

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Analyse der Interaktion zwischen Thrombozyten und Erythrozyten während der Thrombusbildung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Saskia Zey

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Zweitgutachter/in: PD Dr. med. Amin Polzin

Für meine Eltern!

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Cristoph Klatt, Irena Krüger, Saskia Zey, Kim-Jürgen Krott, Martina Spelleken, Nina Sarah Gowert, Alexander Oberhuber, Lena Pfaff, Wiebke Lückstädt, Kerstin Jurk, Martin Schaller, Hadi Al-Hasani, Jürgen Schrader, Steffen Massberg, Konstantin Stark, Hubert Schelzig, Malte Kelm, and Margitta Elvers, 2018, Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 128 Number 9: 3906–3925

Zusammenfassung

Die Entwicklung arterieller Thromben spielt in der Pathogenese verschiedener kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt und Schlaganfall eine wichtige Rolle. Dabei ist die Rolle von Erythrozyten im Rahmen der Thrombusbildung nicht vollständig geklärt. Erythrozyten können eine passive Rolle durch Beeinflussung der Rheologie spielen. Des Weiteren setzen Erythrozyten verschiedene Moleküle wie z.B. ADP, ATP oder NO frei, die die Aktivität von Thrombozyten beeinflussen können und exponieren Phosphatidylserine an ihrer Oberfläche, die eine Beteiligung von Erythrozyten an der Thrombinbildung während der Hämostase vermuten lassen.

Diese Arbeit zeigt *in vitro*, dass Erythrozyten essentiell für die Thrombusbildung sind und eine aktive Rolle im Rahmen der Thrombus-Bildung durch den Fas-Ligand(FasL)-Fas-Rezeptor (FasR)-Signalweg einnehmen. Flusskammer-Experimente mit humanem Vollblut gesunder Spender demonstrieren die Bedeutung der Erythrozyten für die Hämostase und okklusive Thrombusbildung, da es zu einem verspäteten Kapillarverschluss in plättchenreichem Plasma im Vergleich zu Vollblut kam. Weitere Analysen zeigten einen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Thrombozyten und Erythrozyten über den FasL-FasR-Signalweg, von dem bekannt ist, dass er zu einer PS-Exposition und anschließenden Apoptose in den Zielzellen führt. Der Nachweis des FasR auf der Erythrozytenmembran erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines *Western Blots*. Die FasL-Expression nach Aktivierung von Thrombozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Um zu untersuchen, ob der FasR-FasL-vermittelte Zell-Zell-Kontakt zwischen Thrombozyten und Erythrozyten eine Rolle für die PS-Exposition auf der Erythrozytenmembran während der Thrombus-Bildung spielt, wurden der FasR und FasL mit Antikörpern blockiert. Bei der Blockierung des erythrozytären FasR unter statischen Bedingungen wurde eine reduzierte PS-Exposition gemessen. Außerdem wurde durch die Blockierung des FasR eine reduzierte Thrombusbildung in der Flusskammer nachgewiesen, wodurch die Bedeutung des FasR *ex vivo* deutlich wird. Bei der Blockierung des FasL mit dem *Decoy receptor 3* (DcR3) zeigte sich ebenfalls eine reduzierte PS-Exposition auf der Erythrozytenmembran unter statischen Bedingungen. Der DcR3 verhindert durch die kompetitive Bindung an den membrangebundenen FasL eine FasL-FasR-Interaktion. Dementsprechend zeigte sich auch eine verminderte Thrombusbildung unter Flussbedingungen bei der Behandlung von Vollblut mit DcR3. In einem weiteren Experiment war die Thrombozytenadhäsion auf immobilisiertem FasR-Protein durch eine Thrombozytenaktivierung gesteigert, jedoch bei einer Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem DcR3, der die FasR-FasL-Interaktion blockiert, reduziert. Um zu untersuchen, ob die FasR-FasL-vermittelte PS-Exposition auf Erythrozyten auch unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt, wurden humane arterielle Thromben von Patienten, die eine Thrombektomie erhielten, analysiert. Die FasL-Expression auf der Thrombozytenmembran sowie die PS-Exposition auf Erythrozyten der Patiententhromben war im Vergleich zu frisch isolierten ruhenden und aktivierten Thrombozyten und Erythrozyten gesunder Spender erhöht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Erythrozyten eine essentielle Rolle für die Thrombusbildung und -stabilisierung durch den FasR-FasL-Signalweg spielen, der vermutlich auch eine wichtige Rolle unter pathophysiologischen Bedingungen hat.

Abstract

Thrombus formation plays an important role in the pathogenesis of many cardio- and cerebrovascular diseases such as myocardial infarction or stroke. The role of red blood cells (RBC) during thrombus formation is not completely understood. RBCs have been described to play a passive role in hemostasis by influencing rheology. Moreover, RBCs release molecules such as ATP, ADP and NO that might alter platelet activation and are known to expose phosphatidylserine (PS) on their membrane suggesting a contribution of RBCs to thrombin generation.

This in vitro study shows that RBCs are essential for effective thrombus formation and play an active role in supporting thrombus formation by a completely new mechanism including Fas ligand (FasL) and Fas receptor (FasR) signaling.

Flow chamber experiments with whole blood from healthy volunteers demonstrate the importance of RBCs for hemostasis and occlusive thrombus formation because full occlusion of a collagen-coated capillary was delayed when platelet-rich plasma was used compared to whole blood.

Further analysis revealed a direct cell contact between platelets and RBCs via the FasL and FasR pathway known to induce the exposure of PS on the membrane and subsequent apoptosis of target cells. First, FasR expression at the membrane of RBCs was confirmed by western blot analyses. Second, FasL externalization was detected at the platelet plasma membrane upon platelet activation using flow cytometry.

To investigate if FasL-FasR mediated cell-cell contacts between platelets and RBCs play a role in initiating PS exposure at the RBCs membrane during thrombus formation, we blocked FasR and FasL by antibody treatment. When we blocked FasR only on RBCs under static conditions, significantly reduced PS exposure was detected. Moreover, FasR blocking reduced thrombus formation in flow chamber experiments providing evidence for the importance of FasR under more physiological conditions. When we blocked FasL with Decoy receptor 3 (DcR3) under static conditions, PS exposure at the RBC membrane was significantly reduced as well. DcR3 binds to FasL and prevents FasR-FasL interactions by competitive binding to membrane bound FasL. Accordingly, thrombus formation was significantly reduced under flow conditions when whole blood was treated with DcR3. In another experiment, platelet adhesion on immobilized FasR was increased upon activation of platelets but reduced when platelets were pre-treated with DcR3 to block FasL-FasR interactions.

To investigate whether FasL-FasR-mediated PS exposure of RBCs is relevant under pathological conditions, we analyzed human arterial thrombi from patients who underwent surgical thrombectomy. FasL externalization at the platelet membrane as well as PS exposure of RBCs isolated from patients' thrombi was enhanced compared to freshly isolated resting and activated platelets and RBCs from healthy donors.

Taken together, these results reveal a significant role of RBCs for thrombus formation and stabilization by the FasL-FasR signaling that might play an important role under pathological conditions.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR-Chip	Atheroma-Chip
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bindepuffer
BSA	Bovines Serumalbumin
βTG	β-Thromboglobulin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD36	Glykoprotein IV
CD95	Fas-Rezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRP	Collagen-related-Protein
CTI	<i>corn trypsin inhibitor</i>
CXCI16	<i>scavenge receptor for phosphatidylserine and oxidized low density lipoprotein</i>
Cy5	Cyanin 5
C57BL/6J	“black 6” Mauslinie
DAK	Diacylglycerol
DcR3	<i>Decoy receptor 3</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozyten-Konzentrat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , Antikörper-basiertes Nachweisverfahren
Ery.	Erythrozyten
F	Faktor
F II	Prothrombin, Faktor II
F IIa	Thrombin, aktivierter Faktor II
F V	Proakzelerin, Faktor V
F Va	aktiviertes Proakzelerin, aktivierter Faktor V
F VII	Proconvertin, Faktor VII
F VIIa	Convertin, aktivierter Faktor VII
F VIII	antihämophiles Globulin A, Faktor VIII
F IX	Christmas-Faktor, antihämophiles Globulin B, Faktor IX
F X	Stuart-Power-Faktor, Faktor X
F Xa	aktivierter Stuart-Power-Faktor, aktivierter Faktor X
F XI	Rosenthal-Faktor, Faktor XI
F XII	Hagemann-Faktor, Faktor XII
F XIII	Fibrinstabilisierender Faktor, Faktor XIII
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FFP	<i>fresh frozen plasma</i> (gefrorenes Frischplasma)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht

GP	Glykoprotein
IP ₃	Inositoltriphosphat
ITAM	<i>immunreceptor tyrosine based activation domain</i>
k.A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton
M	Molar
MeOH	Methanol
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
min.	Minuten
n	Anzahl durchgeführter Messungen
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PF 4	Plättchen-Faktor 4
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLSCR	Phospholipidscramblase
Plts	Platelets (Thrombozyten)
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PPP	Plättchen-armes Plasma (<i>platelet-poor plasma</i>)
PS	Phosphatidylserin
PTF 1+2	Prothrombinfragment F 1+2
PV	Polycythaemia vera
RBCs	Red blood cells (Erythrozyten)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SERCA	sarkoplasmatische endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase
SNO-Hb	S-Nitrosohämoglobin
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TAT	Thrombin-Antithrombin III-Komplex
TBST	<i>Tris-buffered-Saline-Tween</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i> , Gewebsthromboplastin
Thr.	Thrombozyten
TK	Thrombozyten-Konzentrat
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
T-Tas	Total Thrombus-formation Analyzing System
TXA ₂	Thromboxan A ₂
Ü	Überstand
u.	und
vWF	von-Willbrand-Faktor
VB	Vollblut

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zusammensetzung und Funktion von humanem Vollblut	1
1.1.1	Primäre Hämostase	1
1.1.1.1	Thrombozyten.....	3
1.1.1.2	Der Fas-Ligand der Thrombozyten.....	4
1.1.2	Sekundäre Hämostase	4
1.1.3	Erythrozyten	6
1.1.4	Die Rolle der Erythrozyten im Rahmen der Thrombus-Bildung.....	7
1.2	Formen von Thromben	9
1.3	Blutgerinnungs-assoziierte Erkrankungen	9
1.4	Medizinische Relevanz der Arbeit.....	10
1.5	Ziele der Arbeit/ Hypothese.....	10
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Geräte und Arbeitsmaterialien	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Kits	15
2.1.5	Peptide und Massenstandards	15
2.1.6	Antikörper.....	15
2.1.7	Biologische Proben	16
2.1.8	Lösungen und Puffer.....	16
2.1.9	Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Trennung der zellulären Blutbestandteile	17
2.2.2	Probenaufbereitung für den Western Blot.....	17
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.2.2.2	Western Blot Analyse.....	18
2.2.3	Statische Versuche	19
2.2.3.1	Durchflusszytometrie.....	20
2.2.3.2	Durchflusszytometrische Untersuchung in den statischen Versuchen	22
2.2.3.3	Thrombinnachweis (TAT und PTF)	22
2.2.3.4	Inhibition des Fas-Liganden	23
2.2.3.5	Blockierung des Fas-Rezeptors	24
2.2.4	Adhäsionsversuche	24
2.2.5	Dynamische Versuche mit der Flusskammer (T-Tas®).....	24
2.2.6	Dynamische Versuche mit der Flusskammer (Standard).....	25

