung in der Durchflusszytometrie dargestellt werden.

In Kapitel 1 wurden die verschiedenen Rezeptoren des Thrombozyten dargestellt (siehe hierzu auch Abb. 1). Aufgrund der Vielzahl dieser, wurde sich im Rahmen der Inhibitionsversuchen dieser Arbeit nur auf den GPVI- und PAR1-Rezeptor beschränkt (57,58).

Die Medikamentenfamilie der Sartane, die in der Praxis zur Behandlung von Herzkreislauf- und Nierenerkrankungen genutzt werden (59), stellten sich wie in Kapitel 1 sowie in der Fachliteratur nicht nur als Antagonist für AT1-Rezeptoren dar, sondern auch als Inhibitor für den GPVI-Rezeptor (25, 59, 60). Zusätzlich besitzen sie

auch eine inhibierende Wirkung auf den TxA₂-Rezeptor (25). Losartan wird in der Fachliteratur als besonders geeignet beschrieben. Losartan hemmt weder die Bindung von GPVI-Dimeren, noch die Bindung von Kollagen an den GPVI-Dimeren, sondern vielmehr die GPVI Clusterbildung, wodurch die nachgeschaltete Signalübertragung blockiert wird (60). So zeigt sich die Wirkung von Losartan günstig auf die Reduktion der Apoptose der Thrombozyten bei Sepsis (61), reduziert die Thrombusformation in hypertensiven Ratten (62) oder beeinflusst das Wiederholungsrisiko bei STEMI-Patienten unter anderem durch Beeinflussung der Thrombozytenaggregation (63). Da sich die Vorversuche mit Losartan und die in der Literatur beschriebenen Effekte vielversprechend zeigten, wurden weitere Medikamente der Sartan-Familie mit in die Untersuchung einbezogen. Alle diese verwendeten Inhibitoren zeigten bei den drei untersuchten phosphorylierten Kinasen und den meisten der verwendeten Induktoren eine Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zu dem Ansatz ohne einen Induktor. Die einzige Ausnahme war Losartan in Verbindung mit dem Induktor Convulxin. Hier nahm die Phosphorylierung in der Durchflusszytomterrie bei Inhibition mit Losartan bei allen drei untersuchten Kinasen zu. Bei der Verwendung von TRAP-6 in Verbindung mit Losartan nahm die Phosphorylierung nur bei der SRC-Kinase zu. Obwohl die verschiedenen Medikamente alle zur selben Medikamentenfamilie gehören, tritt bei den anderen Vertretern Telmisartan, Candesartan und Valsartan dieser Anstieg der Phosphorylierung bei der Verwendung von Convulxin als Induktor nicht auf. Dieses Ergebnis ist schwer zu interpretieren. Losartan gehört eher zu den kurzwirksamen Sartanen im Vergleich zu Telmisartan (64). Sie unterscheiden sich unter anderem auch in ihrem Affinitätsverhalten zum AT-1 Rezeptor (65). Diese pharmakokinetischen Unterschiede führen am ehesten zu dem unterschiedlichen Verhalten in der Thrombozytenhemmung. Wie eng die einzelnen Signalwege miteinander verbunden sind, wird auch bei der Verwendung von Induktoren, die nicht gezielt den GPVI-Rezeptor ansteuern, wie z. B. bei Kollagen, deutlich. Denn auch bei Kollagen und der verwendeten Inhibition mit einem Sartan kommt es zu einer Abnahme der Phosphorylierung. Die deutliche Abnahme der Phosphorylierung bei der Verwendung von U46619 ist auf die zusätzliche inhibierende Wirkung, die Lewis Taylor et al. auf den Thromboxan A₂-Rezeptor beschreibt, zurückzuführen (25).

Da es sich bei dem durchflusszytometrischen Verfahren in dem Zusammenhang der Fragestellung nach funktionellen Defekten in Thrombozyten um ein neues handelte, wurde parallel der Goldstandard mit der Aggregometrie nach Born durchgeführt (36).

Dies war wichtig, um Ergebnisse zu vergleichen und zu bewerten. Auch hier gibt es zu beachten, dass die Befunde der Aggregometrie eine hohe Variabilität haben und eine Standardisierung nur bedingt möglich ist (66, 67). So zeigte sich eine Abnahme der Aggregation bei Inhibition mit allen verwendeten Sartanen. Was bei der Verwendung von U46619 als Induktor und der Inhibition mit den Sartanen ein kongruentes Bild im Vergleich zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen gibt. Es kam zu einer Abnahme der Aggregation in der Aggregometrie, sowie einer Abnahme der Phosphorylierung in der Durchflusszytometrie.

Eine Abweichung zeigte sich bei der Aggregometrie bei der Convulxin als Induktor und Losartan als Inhibitor verwendet wurde. Hier zeigte sich in der Aggregometrie eine deutliche Abnahme der Aggregation, während in der Durchflusszytometrie bei Verwendung von Convulxin als Induktor und Losartan als Inhibitor eine Zunahme der Phosphorylierung zu beobachten war. An dieser Stelle ergibt sich die Anknüpfung weiterer Forschungsaktivitäten, u.a. um zu klären, warum Losartan im Vergleich zu den anderen Sartanen in der Durchflusszytometrie zu einer Zunahme der Phosphorylierung bei Verwendung von Convulxin als Induktor führt.