2.2.7	Analyse der arteriellen Thromben aus der Gefäßchirurgie	28
2.2.7.1	Durchflusszytometrische Untersuchung der humanen Thromben	28
2.2.7.2	Histologie und Lichtmikroskopie der humanen Thromben	29
2.2.7.3	Elektronenmikroskopie der humanen Thromben.....	31
2.2.8	Analyse muriner arterieller Thromben	31
2.2.8.1	Eisen(III)-chlorid-induzierte Gefäßverletzung muriner Carotiden	31
2.2.8.2	Histologie und Lichtmikroskopie muriner Thromben	31
2.2.9	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Analyse der Thrombus-Bildung in thrombozytenreichem Plasma im Vergleich zu Vollblut unter Flussbedingungen	33
3.2	Nachweis des Fas-Rezeptors auf Erythrozyten	35
3.3	Statische Versuche.....	36
3.3.1	Nachweis eines Zell-Zell-Kontaktes zwischen Thrombozyten und Erythrozyten in der Durchflusszytometrie.....	36
3.3.2	Veränderung der Fas-Ligand-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten.....	37
3.3.3	Veränderung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten	38
3.3.4	Einfluss des Fas-Ligand-Inhibitors DcR3 auf die PS-Exposition auf Erythrozyten	39
3.3.5	Einfluss des inhibierenden Fas-Rezeptor-Antikörpers auf die PS-Exposition von Erythrozyten	40
3.3.6	Einfluss des inhibierenden Fas-Rezeptor-Antikörpers auf die PS-Exposition der Thrombozyten	41
3.3.7	Thrombinnachweis (TAT und PTF).....	42
3.4	Quantifizierung adhärenter Thrombozyten an immobilisiertem Fas-Rezeptor.....	43
3.5	Dynamische Versuche: Einfluss blockierender Antikörper zur Hemmung der Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-Interaktion auf die Thrombus-Bildung unter Flussbedingungen	44
3.5.1	Einfluss vom DcR3 auf die Thrombus-Bildung unter Flussbedingungen	44
3.5.2	Einfluss des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer.....	47
3.6	Thrombus-Bildung unter pathologischen Bedingungen	49
3.6.1	Morphologie der humanen arteriellen Thromben	49
3.6.2	Morphologie muriner arterieller Thromben.....	49
3.6.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner arterieller Thromben	50
3.6.4	Zelluläre Zusammensetzung der humanen Thromben.....	53
3.6.5	Charakterisierung der Zellen in den humanen Thromben	53
3.6.5.1	Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten in humanen Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten	53
3.6.5.2	Exposition des Fas-Liganden auf den Thrombozyten in humanen Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten	55
3.6.5.3	PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten in humanen arteriellen Thromben .	56
3.6.5.4	PS-Exposition auf der Oberfläche von Thrombozyten in humanen arteriellen Thromben	57

4	Diskussion.....	58
4.1	Erythrozyten als essentieller Bestandteil für eine effektive Thrombus-Bildung.....	58
4.1.1	Die Rolle einer direkten Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten bei der arteriellen Thrombus-Bildung	58
4.1.2	Die Bedeutung von Phosphatidylserinen in der Thrombus-Bildung.....	59
4.1.3	Fas-Rezeptor und Fas-Ligand als Interaktionspartner der Erythrozyten und Thrombozyten bei der arteriellen Thrombus-Bildung	60
4.1.4	Einfluss der Erythrozyten auf die Thrombozyten	62
4.1.5	Die Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten spielt auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle	63
4.1.5.1	Morphologische Untersuchung humaner arterieller Thromben	64
4.1.5.2	Durchflusszytometrische Untersuchungen humaner arterieller Thromben	65
4.2	Grenzen der statischen Versuche	66
4.3	Grenzen der Flusskammerversuche.....	67
4.4	Schlussfolgerung und Aussicht.....	68
5	Literaturverzeichnis.....	70
6	Anhang	76
6.1	Abbildungsverzeichnis	76
6.2	Charakterisierung der Patiententhromben.....	77

1 Einleitung

1.1 Zusammensetzung und Funktion von humanem Vollblut

Das menschliche Blutvolumen beträgt bei gesunden Personen etwa 4,5-6 Liter. Das Blut setzt sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammen. 40 bis 50 % des Blutvolumens besteht aus zellulären Bestandteilen, der übrige Anteil aus Blutplasma (Herold, **2014**). Der zelluläre Anteil enthält zum größten Teil Erythrozyten, welche auch als rote Blutkörperchen bezeichnet werden. Der Referenzbereich für die Anzahl der Erythrozyten im Blut liegt bei gesunden Frauen zwischen 4,0 und 5,4 Millionen Erythrozyten pro μl und bei Männern zwischen 4,3 und 5,6 Millionen Erythrozyten pro μl (Herold, **2014**). Eine weitere Zellpopulation sind die Thrombozyten mit 140.000 bis 345.000 Thrombozyten pro μl Blut (Herold, **2014**). Die dritte Zellpopulation stellen die Leukozyten mit 3800-10.500 pro μl Blut dar. Dabei umfasst der Begriff Leukozyten eine Vielzahl verschiedener Zellen. Dazu gehören die B- und T-Lymphozyten sowie die Granulozyten und Monozyten. Neben den Zellen besteht das Blut aus Blutplasma, das zu 90 % Wasser und zu 10 % gelöste Substanzen wie Proteine, niedermolekulare Stoffe und Elektrolyte enthält (Aumüller, **2010**). Durch die verschiedenen Zelltypen und die Eigenschaften des Blutplasmas kann Blut zahlreiche Funktionen, die das Überleben des menschlichen Organismus gewährleisten, übernehmen, weshalb es auch als flüssiges Organsystem bezeichnet wird. Einerseits dient es als Transport- und Kommunikationsmittel für Sauerstoff, Hormone, Nährstoffe und Wärme, andererseits übernimmt es Abwehrfunktionen gegen Pathogene, die vor allem durch die Leukozyten bewerkstelligt werden (Aumüller, **2010**). Das Gerinnungssystem des Blutes verhindert große Blutverluste bei Verletzungen durch die Bildung von Thromben. Letzteres soll in dieser Arbeit genauer erläutert werden. Dabei werden auf zellulärer Ebene vor allem die Thrombozyten und Erythrozyten beobachtet.

1.1.1 Primäre Hämostase

Als Hämostase wird die Summe aller physiologischen Prozesse, die letztendlich den Stillstand einer Blutung herbeiführt, bezeichnet. Kommt es zu einer Schädigung eines Gefäßes setzen primäre und sekundäre Hämostase ein. Am Ende der Hämostase steht ein fester Thrombus, der die Gefäßverletzung abdichtet und einen weiteren Blutverlust verhindert. Später folgt dann die Auflösung des Thrombus (Fibrinolyse) sowie die Reparatur des verletzten Gefäßes (Behrends, **2012**).

Bei einer Gefäßverletzung setzt zunächst die primäre Hämostase ein, die auch als zelluläre Hämostase bezeichnet wird, da sie vor allem durch Thrombozyten vermittelt wird. Diese setzt sich aus der Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion und -aggregation zusammen (Behrends, **2012**).

Ein intaktes Endothel trennt normalerweise die Thrombozyten von den Bestandteilen der Gefäßwand, die zu einer Thrombozytenaktivierung führen. Neben dem Endothel schützen die zwei exogenen von den Endothelzellen ausgeschüttete Regulatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin I₂ (PGI₂) vor einer Thrombozytenaktivierung (Brass et al., **2013**). Durch die Gefäßverletzung wird die extrazelluläre Matrix freigelegt, die unter anderem Kollagen enthält. Im Prozess der Hämostase spielt Kollagen eine entscheidende Rolle, da es die Thrombozytenadhäsion unterstützt und zusätzlich zu einer direkten Aktivierung der Thrombozytenaggregation beiträgt (Behrends, **2012**). Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf Kollagen stellt sich als ein komplexer Prozess dar, bei dem verschiedene Agonisten, die mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie Intergrinen und G-Proteingekoppelte Rezeptoren interagieren, eine Rolle spielen (Broos et al., **2011**). Zunächst kommt es zu einer Adhäsion der Thrombozyten mit Hilfe des aus dem Endothel freigesetzten von-Willebrand-Faktors (vWF) an das Kollagen. Der vWF sowie Fibronectin und Laminin bilden eine molekulare Brücke zwischen den Kollagenfasern auf der einen Seite und dem Rezeptorkomplex Glykoprotein Ib-V-IX (GP Ib-V-IX, bestehend aus den Untereinheiten GP Ib α , GP Ib β , GP V und GP IX) auf der Thrombozytenmembran

(Nieswandt et al., 2011). Außerdem gibt es eine direkte Interaktion unabhängig vom vWF zwischen dem freiliegenden Kollagen und den Thrombozyten über GP Ia/IIa (= Integrin $\alpha_2\beta_1$) und GP VI (Frojmovic, 1998). Insgesamt werden vier verschiedene Kollagenrezeptoren unterschieden, die auf der Oberfläche von Thrombozyten identifiziert werden können. Zwei, GP Ia/IIa (=Integrin $\alpha_2\beta_1$) und GPVI (Kollagenrezeptor), binden direkt an Kollagen und zwei weitere, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb IIIa) und GPIIb α binden über vWF, die auf Kollagen exponiert werden, indirekt an Kollagen. Die Bindung von GPIIb α an den vWF übernimmt vor allem die Funktion der Verlangsamung schnell zirkulierender Thrombozyten bei hohen Scherraten ($>1000\text{ s}^{-1}$) (Broos et al., 2011). Dabei kommt es zunächst noch nicht zu einer festen Adhäsion sondern eher zu einem Rollen der Thrombozyten über die extrazelluläre Matrix. Eine feste Anlagerung erfolgt dann über die Interaktion mit GP VI (Nieswandt et al., 2011). Für die stabile Adhäsion spielen die Integrine eine bedeutende Rolle. Kollagen bindet an die Thrombozytenintegrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Nieswandt and Watson, 2003). Diese Integrine werden zuvor aber durch Kollagen über das GP VI der Thrombozyten aktiviert und nehmen auf diese Weise ihre hochaffine Konformation ein, die eine stabile Adhäsion ermöglicht. GPVI ist der potenteste Signalrezeptor, der über seine intrazelluläre Domäne das Signal der Bindung in die Zelle leitet und dessen Signalkaskade eine Thrombozytenaktivierung nach sich zieht (Clemetson et al., 1999). Er vermittelt bei Aktivierung die Tyrosinphosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne vom assoziierten Fc Rezeptor γ (FcR γ); es entsteht ein ITAM (*immunreceptor tyrosine based activation domain*)–Motiv, wodurch die Tyrosinkinase Syk aktiviert wird (Nieswandt et al., 2011). Im weiteren Verlauf wird Phospholipase $C\gamma_2$ (PLC γ_2) über Phosphorylierungskaskaden aktiviert und es entstehen IP $_3$ und Diacylglycerol (DAG). DAG dient als Botenstoff, der die Proteinkinase C (PKC) stimuliert, die unter anderem eine Sekretion von ADP aus den dichten Granula vermittelt. IP $_3$ führt zu einer intrazellulären Kalziumfreisetzung, die die Produktion von Thromboxan (TXA $_2$) aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase 1 (COX-1) anregt (Broos et al., 2011). Durch die Freisetzung dieser Stoffe werden weitere Thrombozyten durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege aktiviert. Mit der Ausnahme von Kollagen, das seine Wirkung über einen *Immunreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-gekoppelten Signalweg entfaltet, vermitteln die verschiedenen Agonisten ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. ADP vermittelt seine Wirkung über die 2 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y $_1$ und P2Y $_{12}$ (Brass et al., 2013). Durch die Bindung der Agonisten Thrombin, ADP und TxA $_2$ kommt es G $_q$ -Protein-vermittelt zu einer Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β), einer Phosphodiesterase, die aus dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) Inositoltriphosphat (IP $_3$) abspaltet. IP $_3$ ist in der Zelle als intrazellulärer Botenstoff (Second Messenger) für die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Kalziumspeichern verantwortlich (Broos et al., 2011).

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt durch einen intrazellulären Signalweg dazu, dass das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) auf der Thrombozytenoberfläche aktiviert wird (Brass et al., 2013).

Morphologisch zeigt sich die Plättchenaktivierung durch eine Formveränderung der Thrombozyten, bei der lange Fortsätze, sogenannter Pseudopodien, ausgebildet werden, die es den Thrombozyten ermöglichen mit möglichst vielen anderen Thrombozyten in Kontakt zu treten. Über Plasmafibrinogen und aus Thrombozytengranula freigesetztem Fibrinogen werden Brücken zwischen den aktivierten Integrinen $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche gebildet, sodass es zur Ausbildung eines Thrombozytenaggregats (weißer Thrombus) kommt (Behrends, 2012).

Der auf diese Weise entstandene Thrombus kann keineswegs als eine homogene Anhäufung von Thrombozyten angesehen werden. Es existieren je nach Entfernung zur Gefäßverletzung verschiedenste Aktivierungsstadien der Thrombozyten. Insbesondere in der Kernregion finden sich stark aktivierte Thrombozyten wohingegen in der äußeren Schale nur gering aktivierte Thrombozyten zu finden sind. So wird eine angemessene Relation vom entstehenden Thrombus zur Größe der Gefäßverletzung gewährleistet (Brass et al., 2013).

1.1.1.1 Thrombozyten

Bei den Thrombozyten handelt es sich um die kleinsten Zellen im Blut. Sie haben nur eine Größe von etwa 2-4 µm und einen Durchmesser von etwa 0,5 µm. Ihre Lebensdauer beträgt 7 bis 10 Tage (F. Bauer, **2014**, Brass et al., **2013**). Zu ihrer Hauptaufgabe zählt die Blutstillung nach einer Verletzung (Broos et al., **2011**), welche durch eine Veränderung der Thrombozytenzahl eingeschränkt werden kann. Eine Thrombozytopenie ist durch eine Thrombozytenzahl unter 140.000 bis 100.000 Zellen pro Mikroliter definiert (Cheung et al., **2005**). Ab einer Thrombozytenzahl von weniger als 30.000 pro Mikroliter kann klinisch eine Blutungsneigung festgestellt werden (Herold, **2014**). Ursachen für eine Thrombozytopenie können Bildungsstörungen oder ein gesteigerter Umsatz sein (Herold, **2014**). Im Gegensatz dazu wird eine erhöhte Thrombozytenzahl als Thrombozytose bezeichnet, bei der die Blutgerinnung negativ beeinflusst wird. Ursache können myeloproliferative Erkrankungen oder eine reaktive Thrombozytose nach Traumen, einer Entfernung der Milz oder einem Blutverlust sein (Herold, **2014**). Neben ihrer Bedeutung für die Blutgerinnung wird den Thrombozyten eine immer größere Rolle auch in anderen Prozessen zugeschrieben. Thrombozyten werden als eine Komponente des angeborenen Immunsystems angesehen, da Interaktionen mit Bakterien über Toll-like Rezeptoren (TLRs) beobachtet werden können (Cox et al., **2011**). Auch Leukozyten zählen zu den Interaktionspartnern der Thrombozyten (McEver, **2001**, Trzeciak-Ryczek et al., **2013**). Das Tumorwachstum und insbesondere die Verbreitung von Tumorzellen im Organismus (Bambace and Holmes, **2011**, Gay and Felding-Habermann, **2011**) sowie der Progress der Erkrankung Morbus Alzheimer (Gowert et al., **2014**) wird durch Thrombozyten verstärkt.

Die Thrombozyten-Bildung findet im Knochenmark durch Zytoplasmaabschnürungen von Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten, statt. Bei den reifen Thrombozyten handelt es sich um kernlose Zellen. Der Abbau erfolgt in der Milz und zu geringen Anteilen in der Leber sowie im Knochenmark. Die Regulation der Zellzahl der Thrombozyten erfolgt über die Thrombozyten selbst, die auf ihrer Oberfläche genauso wie ihre Vorstufen im Knochenmark Thrombopoietin (TPO)-Rezeptoren tragen. Je mehr TPO von den zirkulierenden Thrombozyten abgefangen wird, desto weniger TPO gelangt zur Stimulation der Vorläuferzellen in das Knochenmark (F. Bauer, **2014**).

Obwohl es sich bei den Thrombozyten um kernlose Zellen handelt zählen sie dennoch zu den hoch reaktiven Zellen, die im Falle einer Gefäßverletzung zahlreiche Modulatoren und aktive Stoffe aus spezifischen Organellen ausschütten können. Im Zytosol der Thrombozyten liegen Mitochondrien, eine spezielle Form des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) sowie spezielle Granula (elektronendichte Granula, α-Granula, Lysosomen).

Die Mitochondrien haben vor allem die Aufgabe der Energiebereitstellung. Das rER dient als Kalzium- und Enzymspeicher, was vor allem im Rahmen der Thrombozytenaktivierung benötigt wird. Hier sind beispielsweise die Cyclooxygenase 1 (COX-1) und die Thromboxan-synthetase lokalisiert, die für die Synthese von Thromboxan aus Arachidonsäure verantwortlich sind. Der enthaltene Kalziumspeicher wird durch ATPase Pumpen, die als SERCAs (*sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase*) bezeichnet werden, kontrolliert. Sie pumpen Ca²⁺-Ionen in die intrazellulären Ca²⁺-Speicher. Die Höhe des cytosolischen cAMP-Levels bestimmt die ATPase-Aktivität (Rendu and Brohard-Bohn, **2001**, Enouf et al., **1997**).

Die kleinsten Granula sind die elektronendichten Granula. Sie beinhalten Pro-Aggregationsfaktoren wie ADP und ATP, Serotonin und Histamin, sowie Kalzium (Rendu and Brohard-Bohn, **2001**). Die elektronendichten Granula enthalten auch verschiedene Membrankomponenten, die im Rahmen der Thrombozytenaktivierung eine Rolle spielen. Bei diesen Granula handelt es sich um typische Exocytose-Vesikel, die nach dem Sekretionsprozess in die Thrombozytenmembran integriert werden, sodass die exprimierten Membranproteine auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten getragen werden. Als wichtige Membrankomponenten der elektronendichten Granula sind hier die Glykoproteine Ib (GPIb) und IIb/IIIa hervorzuheben (Rendu and Brohard-Bohn, **2001**).

Bei den α -Granula handelt es sich um die größten Granula und von ihnen sind auch zahlenmäßig die meisten in den Thrombozyten enthalten. Sie enthalten Adhäsions- und Reparaturfaktoren. Dazu zählen die plättchenspezifischen Proteoglykane β -Thromboglobulin (β TG) und Plättchen-Faktor 4 (PF4), die Glykoproteine Fibronektin, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombospondin, die Gerinnungsfaktoren V, VII, XI, XIII, Fibrinogen, Protein S und Plasminogen, verschiedene zelluläre Mitogene sowie Protease-Inhibitoren und Immunglobuline. Als Bestandteile der Membran der α -Granula sind P-Selektin (CD62), GPIIb/IIIa, GPIb-IX und GP IV zu nennen (Rendu and Brohard-Bohn, **2001**). Bei der Exozytose der Granula verschmelzen die Membran der Granula mit der der Thrombozyten. P-Selektin wird auf diese Weise bei Aktivierung der Thrombozyten auf deren Oberfläche exprimiert und gilt damit als ein wichtiger Aktivierungsmarker. Außerdem ist bekannt, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen und freisetzen können (Ahmad et al., **2001**). Ebenfalls zur Kategorie der Granula zählen die Lysosomen, die Verdauungsenzyme wie Proteasen und Hydrolasen enthalten (Rendu and Brohard-Bohn, **2001**).

1.1.1.2 Der Fas-Ligand der Thrombozyten

Der auch als CD178 bekannte Fas-Ligand ist ein Typ II-Transmembran-Protein, das zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) gehört. Er wird auf aktivierten T-Lymphozyten, NK-Zellen und Thrombozyten exprimiert (Nagata, **1997**, Suda and Nagata, **1994**, Ahmad et al., **2001**). Thrombozyten präsentieren den Fas-Liganden erst bei einer Aktivierung (Ahmad et al., **2001**). Eine Interaktion des Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor ist vor allem aus dem Bereich der Apoptose bekannt. Der Fas-Rezeptor als Interaktionspartner des Fas-Liganden ist auch als CD95 oder APO-1 bekannt. Er gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren (Strasser et al., **2009**).