In einem weiteren Versuchsaufbau konnte die starke Inhibition der SRC-Phosphorylierung durch Verwendung von Telmisartan *in vitro* auch im Patientenblut nachgewiesen werden. Es wurden die durchflusszytometrischen Ergebnisse von drei gesunden Spendern, die kein Telmisartan einnahmen, mit Blut eines Patienten, der Telmisartan einnahm, verglichen. Verwendet wurden die Induktoren Convulxin, Kollagen und U46619 mit der SRC-Kinase. Durch die Aktivierung mithilfe von Induktoren, war bei allen drei gesunden Spendern eine hohe Phosphorylierung nachweisbar. Nach Inhibition mit Telmisartan zeigte sich bei allen drei Spendern mit unterschiedlichen Induktoren eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung. Der Hintergrund war, dass das Patientenblut mit der oralen Einnahme von Telmisartan, bei dem identischen Versuchsaufbau mit Zugabe der gleichen Induktoren eine Inhibition der Phosphorylierung der SRC Kinase zeigt. Bei Convulxin war die Inhibition *in vivo* ähnlich der im Versuch, bei dem Telmisartan *in vitro* hinzugegeben wurde. Auch bei Kollagen war eine Inhibition durch die orale Einnahme vorhanden. Medikamentenspiegel im Blut nachweisbar. Nur bei Verwendung des Induktors U46619 zeigte sich bei dem verwendeten Patientenblut keine Inhibition.

Da diese Versuche mit einer geringen Anzahl (n=3) von Spendern und nur einem Patienten durchgeführt wurden und sich dazu eine deutliche Spenderindividualität bei der Aggregometrie zeigte, besteht hier eine weitere Möglichkeit in Zukunft durch eine größere Stichprobe diese Beobachtung weiter zu verfolgen. Trotz der kleinen Stichprobe soll an dieser Stelle die Tendenz genannt werden, dass Telmisartan oral eingenommen im Patienten eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion zur Folge haben kann. Es stellt sich die Frage, ob durch diese Medikamente eine bisher unbekannte Blutungsneigung besteht, oder der in der Literatur beschriebene protektive Effekt zur Verhinderung von Progression kardiovaskulärer Erkrankungen überwiegt (63). Neben Medikamenten können auch Nahrungsergänzungsmittel, Genussmittel sowie auch einzelne Nahrungsbestandteile die Thrombozytenfunktion beeinflussen (68). Kann das Gleichgewicht durch mehrere Faktoren beispielsweise die zusätzliche Gabe von Telmisartan zu einer Entgleisung führen? Diesbezüglich zeigen die Befunde weiteres Potenzial zukünftiger Forschung mit einer größeren Stichprobe an Spendern und Patienten, die verschiedene Medikamente der Sartan-Medikamentenfamilie einnehmen. Dadurch kann die oben genannte Tendenz erhärten oder widerlegen werden, sowie Antworten auf die entstandenen Fragen geben.

Der PAR1-Rezeptor wurde als zweites betrachtet. Als Inhibitor existiert das als Medikament zugelassene Vorapaxar (26). Am PAR1-Rezeptor bindet Thrombin, somit agiert Vorapaxar als Antagonist am PAR1-Rezeptor und verhindert die Bindung von Thrombin an dem selbigen. In der folgenden Signalkaskade nach Thrombinbindung spielt die von uns beobachtete AKT-Kinase eine wichtige Rolle (24). Vorapaxar in Kombination mit Acetylsalicylsäure wird klinisch in der Sekundärprophylaxe bei Zustand nach Myokardinfarkt zur Reduktion von atherothrombotischer Ereignissen verwendet. Vorapaxar kann bei Bedarf zusätzlich mit Clopidogrel in der Therapie ergänzt werden. Eine Gefahr durch diese Therapie besteht in dem erhöhten Blutungsrisiko, besonders die Gefahr mit einem doppelt so hohen absolutem Risiko von Hirnblutung sollte beachtet werden (69, 70). Bei den Versuchen im Durchflusszytometer, bei denen TRAP-6 und U46619 als Induktor und die Phosphorylierung der AKT-Kinase detektiert wurde, während der PAR1 Rezeptorinhibitor Vorapaxar hinzugeben wurde, kam es nicht zu den erwarteten Ergebnissen. Die Annahme war, dass es wie bei den zuvor Untersuchten Sartanen mit der SRC-Kinase zu einer Abnahme der Phosphorylierung der Kinase kommt. Hingegen der Hypothese stieg die Phosphorylierung bei beiden Induktoren. Je höher

die *in vitro* Konzentration von Vorapaxar, desto stärker die Phosphorylierung. Auch hier wurde vergleichend die Aggregometrie nach Born durchgeführt. Hier zeigte sich bei der Induktion mit TRAP-6 ein entgegengesetztes Bild. Die Aggregation nahm mit steigender Vorapaxar-Konzentration ab. Das zeigt, dass Vorapaxar gezielt den PAR1-Rezeptor inhibiert und TRAP-6 somit keine Aggregation in der Aggregometrie induziert (26).