Der Fas-Ligand zytotoxischer T-Lymphozyten bindet an den präsentierten Fas-Rezeptor der Zielzelle und kann auf diese Weise eine Apoptose induzieren (Suda and Nagata, **1994**). Die Fas-Rezeptor-Fas-Ligand-Interaktion spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems und der Tumorentstehung (Strasser et al., **2009**, Peter et al., **2015**). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Fas-Ligand der Thrombozyten in Fas-positiven Tumorzellen eine Apoptose induzieren kann (Ahmad et al., **2001**). Auch *in vivo* konnte im Mausmodell am Beispiel eines Schlaganfalls die Bedeutung des thrombozytären Fas-Liganden für die Apoptose nachgewiesen werden (Schleicher et al., **2015**). Den Thrombozyten konnte somit auch eine aktive Rolle im Rahmen der Apoptose zugeschrieben werden, die durch den Fas-Liganden vermittelt wird.

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Der primären folgt die sekundäre Hämostase, in der sich ein Netzwerk aus Fibrinfäden bildet, welches die noch aus der primären Hämostase locker verbundenen Thrombozyten und sich einlagernde Erythrozyten zusammenhält. Es entsteht ein roter Thrombus, der einen stabilen Wundverschluss gewährleistet. Die Bildung des roten Thrombus wird in drei Phasen eingeteilt: die Aktivierungs-, die Koagulations- und die Retraktionsphase (Klinke et al., **2009**). In der Aktivierungsphase läuft eine Kaskade von Enzymaktivierungen ab, an der insgesamt 13 Gerinnungsfaktoren beteiligt sind. Die Gerinnungsfaktoren sind im Blutplasma gelöst, weshalb die sekundäre Hämostase auch als plasmatische Gerinnung bezeichnet wird. Im Zentrum steht die Bildung von Thrombin (Faktor IIa, FIIa) aus Prothrombin (Faktor II). Die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin erfolgt durch den Prothrombinase-Komplex, der aus FVa, Xa, negativ geladenen Phospholipiden und Ca^{2+} besteht. Die negativ geladenen Phospholipide werden dabei durch die Membran aktivierter Thrombozyten oder auch Erythrozyten gestellt (Bervers et al., **1982**, Peyrou et al., **1999**, Schmidt and Lang, **2007**). Die Aktivierung des FX (*Stuart-Prower-Faktor*) bildet die Endstrecke eines exogenen und endogenen Systems (Abb. 1) (Riddel et al., **2007**).

Im exogenen System bilden das Gewebsthromboplastin (*tissue factor*, TF), das aus der Adventitia der Blutgefäße im Rahmen einer Verletzung freigesetzt wird, der durch den TF

aktivierte FVIIa, Ca^{2+} und negativ geladene Phospholipide, insbesondere Phosphatidylserine, einen Komplex, der FX aktiviert (Riddel et al., 2007, Behrends, 2012, Hoffman and Monroe, 2001). Durch diesen Komplex kann auch Prothrombin zu Thrombin umgewandelt werden (Zwaal et al., 1992, Schmidt and Lang, 2007).

Im endogenen System führt der Kontakt des Faktors XII (Hagemann-Faktor) mit einer negativ geladenen Oberfläche wie die der aktivierten Thrombozyten zu einer Aktivierung des Faktor XII (Riddel et al., 2007). Kininogen dient als Ko-Faktor für diesen Kontakt. Kommt es zu einer Akkumulation von FXIIa wandelt FXIIa als Protease Präkallikrein zu Kallikrein um, welches als positives *Feedback* die Umwandlung von FXII zu FXIIa beschleunigt. FXIIa spaltet FXI proteolytisch zu FXIa. Darauf folgt die proteolytische Spaltung von FIX zu FIXa durch FXIa. Zusammen mit FXa und Thrombin (IIa) aktiviert FIXa den FVIII. FVIIIa und FIXa bilden dann in einem nächsten Schritt einen Komplex mit Ca^{2+} und negativ geladenen Phospholipiden („*tenase complex*“), der die Umwandlung von FX zu FXa herbeiführt (Abb. 1) (Riddel et al., 2007, Zwaal et al., 1992).

Am Ende des endogenen und des exogenen Systems wird der Prothrombinase-Komplex aus FXa, FVa, Ca^{2+} und Phospholipiden gebildet, der eine Thrombingenerierung herbeiführt (Riddel et al., 2007). Thrombin ist als der effizienteste Thrombozytenaktivator im Vergleich zu allen anderen Agonisten anzusehen. Die Antwort der Thrombozyten auf einen Thrombin-Stimulus wird über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt, die zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren zählen. Auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten finden sich PAR1 und PAR4 (Brass et al., 2013). In den Thrombozyten führt Thrombin zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration und damit einer Integrinaktivierung (Brass et al., 2013). Das Thrombin führt zudem zu einer Verstärkung der gesamten Kaskade, indem es die Aktivierung von FV und FVIII katalysiert (positive Rückkopplung).

Es folgt die Koagulationsphase, in der das entstandene Thrombin Fibrinogen zu Fibrinmonomeren umwandelt, die sich zu einem Fibrinnetz zusammenlagern, und FXIII durch Thrombin zu FXIIIa aktiviert wird, was die stabile Vernetzung der Fibrinpolymere vermittelt (Behrends, 2012) (Abb. 1).

In der Retraktionsphase werden die Fibrinfäden über den Membranrezeptor Glykoprotein IIb/IIIa mit den Thrombozyten verbunden. Die Aktivierung des kontraktiven Actin-Myosin-Systems bewirkt ein Zusammenziehen und eine Volumenabnahme des gesamten Thrombus, wodurch eine Verfestigung und damit ein mechanischer Wundverschluss bewerkstelligt wird (Brass et al., 2013, Klinker et al., 2009). Bei dieser Darstellung der Hämostase ist anzumerken, dass sie zwar als hilfreiches Model zum Verständnis der Hämostase dient, aber in den letzten Jahren durch viele klinische und experimentelle Beobachtungen davon ausgegangen werden muss, dass dieses Model nicht vollständig die Abläufe der Hämostase *in vivo* erklären kann (Hoffman and Monroe, 2001, Hoffman and Monroe, 2005).

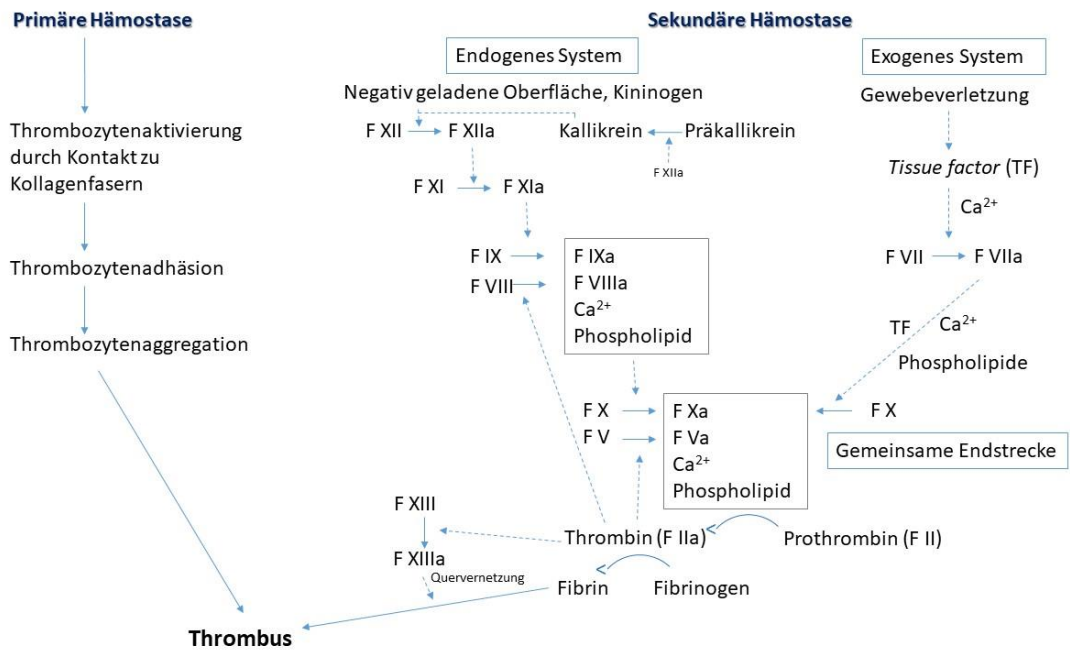


Abb. 1: Schematische Darstellung der primären und sekundären Hämostase

In der primären Hämostase führt ein Kontakt von Thrombozyten mit den Kollagenfasern zu einer Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. In der sekundären Hämostase wird ein Netzwerk aus Fibrinfäden gebildet, welches die Thrombozyten zusammenhält. Das Fibrinnetz entsteht durch Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin. Im endogenen System wird F XII durch eine negativ geladene Oberfläche wie die aktivierter Thrombozyten und den Ko-Faktor Kininogen aktiviert. Kallikrein beschleunigt diesen Prozess. Es folgt eine kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren F XI und F IX. F IXa, VIIIa, Ca^{2+} und negativ geladene Phospholipide bilden einen Komplex, der die Umwandlung von F X zu F Xa herbeiführt. Im exogenen System erfolgt eine Aktivierung des F VII durch Gewebsthromboplastin (TF= *tissue factor*). F VIIa, TF, Phospholipide und Ca^{2+} bilden einen Komplex, der die Aktivierung von F X möglich macht. F Xa bildet mit dem durch Thrombin aktivierten F Va, Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombinase-Komplex, der Prothrombin zu Thrombin umwandelt. Das Thrombin führt neben der Umwandlung des Fibrinogens zu einer Verstärkung der gesamten Kaskade, indem es die Aktivierung von F V und F VIII katalysiert (positive Rückkopplung).

Durchgezogene Pfeile (\rightarrow) stellen eine Umwandlung dar. Gestrichelte Pfeile (\dashrightarrow) verdeutlichen eine Einwirkung. F steht für Faktor, wobei „a“ den aktivierten Faktor kennzeichnet. Die Faktoren sind mit römischen Zahlen nummeriert. Grau umrandete Kästen veranschaulichen sich bildende Komplexe. Abbildung modifiziert nach Schmidt/Lang: Physiologie des Menschen, 30. Auflage (Schmidt and Lang, 2007).

1.1.3 Erythrozyten

Erythrozyten stellen die häufigste Zellart pro Volumeneinheit des Blutes dar und bestimmen dadurch den Hämatokrit und damit die Blutviskosität sowie die rheologischen Eigenschaften des Blutes (Klinke et al., 2009). Ihre Hauptaufgabe liegt im Gasaustausch. Sie enthalten das Protein Hämoglobin, das Sauerstoff binden und an das Gewebe abgeben kann. Anschließend ist das Hämoglobin am Kohlenstoffdioxid/ CO_2 -Transport zur Lunge beteiligt. Ihre Bildungsrate wird durch das Hormon Erythropoetin bestimmt. Die letzte Vorstufe in der Bildung von Erythrozyten sind die Retikulozyten. Ihre Anzahl gibt Auskunft über die Neubildungsrate von Erythrozyten und kann somit Hinweise auf Störungen der Erythropoese geben. Die Erythrozyten haben eine bikonkave Form, die ein hohes Oberflächen/Volumen-Verhältnis gewährleistet, das ideal für den Gastransport geeignet ist. Ihr Durchmesser beträgt $7,5 \mu\text{m}$ und ihre Dicke etwa $1,5 \mu\text{m}$. Ihr Zytoskelett ermöglicht eine starke Deformierbarkeit, was vor allem für die Kapillarpassage notwendig ist (Klinke et al., 2009). Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der verschiedene Membran- und Kanalproteine eingelagert sind (Klinke et al., 2009). Auf ihrer Außenseite

befinden sich die Blutgruppenantigene, die im medizinischen Alltag vor allem für Bluttransfusionen relevant sind. Auf der zytosolischen Seite der Membran liegt das für die Verformbarkeit so wichtige Membranzytoskelett, dessen Hauptkomponente Spectrinmoleküle darstellen, die durch Verbindungsproteine verbunden sind (Klinke et al., 2009).

1.1.4 Die Rolle der Erythrozyten im Rahmen der Thrombus-Bildung

In den letzten Jahren wird den Erythrozyten eine immer größere Rolle in der Gerinnung zugeschrieben. Goldsmith publiziert erstmals im Jahr 1972, dass Erythrozyten eher im Zentrum eines Gefäßes fließen, während die Thrombozyten sich eher im Randstrombereich konzentrieren. Diesen Effekt bezeichnet man auch als Margination (Goldsmith, 1972). Aus diesem Grund wird den Erythrozyten eine passive Rolle im Wundverschluss zugeschrieben. Umso höher der Anteil an Erythrozyten am gesamten Blutvolumen ist, desto mehr zeigt sich der radiale Transport der Thrombozyten und ihre Adhäsion am Kollagen. Dieser Effekt zeigt sich insbesondere bei Hämatokritwerten zwischen 10 und 40 Prozent (Turitto and Weiss, 1980). Außerdem zeigt die klinische Erfahrung, dass unterhalb eines Hämatokrits von 30 % mit deutlichen Beeinträchtigungen der Gerinnung zu rechnen ist und die Indikation zur Transfusion von Erythrozytenkonzentraten bei persistierenden Blutungssituationen und im OP großzügig gestellt werden sollte (Lier et al., 2007). Wird zur Gerinnungstherapie insbesondere im Falle einer Massentransfusion auch FFP (*fresh frozen plasma*) angewendet, sollte ein Verhältnis von FFP:EK:TK von 4:4:1 angestrebt werden ((AWMF), 2016). Es wird ein Hämoglobinwert von über 5,6 mmol/l (>9 g/dl) angestrebt (Lier et al., 2007). Im Rahmen von Massentransfusionen bei aktiv blutenden Patienten sollte nach Stabilisierung der Hämoglobinwert auf mindestens 4,4-5,6 mmol/l (7-9 g/dl) angehoben werden ((AWMF), 2016). Die Blutungszeit wird also stark vom Hämatokrit beeinflusst. In klinischen Studien zeigt sich, dass die Gabe von Erythrozytenkonzentraten und der daraus folgende Anstieg des Hämatokrits die Blutungszeit reduzieren kann ohne Thrombozyten transfundieren zu müssen (Valeri et al., 2001). Andersherum zeigt sich bei anämischen Patienten eine verstärkte Blutungsneigung (Valeri et al., 2001). Eine verbesserte Blutungszeit durch die Gabe von Erythrozytenkonzentraten kann auch für Erkrankungen wie die Anämie bei einer Urämie (Harnvergiftung) gezeigt werden (Livio et al., 1982) sowie für die Storage-Pool Erkrankung, einer Thrombozytopathie, die durch eine Sekretionsstörung im Rahmen der Thrombozytenaktivierung gekennzeichnet ist (Weiss et al., 1996). Außerdem sollte an dieser Stelle die Erkrankung Polycythaemia vera genannt werden. Hierbei handelt es sich um eine myeloproliferative Erkrankung, bei der es zur Vermehrung aller drei Blutzellreihen im Blut kommt. Das bei dieser Erkrankung erhöhte Risiko für die Entwicklung einer Thrombose scheint vor allem mit der Höhe des Hämatokrits und nicht etwa mit der Anzahl der Thrombozyten assoziiert zu sein (Boneu, 1994), was ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der Erythrozyten auf die Thrombus-Bildung ist.

Auch die Phosphatidylserine (PS) auf der Oberfläche von Erythrozyten, die in Zusammenhang mit der Blutgerinnung gebracht werden können, sind Inhalt aktueller Forschungen. Die Bedeutung von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Zellen ist bisher vor allem im Prozess der Apoptose beschrieben (Verhoven et al., 1995). Phosphatidylserine werden beispielsweise auf apoptotischen Zellen exponiert. Das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wird dann von der inneren zur äußeren Membranseite transloziert. Dieser Vorgang findet schon in den anfänglichen Stadien der Apoptose statt (Martin et al., 1995). Bei Thrombozyten ist die Exposition von Phosphatidylserinen ein Marker für prokoagulative Aktivität (Bever et al., 1982).

Erythrozyten, die Phosphatidylserine auf ihrer Oberfläche exponieren, zeigen wie Thrombozyten prokoagulative Eigenschaften (Peyrou et al., 1999). Phosphatidylserine werden durch einen Kalzium-abhängigen Mechanismus von der Innen- auf die Außenseite der Erythrozytenmembran gebracht. Eine ansteigende intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert die „Phospholipidscramblase“, deren Aktivität die Lipidbewegungen in der Erythrozytenmembran zur Folge hat. Dieser Mechanismus spielt eine zentrale Rolle in der

Bildung eines Blutgerinnsels (Basse et al., **1996**). Eine Asymmetrie der Plasmamembran ist physiologisch. An der Außenseite sind vor allem Sphingomyelin und Phosphatidylcholin zu finden während sich auf der Innenseite Phosphatidylserine und Phosphatidylethanolamine befinden. Dieses Gleichgewicht wird durch eine ATP-abhängige Aminophospholipid-Translokase aufrechterhalten (Seigneuret and Devaux, **1984**). Die Lage von Phosphatidylserinen stellt eine Eigenschaft von Erythrozyten dar, die das Gleichgewicht zwischen Hämostase und Thrombose beeinflusst. Eine übermäßige Präsentation von Phosphatidylserinen auf der Erythrozytenaußenseite stellt ein stark thrombogene Oberfläche dar (Zwaal and Schroit, **1997**). So wird weiterhin vermutet, dass die Oberfläche von Erythrozyten dazu in der Lage ist, den Faktor IX der Gerinnungskaskade zu aktivieren und somit den endogenen Weg der Gerinnungskaskade zu unterstützen (Kawakami et al., **1995**). Als wichtige Erkrankungen in diesem Zusammenhang sind die β -Thalassämie und die Sichelzellanämie zu nennen. Beide Erkrankungen gehen mit einer abnormalen Präsentation von Phosphatidylserinen auf der Erythrozytenoberfläche einher, was die prokoagulante Aktivität der Erythrozyten bei diesen Erkrankungen erklären könnte (Helley et al., **1996**).

Die Freisetzung von Adenosin Diphosphat (ADP) durch Erythrozyten verstärkt die Thrombozytenaggregation (Hellem et al., **1961**, Gaarder et al., **1961**). In der Anwesenheit von metabolisch aktiven Erythrozyten kann des Weiteren eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten festgestellt werden, sodass biochemische Interaktionen zwischen Erythrozyten und Thrombozyten vermutet werden (Valles et al., **1991**). Es wird außerdem nachgewiesen, dass Erythrozyten ATP in hypoxämischen Regionen freisetzen können (Bergfeld and Forrester, **1992**). Auch Scherspannungen, bei denen es sich um parallel zueinander in entgegengesetzter Richtung wirkende Kräfte handelt, scheinen in den Erythrozyten chemische Mechanismen (ADP-Ausschüttung) einzuleiten, die die Thrombozytenaggregation verstärken (Reimers et al., **1984**). Zur Erzeugung der Scherspannungen nutzen Reimers et al. Spezielle Viskosimeter.

Erythrozyten stehen in Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen, die die Hämostase betreffen. Für die Zentralvenenthrombose des Auges wird gezeigt, dass die Anfälligkeit für diese Erkrankung erhöht ist, wenn es zu Veränderungen der Blutviskosität und der Verformbarkeit der Erythrozyten kommt (Sofi et al., **2007**). Auch für die arterielle Hypertonie kann gezeigt werden, dass sie mit einer erhöhten Blutviskosität und einer erniedrigten Verformbarkeit der Erythrozyten assoziiert ist (Martinez et al., **1997**). Bei der Erkrankung Diabetes mellitus wird eine verstärkte Erythrozytenaggregation nachgewiesen (Hayakawa and Kuzuya, **1991**). All diese Erkenntnisse zeigen, dass Erythrozyten eine wichtige Rolle im Rahmen der Hämostase und der Thrombus-Bildung spielen.

Neben den prothrombotischen Eigenschaften von Erythrozyten sind jedoch auch antithrombotische Einflüsse der Erythrozyten bekannt. Das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin kann beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) binden sodass S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb) entsteht. Bei der Deoxygenierung kann dieses abgegeben werden und auf diese Weise eine Gefäßerweiterung und einen verbesserten Blutfluss herbeiführen (Stamler et al., **1997**). Das SNO-Hb ist zusätzlich für eine Hemmung der Thrombozytenaggregation verantwortlich (Pawloski et al., **1998**). Außerdem wird über ein von Erythrozyten exprimiertes neuartiges Ektoenzym berichtet, das Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abbaut und damit ein wichtiger Agonist für die Thrombozytenaggregation entzogen wird (Luthje et al., **1988**).

1.2 Formen von Thromben

Es werden unterschiedliche Formen von Thromben unterschieden. So gibt es einerseits den Abscheidungsthrombus (Plättchentrombus), der durch die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an einem Endotheldefekt entsteht. Er ist dadurch gekennzeichnet, dass er sehr fest an der Gefäßwand haftet und eher erythrozytenarm ist (Berger et al., 2014). Andererseits gibt es den Gerinnungsthrombus, der vor allem durch eine Strömungsverlangsamung entsteht. Es handelt sich um Aggregate aus Thrombozyten, Erythrozyten und Gerinnungsfaktoren. Er zeigt keine feste Haftung und birgt daher eine hohe Embolie-Gefahr (Berger et al., 2014). Bei einer Embolie handelt es sich um eine Verschleppung korpuskulärer Elemente wie thrombotischem Material innerhalb der Blutbahn, die einen Gefäßverschluss zur Folge haben kann (Herold, 2014). Des Weiteren ist an dieser Stelle der hyaline Thrombus zu nennen, der bei der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) entsteht und in großem Maße aus Gerinnungsfaktoren besteht (Herold, 2014, Berger et al., 2014). Die DIC entsteht durch eine intravasale Aktivierung der Blutgerinnung wie es beispielsweise im Schock vorkommen kann (Herold, 2014).