Im Gegenzug ist es nachvollziehbar, dass es durch U46619 in der Aggregometrie bei Zusatz des PAR1-Rezeptorinhibitors Vorapaxar trotzdem zu einer Aggregation kommt, weil U46619 nicht über den PAR1-Rezeptor bindet, sondern über den Thromboxane A₂-Rezeptor die Aggregation induziert (25, 26).

An dieser Stelle bleibt ungeklärt, warum es trotz Inhibition durch Vorapaxar zu einem Anstieg der Phosphorylierung der AKT-Kinase kommt. Hier könnten Verstärkerschleifen in den eng verbundenen Signalwegen eine Rolle spielen.

Die Durchflusszytometrie zeigte sich als guter Versuchsaufbau zur Detektierung der Phosphorylierung der drei Kinasen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann es zukünftig zu einer besseren Einschätzung von funktionellen Defekten kommen und könnte somit einen wichtigen Schritt in Richtung personalisierter Medizin darstellen. So können potenzielle Effekte der Hemmung der Thrombozytenaggregation wie sie z.B. für die Sartane beschrieben wurden, individuell mittels Durchflusszytometrie detektiert und klassifiziert werden.

Um die Frage, wie externe Labore von der Expertise dieser durchflusszytometrischen Untersuchung profitieren beantworten zu können, wurden zur Überprüfung Lagerungsversuche durchgeführt, ob es möglich ist, Proben extern aufzuarbeiten und dann in ein Speziallabor zur Auswertung zu versenden. Lagerungsversuche konnten die Dauer eines bei Zentralisierung der Methode zu erwartendem Transport imitieren. Der durchgeführte Versuchsaufbau zeigte, dass eine sinnvolle Auswertung der Daten in diesem Versuchsaufbau nur an Tag 0 möglich war. In der weiteren Lagerungszeit bei 4 °C an Tag 1, 3 und 7, waren immer weniger Thrombozyten nachweisbar. Nach Beurteilung des verwendeten Fixativs (PFA 0,5%) ist es möglich, dass durch eine andere Konzentration oder ein anderes Reagenz, z.B. Formaldehyd (71), eine bessere Lagerung und damit ein Versand von Proben möglich ist. So konnte bereits durch Dvlatova et. al. gezeigt werden, dass bei der Diagnostik der milden

Thrombozytenfunktionstörungen die Fixierung der Proben vor dem Versand eine Möglichkeit darstellt, auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (72). Jedoch kann eine erhöhte Konzentration des Fixationsmediums auch die Thrombozyten zerstören. Hier können Verdünnungsreihen mit verschiedenen Fixativen durchgeführt werden, um die optimale Konzentration zu finden. Ähnlich den Vorteilen, die bei dem Versand von Blutaussstrichen (14) entstehen, könnte mit Hilfe einer Fixation von Blutproben zur durchflusszytometrischen Untersuchung vor dem Versand mit geringsten Blutmengen gearbeitet werden und eine Zentralisierung der Diagnostik erreicht werden.

Zusammenfassend zeigt sich sowohl mit der Mikroskopie, als auch mit der Durchflusszytometrie die Möglichkeit, Thrombozyten besser zu charakterisieren und durch den einfachen Versand von Ausstrichen, bzw. dem Versand von bereits fixierten Blutproben die Möglichkeit zentralisiert Thrombozyten zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ghoshal, K.; Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 2014, (781857), S. 1-16.
2. Hartley, PS. (2007). Platelet senescence and death. *Clinical Laboratory*, 53(3-4), S. 157-166.
3. Thomas, MR.; Storey RF. (2015). The role of platelets in inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 114(03), S. 449-458.
4. Kieffer, N.; Guichard, J.; Farcet, JP.; Vainchenker, W.; Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry*, 164(1), S. 189-195.
5. Weyrich, AS.; Schwertz, H.; Kraiss, LW.; Zimmermann, GA. (2009). Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), S. 241-246.
6. Covic, L.; Gresser, AL.; Kuliopulos, A. (2000). Biphasic Kinetics of Activation and Signaling for PAR1 and PAR4 Thrombin Receptors in Platelets. *Biochemistry*, 39 (18), S. 5458-5467.
7. Stalker, T.J.; Newman, DK.; Ma, P.; Wannemacher, KM.; Brass, LF. (2012). Platelet signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, (210), S. 59-85.
8. Gawaz, M. (1999). *Das Blutplättchen*. Stuttgart: Thieme.
9. Colman, RW.; Marder, VJ.; Clowes, AW.; Georg, JN.; Goldhaber, SZ. (2006). *Overview of platelet structure and function. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 5. Auflage. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
10. Jurk, K.; Kehrel, BE. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(4), S. 381-392.
11. D'Atri, LP.; Schattner, M. (2017). Platelet toll-like receptors in thrombinflammation. *Frontiers in Bioscience*, 22, S.1867-1883.
12. Zeidler, C.; Welte, K. (2006). Kongenitale Thrombozytopenien. In: Gadner, H.; Gaedicke, G.; Niemeyer, C.; Ritter, J., *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie* (S. 352-356). Heidelberg: Springer-Verlag.
13. Simon, D.; Kunicki, T.; Nugent, D. (2008). Platelet function defects. *Haemophilia*, 14 (6), S. 1240-1249.