1.3 Blutgerinnungs-assoziierte Erkrankungen

Die Thrombose ist von dem Begriff der Hämostase, bei der es sich um den physiologischen Vorgang der Blutgerinnung handelt, abzugrenzen. Bei der Thrombose handelt es sich um das Krankheitsbild, das durch die Entwicklung von Thromben entsteht. Die Thrombose ist als intravitale, intravasale und lokalisierte Gerinnung von Blutbestandteilen definiert (Herold, 2014). Die Entstehung einer Thrombose wird durch die sogenannte Virchow-Trias begünstigt. Zu der Virchow-Trias zählen die Endothelalteration (wie Entzündungen oder Traumen), Blutstromveränderungen (Wirbelbildung oder Strömungsverlangsamung) und Veränderungen der Blutzusammensetzung (Herold, 2014). Trotz der immer besser werdenden antithrombotischen Therapie stellt heutzutage die Thrombose noch immer ein großes klinisches Problem dar. Zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen gleich mehrere Erkrankungen, die auf eine Thrombose zurückzuführen sind. Die zweithäufigste Todesursache in Deutschland ist der akute Myokardinfarkt (Herzinfarkt) (Statistisches_Bundesamt, 2014). Außerdem beinhaltet die Liste der zehn häufigsten Todesursachen den Schlaganfall, der auch durch einen Thrombus bedingt sein kann (Statistisches_Bundesamt, 2014). Der Effekt der antithrombotischen Medikamente auf die Mortalitätsrate ist trotz starker Investitionen in die Entwicklung dieser Medikamente bisher noch gering (Antithrombotic_Trialists'_Collaboration, 2002, Sikka and Bindra, 2010, Darmon et al., 2018). Insbesondere das erhöhte Blutungsrisiko als Nebenwirkung vieler neuer antithrombotischer Medikamente ist dabei ein großes Problem.

Es werden zwei unterschiedliche Lokalisationen der Thrombose unterschieden: die arterielle und die venöse Thrombose. Als Lokalisationen der arteriellen Thromben sind die Aorta, die Koronargefäße, die Karotiden, die zerebralen Gefäße und die Extremitäten zu nennen (Herold, 2014). Venöse Thromben sind vor allem in den Beinvenen, Beckenvenen und der V. cava inferior zu finden (Berger et al., 2014). Die arterielle Thrombose entwickelt sich in den meisten Fällen nach einer Ruptur eines instabilen atherosklerotischen Plaques, wodurch stark thrombogene Bestandteile freigelegt werden. Es folgt auf zellulärer Ebene die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der verletzten Gefäßwand. Atherosklerotische Plaques entstehen durch Ablagerungen von Fetten, Thromben, Bindegewebe und auch Kalk in den Gefäßwänden. Ihre Ruptur kann durch entzündliche Prozesse ausgelöst werden (Jackson, 2011). Zu den bekanntesten Folgen einer arteriellen Thrombose zählen der Schlaganfall (Apoplex), bei dem es durch eine Durchblutungsstörung des Gehirns zu einem Absterben von Hirngewebe kommt, und der Herzinfarkt (Myokardinfarkt), einer Durchblutungsstörung des Herzens (Falk, 1985). Eine weitere Erkrankung, bei der es auf dem Boden einer Arteriosklerose zu einem Verschluss von Arterien kommen kann, ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Sie ist in über 90 % in der unteren Extremität lokalisiert. Hier können Becken-, Oberschenkel- sowie Unterschenkel- und Fußarterien betroffen sein. Bei der pAVK zeigen sich stenosierende Veränderungen der Arterien. Als Komplikation kann es zu einem akuten

Arterienverschluss durch eine Thrombose oder Embolie aus arteriosklerotischen Plaques kommen (Herold, 2014).

1.4 Medizinische Relevanz der Arbeit

Die Hämostase stellt einen wichtigen Mechanismus im menschlichen Organismus dar, dessen Funktion auf dem Zusammenspiel verschiedenster Faktoren beruht. Einerseits muss gewährleistet werden, dass Verletzungen von Gefäßen schnell verschlossen werden, andererseits darf die Hämostase auch nicht zu sensibel reagieren und womöglich ohne eine tatsächliche Gefäßverletzung einsetzen. Es gibt zahlreiche Pathologien, die im Zusammenhang mit einer fehlgeleiteten Hämostase stehen. Dabei werden die unerwünschte Entstehung von Thromben wie es bei der venösen Thrombose, dem Herzinfarkt und dem Schlaganfall der Fall ist (Nieswandt et al., 2011) und die fehlende oder verzögerte Gerinnung, wie beispielsweise bei der Hämophilie oder dem Willebrand-Jürgens-Syndrom (Kumar and Carcao, 2013) unterschieden. Um eine gute Versorgung von Patienten mit Gerinnungsstörungen zu gewährleisten, müssen alle Parameter geklärt sein, die Einfluss auf die Gerinnung haben. Aus diesem Grund ist das medizinische Interesse an der Grundlagenforschung am komplexen Mechanismus der Hämostase groß. Zwar gibt es schon zahlreiche therapeutische Ansätze, die Störungen in der Blutgerinnung positiv beeinflussen können, jedoch haben diese meist auch die Nebenwirkung einer vermehrten Blutungsneigung. So werden zur Prophylaxe venöser Thrombosen Antikoagulanzen, also Gerinnungshemmer, eingesetzt, zu denen beispielsweise Heparin, direkte Thrombininhibitoren und Cumarine (Marcumar®) zählen. Zur Prophylaxe arterieller Thrombosen hingegen werden Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS) sowie P2Y₁₂-Antagonisten verwendet (Plosker and Lyseng-Williamson, 2007). Doch alle diese Medikamente bergen die Gefahr eines erhöhten Blutungsrisikos (Herold, 2014). Daher ist das Ziel der aktuellen Forschung, spezifisch die Thrombose zu verhindern ohne die Hämostase zu beeinträchtigen. Aus diesem Grund müssen neue therapeutische Ansätze gefunden werden.

Den Erythrozyten wurde lange eine eher untergeordnete Rolle im Rahmen der Gerinnung zugeordnet. Doch im Laufe der letzten Jahre hat sich durch vor allem klinische Erfahrungen gezeigt, dass die Rolle der Erythrozyten größer ist als bisher vermutet wurde (Turitto and Weiss, 1980, Lier et al., 2007, Valeri et al., 2001).

Die Rolle der Erythrozyten bei der Hämostase ist noch nicht vollständig geklärt.

Neue Erkenntnisse über den Einfluss von Erythrozyten auf die Hämostase und Thrombose können dabei helfen, Zielstrukturen für neue Therapieformen zu identifizieren und somit die Behandlung von Störungen der Hämostase und Bildung von Thrombose voranzutreiben.

1.5 Ziele der Arbeit/ Hypothese

In Vorarbeiten sowie in Versuchen, die in unserer Arbeitsgruppe durch den Masterstudenten Christoph Klatt durchgeführt worden sind, konnte gezeigt werden, dass plättchenreiches Plasma (PRP) allein nicht dazu in der Lage ist Thromben auf einer Kollagenmatrix unter Flussbedingungen zu bilden. Die Thrombus-Bildung in Anwesenheit von Erythrozyten stieg hingegen in Abhängigkeit von der Anzahl der Erythrozyten (Klatt et al., 2018). Welche Ursachen hier zugrunde liegen und welche Bedeutung den Erythrozyten in diesem Prozess zukommt, war jedoch zu Beginn der Arbeit unbekannt.

Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Erythrozyten auf die Hämostase und Thrombose näher untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf der Identifikation der direkten Interaktionspartner zwischen Erythrozyten und Thrombozyten, deren Interaktion eine Thrombus-Bildung vorantreibt, da Vorarbeiten bereits gezeigt hatten, dass allein der Überstand von aktivierten Thrombozyten keinen Einfluss auf die Thrombus-Bildung hat.

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass von Erythrozyten exponiertes Phosphatidylserin die Thrombusbildung positiv beeinflusst, da eine Blockierung der Phosphatidylserine auf Erythrozyten durch AnnexinV die Thrombusbildung signifikant reduziert (Klatt et al., 2018).

Zudem war bekannt, dass durch die Phosphatidylserin-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten eine prothrombotische Oberfläche seitens der Erythrozyten geschaffen wird, die die Bildung des Prothrombinasekomplexes unterstützt und letztendlich zu einer erhöhten Thrombingenerierung führt (Peyrou et al., **1999**). Das Thrombin führt dann zu einer Aktivierung der Thrombozyten.

Aus dem Bereich der Apoptose ist bekannt, dass eine Interaktion zwischen dem Fas-Liganden und dem Fas-Rezeptor eine Phosphatidylserin-Exposition und schließlich den Zelltod zur Folge hat.

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob der Fas-Ligand der Thrombozyten und der Fas-Rezeptor der Erythrozyten als Interaktionspartner fungieren und eine Interaktion zu einer Phosphatidylserin-Exposition auf Erythrozyten führt, die die Thrombus-Bildung unterstützen kann. Beide Interaktionspartner wurden schon auf den jeweiligen Zellen nachgewiesen; eine Interaktion in diesem Zusammenhang aber noch nicht nachgewiesen (Ahmad et al., **2001**, Mandal et al., **2005**).

Durch die Interaktion dieser beiden Interaktionspartner wird ein Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels vermutet. Es ist bekannt, dass es durch den Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels zur Aktivierung der Phospholipidscramblase kommt, woraufhin Phosphatidylserine auf der Außenseite der Phospholipid-Doppelschicht exponiert werden (Basse et al., **1996**). Die hier dargelegte Hypothese wird in der Abbildung 2 veranschaulicht. Zusammenfassend lassen sich die Ziele dieser Arbeit folgendermaßen formulieren: Es sollen die Interaktionspartner, also der hier vermutete Fas-Ligand und den Fas-Rezeptor, auf den Zellen nachgewiesen sowie die Auswirkung der Interaktion anhand der Phosphatidylserin-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten und Thrombozyten gezeigt werden. Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich auch die Thrombingenerierung nachweisen lässt.

Die Hypothese soll mithilfe unterschiedlicher modernster Methoden und unter Berücksichtigung neuester Erkenntnisse zur Hämostase und Thrombose überprüft werden. Dazu werden *in vitro* Versuche durchgeführt, die die physiologischen Bedingungen der Blutgerinnung nachstellen. Zusätzlich wird die Hypothese in Bezug auf pathologische Bedingungen anhand von humanen arteriellen Thromben untersucht. Das Ergebnis sollte dazu beitragen, die Mechanismen der Thrombus-Bildung insbesondere der arteriellen Thromben weiter zu entschlüsseln, um neue Zielstrukturen für die Therapie von arteriellen Thrombosen wie dem Schlaganfall oder dem Myokardinfarkt zu identifizieren.