14. Greinacher, A.; Pecci, A.; Kunishima, S.; Althaus, K.; Nurden, P.; Balduini, CL.; Bakchoul, T. (2017). Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *Thrombosis and Haemostasis*, 15, S. 1511-1521.
15. Harrison, P.; Frelinger, AL.; Furman, MI.; Michaelson, AD. (2007). Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thrombosis Research*, 120 (3), S. 323-336.
16. Linnemann, B.; Schwoneberg, J.; Mani, H.; Prochnow, S.; Lindhoff-Last, E. (2008). Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *Thrombosis and Haemostasis*, 6 (4), S. 677-683.
17. Born, GVR.; Cross, MJ. (1963). The aggregation of blood platelets. *The Journal of Physiology*, 168 (1), S. 178-195.
18. Born, GV. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosin disphosphate and its reversal. *Nature*. 194, S. 927-929.
19. Simeoni, I.; Stephens, JC.; Hu, F.; Deevi, SV.; Megy, K.; Bariana, TK.; Lentaigne, C.; Schulman, S.; Sivapalaratnam, S.; Vries, MJ.; Westbury, SK.; Greene, D.; Papadia, S.; Alessi, MC.; Attwood, AP.; Ballmaier, M.; Baynam, G.; Bermejo, E.; Bertoli, M.; Bray, PF.; Bury, L.; Cattaneo, M.; Collins, P.; Daugherty, LC.; Favier, R.; French, DL.; Furie, B.; Gattens, M.; Germeshausen, M.; Ghevaert, C.; Goodeve, AC.; Guerrero, JA.; Hampshire, DJ.; Hart, DP.; Heemskerk, JW.; Henskens, YM.; Hill, M.; Hogg, N.; Jolley, JD.; Kahr, WH.; Kelly, AM.; Kerr, R.; Kostadima, M.; Kunishima, S.; Lambert, MP.; Liesner, R.; López, JA.; Mapeta, RP.; Mathias, M.; Millar, CM.; Nathwani, A.; Neerman-Arbez, M.; Nurden, AT.; Nurden, P.; Othman, M.; Peerlinck, K.; Perry, DJ.; Poudel, P.; Reitsma, P.; Rondina, MT.; Smethurst, PA.; Stevenson, W.; Szkotak, A.; Tuna, S.; van Geet, C.; Whitehorn, D.; Wilcox, DA.; Zhang, B.; Revel-Vilk, S.; Gresele, P.; Bellissimo, DB.; Penkett, CJ.; Laffan, MA.; Mumford, AD.; Rendon, A.; Gomez, K.; Freson, K.; Ouwehand, WH.; Turro, E. (2016). A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*, 127 (23), S. 2791-2803.

20. Downes, K.; Megy, K.; Duarte, D.; Vries, M.; Gebhart, J.; Hofer, S.; Shamardina, O.; Deevi, SVV.; Stephens, J.; Mapeta, R.; Tuna, S.; Al Hasso, N.; Besser, MW.; Cooper, N.; Daugherty, L.; Gleadall, N.; Greene, D; Haimel, M.; Martin, H.; Papadia, S.; Revel-Vilk, S.; Sivapalaratnam, S.; Symington, E.; Thomas, W.; Thys, C.; Tolios, A.; Penkett, CJ.; NIHR, BioResource.; Ouwehand, WH.; Abbs, S.; Laffan, MA.; Turro, E.; Simeoni, I.; Mumford, AD.; Henskens, YMC.; Pabinger, I.; Gomez, K.; Freson, K. (2019). Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*, 134 (23), S. 2082-2091.
21. Lentaigne, C.; Freson, K.; Laffan, MA.; Turro, E.; Ouwehand, WH. (2016). Inherited platelet disorders: toward DANN-based diagnosis. *Blood*, 127(23), S. 2814-2823.
22. Senis, YA.; Mazharian, A.; Mori, J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*, 124 (13), S. 2013-2024.
23. Chen, X.; Yan, R.; Zhou, K.; Li, X.; Zhang, Y.; Liu, C.; Jiang, M.; Ye, H.; Meng, X.; Pang, N.; Zhao, L.; Liu, J.; Xiao, W.; Hu, R.; Cui, Q.; Zhong, W.; Zhao, Y.; Zhu, M.; Lin, A.; Ruan, C.; Dai, K. (2018). Akt-mediated platelet apoptosis and its therapeutic implications in immune thrombocytopenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (45), S. E10682-E10691.
24. Reséndiz, JC.; Kroll, MH.; Lassila, R. (2007). Protease-activated receptor-induced Akt activation – regulation and possible function. *Thrombosis and Haemostasis*, 5 (12), S. 2484-2483.
25. Taylor, L.; Vasudevan, SR.; Jones, Cl.; Gibbins, JM.; Churchill, GC.; Campbell, RD.; Coxon, CH. (2014). Discovery of Novel GPVI Receptor Antagonists by Structure-Based Repurposing. *PLoS ONE*, 9(6).
26. Grover, SP.; Bergmeier, W.; Mackman, N. (2018). Platelet Signaling Pathways and New Inhibitors. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 38 (4), S. 28-35.
27. Hashemzadeh, M.; Arreguin, JM.; Roberts, T.; Movahed, MR. (2015). A Novel Inhibitor of Protease-activated Receptor 1: A Review of Chemical Structure and Mode of Action. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 16 (1), S. 68-73.

28. Hawes, BE.; Zhai, Y.; Hesk, D.; Wirth, M.; Wie, H.; Chintala, M.; Seiffert, D. (2015). In vitro pharmacological characterization of vorapaxar, a novel platelet thrombin receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, 762, S. 221-228.
29. Li, S.; Tarlac, V.; Hamilton, J. R. (2019). Using PAR4 Inhibition as an Anti-Thrombotic Approach: Why, How, and When?. *International journal of molecular sciences*, 20 (22), S. 5629.
30. Wilson, SJ.; Ismat, FA.; Wang, Z.; Cerra, M.; Narayan, H.; Raftis, J.; Gray, TJ.; Connell, S.; Garonzik, S.; Ma, X.; Yang, J.; Newby, DE. (2018). PAR4 (Protease-Activated Receptor 4) Antagonism With BMS-986120 Inhibits Human Ex Vivo Thrombus Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38 (2), S. 448-456.
31. Agyeman, AA.; Ofori-Asenso, R. (2015). Perspective: Does personalized medicine hold the future for medicine? *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7 (3), S. 239-244.
32. Mathur, A.; Sutton, J. (2017). Personalized medicine could transform healthcare. *Biomedical Reports*, 7 (1), S. 3-5.
33. Haus, J. (2014). *Optische Mikroskopie (S.163-173)*. Weinheim: Wiley-VCH.
34. Sack, U.; Tárnok, A.; Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie (S.27-70)*. Basel: Karger.
35. Zaninetti, C.; Greinacher, A. (2020). Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear. *Journal of clinical medicine*, 9(2), S. 539.
36. Gitz, E.; Koekman, CA.; van den Heuvel, DJ.; Deckmyn, H.; Akkerman, JW.; Gerritsen, HC.; Urbanus, RT. (2012). Improved platelet survival after cold storage by prevention of glycoprotein Iba clustering in lipid rafts. *Haematologica*, 97(12), S. 1873-1881.
37. Cuenca-Zamora, EJ.; Ferrer-Marín, F.; Rivera, J.; Teruel-Montoya, R. (2019). Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. *International journal of molecular sciences*, 20(14), S. 3484.

38. Streif, W.; Knöfler, R. (2018). Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen – Thrombozytopathien. *Leitlinie-Thrombozytopathien*, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, unter:
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/086-003I_S2k_Diagnostik_Thrombozytenfunktionsstoerungen_Thrombozytopathien_2018-09.pdf. Zugegriffen: 11.03.2022.
39. Adewoyin, AS.; Nwogoh, B. (2014). Peripheral blood film – a review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 12 (2), S. 71-79.
40. Sivapalaratnam, S.; Collins, J.; Gomez, K. (2017). Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *British Journal of Haematology*, 179(3), S. 363-376.
41. Bastida, JM.; Lozano, ML.; Benito, R.; Janusz, K.; Palma-Barqueros, V.; Del Rey, M.; Hernández-Sánchez, JM.; Riesco, S.; Bermejo, N.; González-García, H.; Rodríguez-Alén, A.; Aguilar, C.; Sevivas, T.; López-Fernández, MF.; Marneth, AE.; van der Reijden, BA.; Morgan, NV.; Watson, SP.; Vicente, V.; Hernández-Rivas, JM.; González-Porrás, JR. (2018). Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica*, 103(1), S.148-162.
42. Jurk, K.; Shiravand, Y. (2021). *Platelet Phenotyping and Function Testing in Thrombocytopenia*. *Journal of clinical medicine*, 10(5), S. 1114.
43. Michelson, A. D. (2009). *Methods for the measurement of platelet function*. *The American journal of cardiology*, 103(3 Suppl), S. 20A-26A.
44. Schmitz, G.; Rothe, G.; Ruf, A.; Barlage, S.; Tschöpe, D.; Clemetson, K. J.; Goodall, A. H.; Michelson, A. D.; Nurden, A. T.; Shankey, T. V. (1998). *European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function*. *Thrombosis and haemostasis*, 79(5), S. 885-896.
45. Pasalic, L.; Pennings, G. J.; Connor, D.; Campbell, H.; Kritharides, L.; Chen, V. M. (2017). *Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1646, S. 369-389.
46. Fouassier, M.; Babuty, A.; Debord, C.; Béné, M. C. (2020). *Platelet immunophenotyping in health and inherited bleeding disorders, a review and practical hints*. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 98(6), S. 464-475.