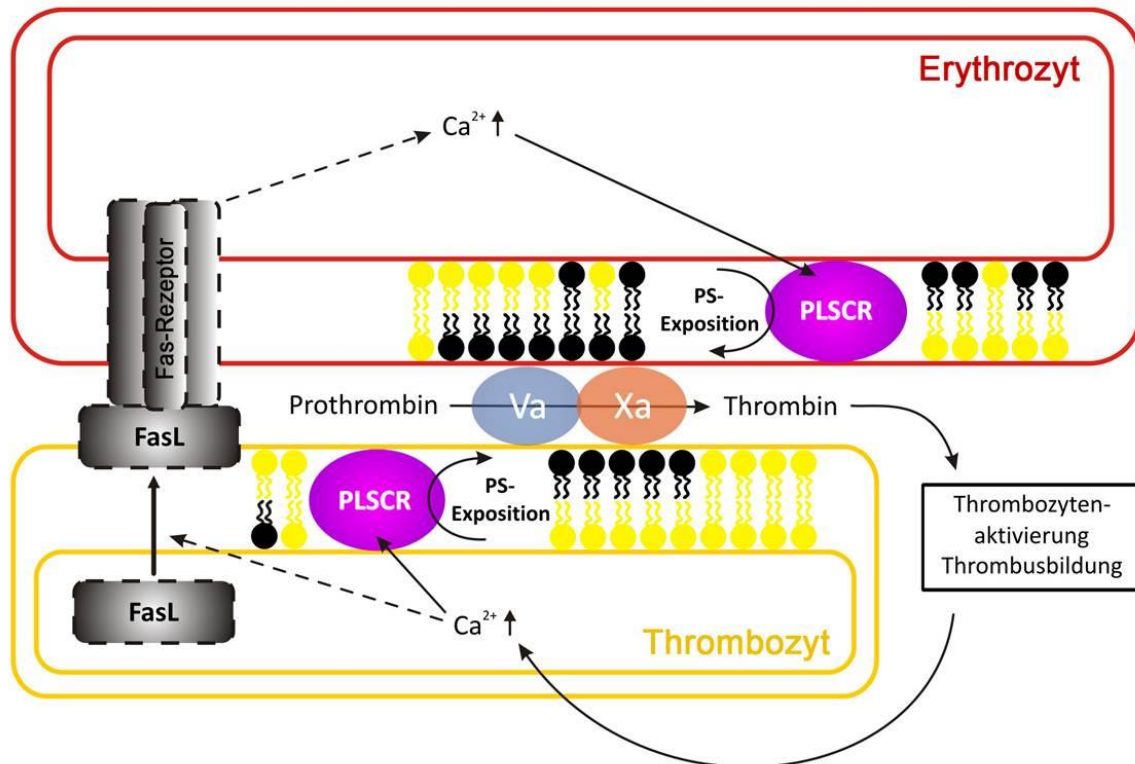


Abb. 2: Darstellung der Hypothese

Die initiale Aktivierung der Thrombozyten (gelb dargestellt) hat eine Aktivierung der Phospholipids scramblase (PLSCR) zur Folge, wodurch es zur Exposition von Phosphatidylserin (PS, schwarz dargestellte Phospholipidmoleküle) auf der Oberfläche kommt. Die Exposition der PS begünstigt die Bildung des Prothrombinasekomplexes, der aus Faktor Va, Xa, Ca^{2+} und den negativ geladenen Phospholipiden besteht. Es folgt die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch diesen Komplex. Durch die Thrombozytenaktivierung wird zusätzlich der Fas-Ligand auf deren Oberfläche exponiert. Durch eine Interaktion des Fas-Liganden (Fas-L) der Thrombozyten mit dem Fas-Rezeptor auf der Membran der Erythrozyten (rot dargestellt), wird ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Erythrozyten ($\text{Ca}^{2+} \uparrow$) angenommen. Die erythrozytäre Phospholipids scramblase wird aktiviert und PS exponiert. Auf diese Weise unterstützen auch die Erythrozyten die Bildung des Prothrombinasekomplexes. Aufgrund der großen Oberfläche der Erythrozyten kann so mehr Thrombin generiert werden als es durch die Thrombozyten allein möglich ist. Thrombin ist dann wiederum in der Lage weitere Thrombozyten zu aktivieren (schwarzer Kasten) sowie die Stabilisierung des Thrombus durch Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zu induzieren. Es kommt zur Thrombus-Bildung und -Stabilisierung. Hypothetische Moleküle werden in grau und in gestrichelten Linien dargestellt.

Diese Abbildung wurde von meinem Vorgänger Christoph Klatt und mit seinem Einverständnis übernommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

Gerät	Firma (Sitz)
Autoklav	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Automatischer Hämatologie-Analysator (KX-21N)	Sysmex (Norderstedt, Deutschland)
Blutentnahme-Röhrchen (Citrat, Vacutainer)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
DC-Imager	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Doppler-Sonde (Transonic® Flowprobe)	Transonic Systems Inc. (Ithaca, NY, USA)
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Elektrophoresekammer	BioRad (München, Deutschland)
Eppendorf Zentrifuge 5415C und 5424R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Feuchtekkammer	Simpore Inc. (West Henrietta, NY, USA)
Flusskammer	Maastricht Instruments (Maastricht, Niederlande)
Heizplatte	Ikamag RCT (Staufen, Deutschland)
Kamera AxioCam 105 Color	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)
Mikrotom Heidelberg HM400	Microm GmbH (Heidelberg, Deutschland)
pH-Meter pH540 GLP	WTW (Weilheim, Deutschland)
Semi-Dry-Elektroblotter	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Spannungsquelle (PowerPac Universal)	BioRad (München, Deutschland)
Thermoschüttler TS-100C	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
T-TAS (Total Thrombus-formation Analyzing System)	ZACROS FUJIMORI KOGYO CO., Japan
Vortexer	Cenco instrumenten (Breda, Niederlande)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Wärmeschrank BE 300	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich (Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
Zentrifuge 2-16P	Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma (Sitz)
2,5,10,20 ml Spritzen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
1 ml Spritze mit Spardorn	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
24x60 mm Deckgläser	Engelbrecht, Medizin und LaborTechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
BD Falcon™, Zellsieb 40 µm	BD Bioscience (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
BD Vacutainer® Citratröhrchen (4,5ml)	Becton, Dickinson and Company, Belliver Industrial State, Plymouth, UK
BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton, Dickinson and Company, Belliver Industrial State, Plymouth, UK
Combi-Stopper-Verschlußskonen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)

24 x 60 mm Deckgläser	Engelbrecht, Medizin und LaborTechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
„Flow cytometry“ Röhrchen (5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Kollagenes Horm (Typ I)	Takeda (Osaka, Japan)
Membranen (Hybond-ECL-Nitrocellulose)	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Mikrotom-Klingen, Feather, R35	Pfm medical AG (Köln, Deutschland)
Parafilm „M“	BEMIS (Neenah, WI USA)

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Sitz)
Accutase	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Deutschland)
Adenosin 5'-diphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Acrylamidfertiglösung	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
6-Aminocarbonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
AnnexinV-Cy5	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
β-Mercaptoethanol	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
CRP (collagen-related peptide)	Department of Biochemistry (University of Cambridge, England)
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Eisen(III)-chloridlösung nach Weigert, Weigert II (B)	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig, Deutschland)
Essigsäure (≥99,7%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) und Zentralapotheke der Uniklinik Düsseldorf
Fluoromount	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
4 % Formaldehydlösung	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Hämatoxylinlösung nach Weigert, Weigert I (A)	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig, Deutschland)
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Lichtgrün SF (gelblich), CERTISTAIN®	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Orange G	Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma® (Münster, Deutschland)
Paraffin 50-52°C	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Ponceau S Färbung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Proteaseinhibitor Mini Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim, Deutschland)
Quinacrine Dihydrochlorid (Mepacrine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Roti®-Histokitt (synthetisches Einschlußmittel, für die Histologie)	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Histol (für die Histologie)	Carl ROTH GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Säurefuchsin (für die Mikroskopie)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Kits

Name	Firma (Sitz)
Chemolumineszenzsystem ECL Kit (Immuno-Star Western C)	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Enzygnost® TAT micro Kit	Siemens Healthcare Diagnostics (München, Deutschland)
Enzygnost F1+2 (monoclonal) Kit	Siemens Healthcare Diagnostics (München, Deutschland)

2.1.5 Peptide und Massenstandards

Precision Plus Protein Western C	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Precision Plus Protein Dual Color Standard	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Precision Protein StrepTactin HRP-Conjugate	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)

2.1.6 Antikörper

Anti-mouse-IgG	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
IgG 1 κ Isotype control	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
CD42a-FITC (Anti-GPIX)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
CD42a-PE (Anti-Human)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
CD45-PE (Anti-Human)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
CD62P-FITC (Anti-Human)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
CD-235a-FITC (Glycophorin A)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
CD95-Antikörper	GeneTex (Irvine, Kalifornien, USA)
Fas-PE (monoclonal Antibody to CD95)	Acris Antibodies GmbH (Herford, Deutschland)
PE anti-human CD178 (Fas-L)	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)
Recombinant Human DcR3/TNFRSF6B (Fc Chimera)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Recombinant Mouse Fas/TNFRSF6/CD95 Fc Chimär	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.7 Biologische Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes Blut von gesunden Probanden im Alter von 18 bis 50 Jahren verwendet. Außerdem wurden abgelaufene Erythrozytenkonzentrate (EK) des Universitätsklinikums Düsseldorf verwendet. Diese EK wurden für insgesamt mindestens 42 Tagen gelagert und erst dann verwendet.

In Zusammenarbeit mit Prof. Schelzig und Dr. Oberhuber aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde Probenmaterial nach Thrombektomien in Form von Vollblut und arteriellen Thromben unterschiedlicher Patienten entnommen. Das Vollblut dieser Patienten wurde uns für unterschiedliche Analysen zur Verfügung gestellt. Die Thromben sind patientenspezifisch an verschiedenen Lokalisationen im arteriellen Gefäßsystem entstanden und wurden im Rahmen einer gefäßchirurgischen Operation entfernt. Insgesamt wurden 29 Thromben untersucht. 16 Thromben entstammten männlichen Patienten, 13 weiblichen Patienten. Das Alter betrug durchschnittlich 69 Jahre. Weitere Angaben zu den Patienten befinden sich im Anhang (s. 6.2). Der dazu benötigte Ethikantrag liegt vor (Studiennummer 4669, Registrierungs-ID 2014042327).