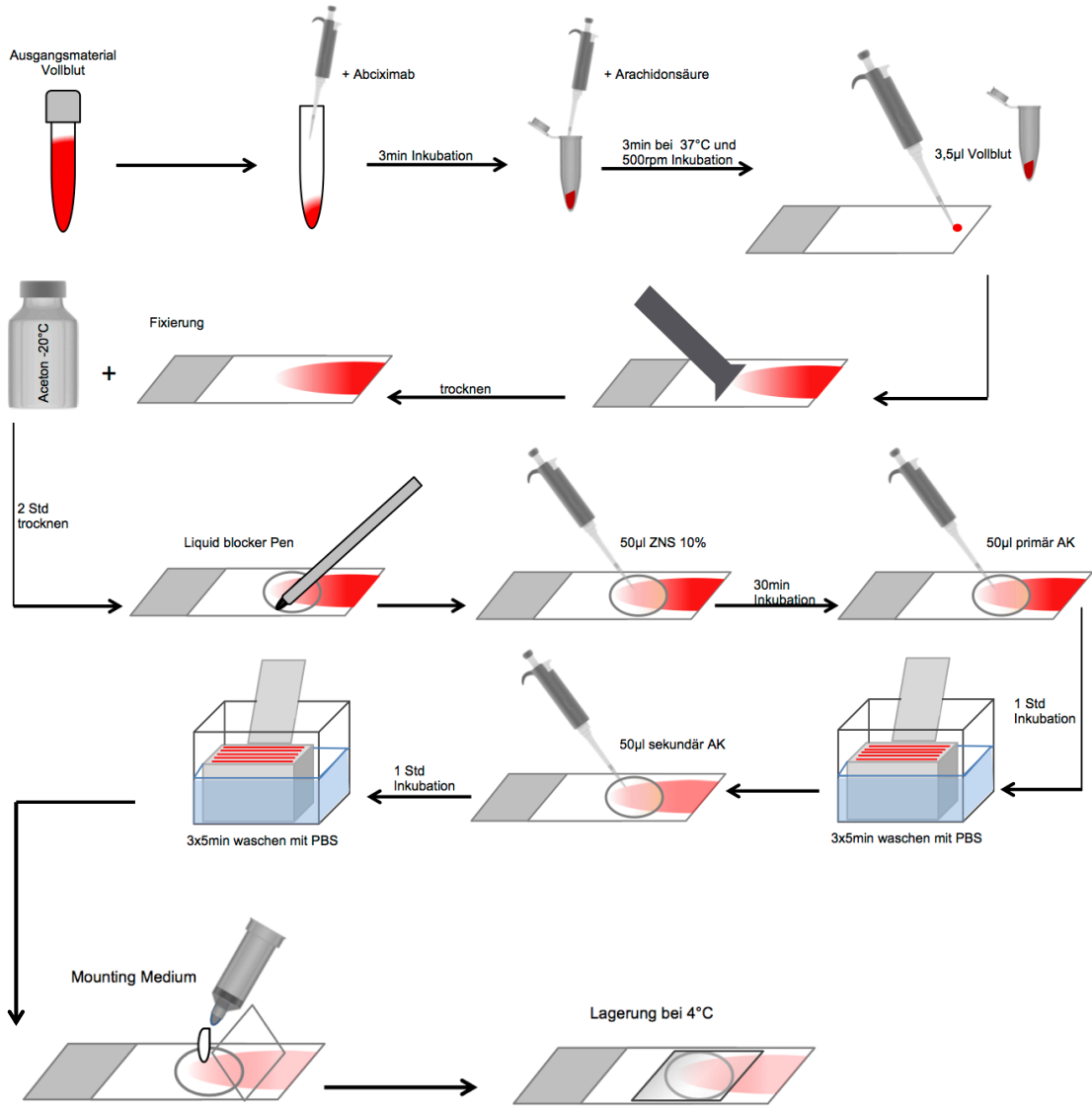
47. Nurden, P.; Stritt, S.; Favier, R.; Nurden, A. T. (2021). *Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. Haematologica, 106(2), S. 337-350.*
48. O'Brien, K. A.; Stojanovic-Terpo, A.; Hay, N.; Du, X. (2011). *An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. Blood, 118(15), S. 4215-4223.*
49. Momi, S.; Canino, J.; Vismara, M.; Galgano, L.; Falcinelli, E.; Guglielmini, G.; Taranta, G. C.; Guidetti, G. F.; Gresele, P.; Torti, M.; Canobbio, I. (2022). *Proline-rich tyrosine kinase Pyk2 regulates deep vein thrombosis. Haematologica, 107(6), S. 1374-1383.*
50. Faria, A.; Andrade, S. S.; Peppelenbosch, M. P.; Ferreira-Halder, C. V.; Fuhler, G. M. (2021). *The role of phospho-tyrosine signaling in platelet biology and hemostasis. Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research, 1868(3), S. 118927.*
51. Senis, YA.; Nagy, Z.; Mori, J.; Lane, S.; Lane, P. (2021). Platelet Src family kinases: A tale of reversible phosphorylation. *Research and practice in thrombosis and haemostasis, 5(3), S. 376-389.*
52. Badolia, R.; Kostyak, JC.; Dangelmaier, C.; Kunapuli, SP. (2017). Syk Activity Is Dispensable for Platelet GP1b-IX-V Signaling. *International journal of molecular sciences, 18(6), S. 1238.*
53. Moroi, AJ.; Watson, SP. (2015). Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochemical pharmacology, 94(3), S. 186-194.*
54. Abu-Eid, R.; Ward, FJ. (2021). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: A therapeutic strategy in COVID-19 patients. *Immunology letters, 240, S. 1-8.*
55. Harbi, MH.; Smith, CW.; Nicolson, P.; Watson, SP.; Thomas, MR. (2021). Novel antiplatelet strategies targeting GPVI, CLEC-2 and tyrosine kinases. *Platelets, 32(1), S. 29-41.*
56. Paik J. (2021). Fostamatinib: A Review in Chronic Immune Thrombocytopenia. *Drugs, 81(8), S. 935-943.*
57. Nieswandt, B.; Watson, SP. (2002). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood, 102 (2), S. 449-461.*

58. De Candia, E.; Hall, SW.; Rutella, S.; Landolfi, R.; Andrews, RK.; De Cristofaro, R. (2001). Binding of Thrombin to Glycoprotein Ib Accelerates the Hydrolysis of Par-1 on Intact Platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (7), S. 4692-4698.
59. Van Liefde, I.; Vauquelin, G. (2009). Sartan-AT1 receptor interactions: In vitro evidence for insurmountable antagonism and inverse agonism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302 (2), S. 237-243.
60. Jiang, P.; Loyau, S.; Tchitchinadze, M.; Ropers, J.; Jondeau, G.; Jandrot-Perrus, M. (2015). Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan. *PloS one*, 10(6), e0128744.
61. Xu, DF.; Liu, YJ.; Mao, YF.; Wang, Y.; Xu, CF.; Zhu, XY.; Jiang, L. (2021). Elevated angiotensin II induces platelet apoptosis through promoting oxidative stress in an AT1R-dependent manner during sepsis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(8), S. 4124-4135.
62. Gromotowicz-Poplawska, A.; Nazarko-Sadowska, J.; Chabielska, E. (2019). Losartan metabolite EXP3174 reduces the weight of formed thrombus in 2K1C hypertensive rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 70(3).
63. Marinšek, M.; Sinkovič, A. (2016). Ramipril and Losartan Exert a Similar Long-Term Effect upon Markers of Heart Failure, Endogenous Fibrinolysis, and Platelet Aggregation in Survivors of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Single Centre Randomized Trial. *BioMed research international*, 2016, 9040457.
64. Burnier M. (2009). Telmisartan: a different angiotensin II receptor blocker protecting a different population?. *The Journal of international medical research*, 37(6), S. 1662-1679.
65. Michel, MC.; Foster, C.; Brunner, HR.; Liu, L. (2013). A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacological reviews*, 65(2), S. 809-848.

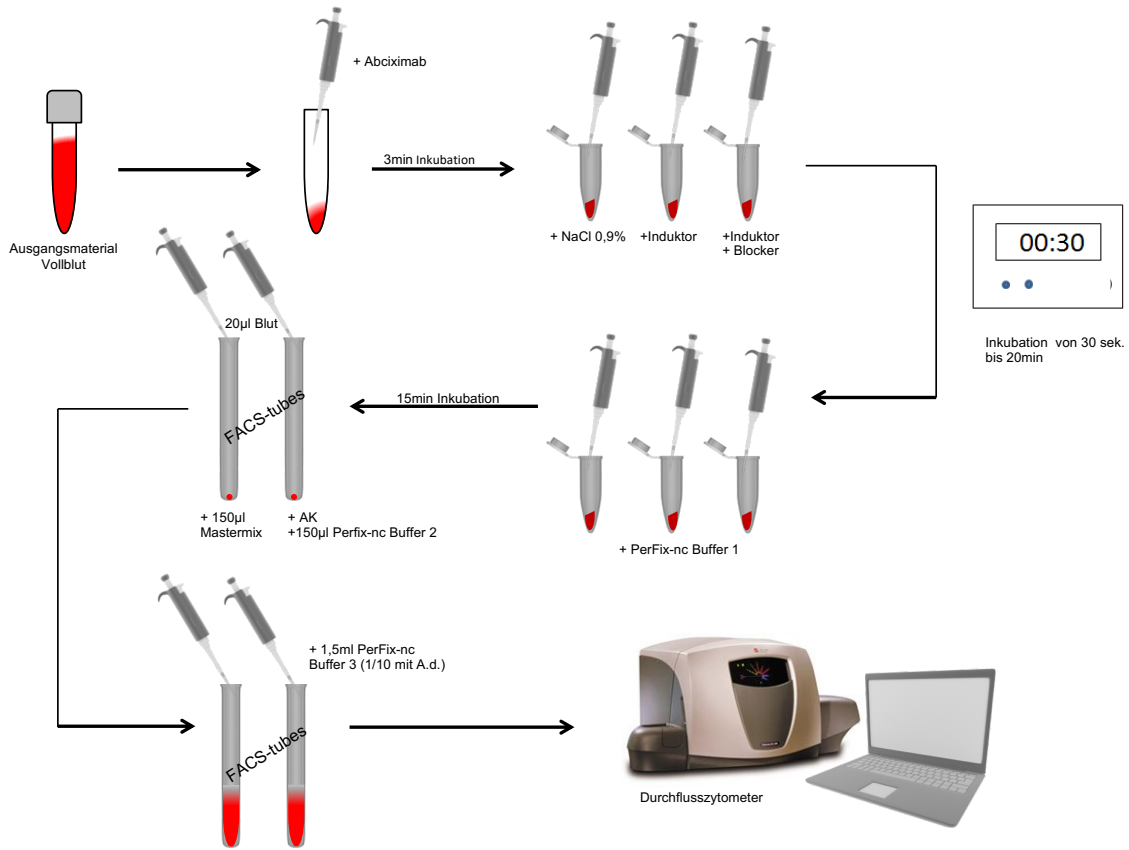
66. Cattaneo, M.; Cerletti, C.; Harrison, P.; Hayward, CP.; Kenny, D.; Nugent, D.; Nurden, P.; Rao, AK.; Schmaier, AH.; Watson, SP.; Lussana, F.; Pugliano, MT.; Michelson, AD. (2013). Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 10.1111/jth.12231. Advance online publication.
67. Dawood, BB.; Lowe, GC.; Lordkipanidzé, M.; Bem, D.; Daly, ME.; Makris, M.; Mumford, A.; Wilde, JT.; Watson, SP. (2012). Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood*, 120(25), S.5041-5049.
68. Georg, JN.; Shattil, SJ. (1991). The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *The New England Journal of Medicine*, 324(1), S. 27-39.
69. Krantz, MJ.; & Kaul, S.; (2015). Secondary prevention of cardiovascular disease with vorapaxar: a new era of 3-drug antiplatelet therapy?. *JAMA internal medicine*, 175(1), S. 9-10.
70. Morrow, DA.; Braunwald, E.; Bonaca, MP.; Ameriso, SF.; Dalby, AJ.; Fish, MP.; Fox, KA.; Lipka, LJ.; Liu, X.; Nicolau, JC.; Ophuis, AJ.; Paolasso, E.; Scirica, BM.; Spinar, J.; Theroux, P.; Wiviott, SD.; Strony, J.; Murphy, SA.; & TRA 2P–TIMI 50 Steering Committee and Investigators (2012). Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *The New England journal of medicine*, 366(15), S. 1404-1413.
71. Hu, H.; Daleskog, M.; Li, N. (2000). Influences of fixation on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thrombosis Research*, 100 (3), S. 161-166.
72. Dovlatova, N.; Lordkipanidzé, M.; Lowe, GC.; Dawood, B.; May, J.; Heptinstall, S.; Watson, SP.; Fox, SC.; UK GAPP Study Group (2014). Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 12(5), S. 660-665.

7. Anhang

7.1 Ablaufschema Färbung Blutausstriche



7.2 Ablaufschema Durchflusszytometrie



7.3 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Greinacher für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Vergabe des interessanten Themas bedanken. Er war immer ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der in mir immer wieder das Interesse für neue Blickwinkel weckte. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. med. Karina Althaus, die mich in jeder Phase meiner Arbeit bestens unterstützt hat, auch als sie schon nach Tübingen gezogen ist. Wir haben gemeinsam viele schöne und interessante Stunden vor dem Fluoreszenzmikroskop verbracht. Ohne ihre Hilfe wäre das nicht möglich gewesen. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen des Thrombozytenlabors, besonders Carmen Blumentritt, die mir die Färbung beigebracht hat. Dem ganzen Labor-Team der Transfusionsmedizin im DZ7 möchte ich auch danken. Es war eine schöne Zeit, in der ich viele tolle Menschen kennenlernen durfte. Jeder war jederzeit bereit, zu helfen oder offen für Fragen, auch wenn es häufiger ein und dieselbe Frage war. Nicht nur, wenn das Durchflusszytometer mal wieder nicht das machen wollte, was ich wollte, war Jan Wesche immer eine unentbehrliche Hilfe. Er war immer Ansprechpartner und war fachlich eine große Hilfe. Alle gemeinsam haben dieses Jahr für mich zu einem besonderen, schönen und fachlich bereichernden Jahr gemacht.

Zu guter Letzt danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die die gesamte Zeit hinter mir standen und mich jederzeit unterstützt haben und immer aufmunternde Worte für mich hatten. Ein großer Dank gilt auch Christian Hofmeister, der mich oft wieder aufgebaut hat sowie Anne Wohlgemuth für ihre Unterstützung und ihr immer offenes Ohr.