Zudem umfasst diese Arbeit Untersuchungen von murinen arterielle Thromben aus Carotiden pathogen-freier C57BL/6J (Wildtyp) Mäuse. Die Operationen der Mäuse wurden von der Tierärztin Frau Gowert durchgeführt. Die dazu benötigte Tierversuchsgenehmigung liegt vor (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV), AZ 84-02.04.2013.A210).

2.1.8 Lösungen und Puffer

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung
10x Bindepuffer	0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂ , pH 7,4
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS in dH ₂ O
Erythrozytenlysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % SDS, 1 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 0,4 % β-Mercaptoethanol, Protease Inhibitor Cocktail
Karnovski-Lösung	3% Formaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4
6x Lämmli-Puffer	0,375 M Tris/HCl pH 6,8, 12 % SDS, 30 % β-Mercaptoethanol, 60 % Glycerin, 0,012 % Bromphenolblau
Ringer Lösung	125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 32 mM HEPES, 5 mM Glukose, 1 mM oder 2,5 mM CaCl ₂ , pH 7,4
4x Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris pH 6,8, 0,4 % SDS in dH ₂ O
Tris-buffered-Saline-Tween (TBST)	20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7,3, 0,1 % Tween20
4x Trenngel-Puffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % SDS in dH ₂ O
Tyrode Puffer (human)	137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,5 mM Glucose

2.1.9 Software

Bezeichnung	Firma (Sitz)
ChemiDoc XRS System	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
ZEN 2012 (blaue Edition)	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Trennung der zellulären Blutbestandteile

Von gesunden Spendern wurden 4,5 ml Vollblut in Citratröhrchen (129 mM, 1:10) bereitgestellt. Aus einem Röhrchen wurden pro Spender sowohl Thrombozyten als auch Erythrozyten isoliert.

Isolierung von Thrombozyten:

Das in dem Citratröhrchen enthaltene Vollblut wird bei 200 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei sollte möglichst sanft gestartet und gestoppt werden. Der entstandene gelblich-trübe Überstand wird als plättchenreiches Plasma (PRP) bezeichnet.

In ein 15 ml -Falcon werden 2 ml PBS (pH 6,5), 2,5 U/ml Apyrase (ADP-Scavenger), 1 μ M PGE₁ (Prostazyklin; es inhibiert die Thrombozytenaktivierung durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels) und 2 ml PRP gefüllt, vorsichtig gemischt und erneut bei 600 g für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und das so entstandene Pellet wird mit 200 μ l Tyrode vor Austrocknung geschützt. Nach dem 5-minütigen Ruhen bei Raumtemperatur wird das Pellet durch auf- und abpipettieren resuspendiert.

Isolierung von Erythrozyten:

Eine mit einem Stopfen (Combi-Stopper-Verschlusskone) verschlossene Spritze (20 ml) wird mit dem restlichen Blut, von dem das PRP abgenommen wurde, befüllt, mit Parafilm verschlossen und in ein 20 ml-Falcon gestellt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgt bei 800 g für 15 Minuten. Danach wird das Plasma abgenommen und verworfen. Nun muss das Erythrozyten-Pellet in das 50 ml-Falcon überführt und von den Leukozyten getrennt werden, wofür der Stopfen von der Spritze gelöst wird, sodass das Erythrozyten-Pellet langsam herauströpft. In diesem Schritt bildet sich eine weiße Schicht auf dem Erythrozyten-Pellet, die die Leukozyten enthält und somit nicht die Spritze verlassen darf. Zu den Erythrozyten wird dann das 5-fache Volumen kalter Kochsalzlösung (154 mM) gegeben und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen. Dieser zuletzt beschriebene Waschvorgang sollte mindestens zweimal durchgeführt werden. Nach Abschluss dieses Waschvorgangs besteht das entstandene Pellet aus isolierten Erythrozyten.

Herstellung von plättchenarmen Plasma (Platelet Poor Plasma, PPP)

Das plättchenarme Plasma (PPP) wird aus dem plättchenreichen Plasma (PRP) hergestellt. Das PRP wird bei 800 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird dann als PPP bezeichnet.

2.2.2 Probenaufbereitung für den Western Blot

Die Erythrozyten werden wie unter 2.2.1. beschrieben isoliert und Verdünnungen mit einer Erythrozytenzahl von $1 \times 10^5/\mu$ l, $5 \times 10^5/\mu$ l und $1 \times 10^6/\mu$ l erstellt. Die Zellzahl wird dabei mit dem automatischen Hämatologie-Analysator bestimmt. Zur Verdünnung wird ein Erythrozytenlysepuffer verwendet. Über Nacht findet die Lyse im Kühlschrank bei 4 °C unter ständiger Rollbewegung statt. Am nächsten Morgen erfolgt die Zentrifugation bei 4 °C und 8400 g für 10 Minuten. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit der entsprechenden Menge 6x Lämmli-Puffer versehen. Zur Denaturierung der Proteine für die SDS-PAGE werden die Proben vor dem Einfrieren bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Die im Lämmli-Puffer enthaltenen SDS-Moleküle lagern sich dabei an die Proteine und verleihen diesen so eine negative Ladung.

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Proteinanalyse wird zunächst eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden ein Sammel- und ein Trenngel benötigt, die nacheinander gegossen werden. Die Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngel-Puffers ist dem Punkt 2.1.8. zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bestandteile	Trenngel 8%	Sammelgel
4x Sammelgel-Puffer; pH 6,8	-	1,25 ml
4x Trenngel-Puffer; pH 8,8	3,75 ml	-
dH ₂ O	7,25 ml	3,05 ml
Acrylamid 30 %	4 ml	650 µl
APS 10 %	100 µl	25 µl
TEMED	100 µl	5 µl

Die Lysate (50 µl) und ein Zwei-Komponenten-Molekulargewichtsmarker (6 µl Precision Plus Protein Western C und 2 µl Precision Plus Protein Dual Color) werden auf das Gel aufgebracht und bei 25 mA aufgetrennt.

2.2.2.2 Western Blot Analyse

Die Proteine werden mittels einer Transferkammer vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran mit der „Semidry“-Methode übertragen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Blotpuffer

Bestandteile	Blotpuffer A	Blotpuffer B	Blotpuffer C
Tris; pH 10,4	0,3 M	25 mM	-
MeOH	20 %	20 %	20 %
6-Aminocarbonsäure	-	-	40 mM

Für den Blotaufbau werden insgesamt 12 Filterpapiere benötigt. Der Aufbau beginnt ganz unten mit der Anode. Auf die Anode folgen 3 in Blotpuffer A getränkte Filterpapiere. Darauf folgen 3 mit Blotpuffer B versehene Filterpapiere. Darüber werden die Nitrocellulosemembran und darauf das SDS-Gel platziert. Abgeschlossen wird das Ganze mit 6 in Blotpuffer C getränkten Filterpapieren. Es folgt die Kathode. Zur Übertragung wird ein Stromfluss von 70 mA pro Gel für 1 Stunde angelegt. Die Proteine werden auf die Membran übertragen, in dem sie einer gerichteten Spannung von der Kathode zur Anode folgen. Anschließend lässt sich der Erfolg des Transfers mit der Ponceau S-Färbung überprüfen. Die Membran muss dann wieder mit destilliertem Wasser und Natronlauge entfärbt werden. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5 % Milchpulver in 0,1 % TBST) gegeben. Darauf folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:500 Maus-Anti-CD95-Antikörper) in 5 % BSA in TBS-T bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T für 10, 5 und 5 Minuten bei Raumtemperatur werden überschüssige oder unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die

Inkubation der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (1:1000 Anti-mouse-IgG) und StrepTactin (1:2500) in der Blockierlösung. Nach einem erneuten dreimaligen Waschvorgang der Membran in TBS-T werden die Banden mittels verstärkter Chemielumineszenz (ECL, „*enhanced chemiluminescence*“) detektiert und mit dem ChemiDoc XRS System dokumentiert. Die ECL-Lösung wird dazu aus 1 ml destilliertem Wasser sowie 500 µl Peroxidaselösung und 500 µl Luminol/*enhancersolution* (*Western ECL Blotting Substrate*) hergestellt und gleichmäßig auf der Membran verteilt bevor die Detektion beginnt.

2.2.3 Statische Versuche

Für die statischen Versuche werden nach Trennung der Blutkomponenten die Erythrozyten und Thrombozyten bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle mithilfe des Durchflusszytometers untersucht. In den statischen Versuchen werden die isolierten Blutbestandteile verdünnt: Thrombozyten werden in einer Verdünnung von 100.000 Zellen/µl eingesetzt und Erythrozyten in einer Verdünnung von 40.000 Zellen/µl. Diese Zellzahlen haben sich für die Untersuchung im Durchflusszytometer als sinnvoll ergeben. Die Verdünnung erfolgt entweder mit Tyrode oder mit Bindepuffer.

Folgende Ansätze werden für die statischen Versuche hergestellt:

1) 50 µl Erythrozyten (frisch, verdünnt)
2) 50 µl Erythrozyten (alt, verdünnt)
3) 50 µl Thrombozyten (ruhend, verdünnt)
4) 50 µl Thrombozyten (aktiviert, verdünnt)
5) 25 µl Erythrozyten (verdünnt) + 25 µl Thrombozyten (ruhend, verdünnt)
6) 25 µl Erythrozyten (verdünnt) + 25 µl Überstand (Thrombozyten, ruhend, verdünnt)
7) 25 µl Erythrozyten (verdünnt) + 25 µl Thrombozyten (aktiviert, verdünnt)
8) 25 µl Erythrozyten (verdünnt) + 25 µl Überstand (Thrombozyten, aktiviert, verdünnt)
9) 25 µl Erythrozyten (alt, verdünnt) + 25 µl Thrombozyten (ruhend, verdünnt)
10) 25 µl Erythrozyten (alt, verdünnt) + 25 µl Thrombozyten (aktiviert, verdünnt)

Aktivierung von Thrombozyten mit CRP:

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt mit 5 µg/ml CRP (*collagen-related-peptide*). CRP stellt ein synthetisches Kollagen dar, durch das die Interaktion im Rahmen einer Gefäßverletzung nachgeahmt werden kann und es als Thrombozytenagonist zu einer Thrombozytenaktivierung führt. Es ist ein Peptid, das wiederholte GPO (Glycin, Prolin, Hydroxyprolin)-Sequenzen enthält. Für GPO-Sequenzen gilt die Besonderheit, dass gerade diese eine linksgängige Helix bilden und zusammen mit zwei weiteren Ketten eine rechtsgängige Superhelix entsteht, die für die Interaktion mit dem Kollagenrezeptor notwendig ist. CRP interagiert dabei als selektiver Agonist mit GP VI (Nieswandt and Watson, 2003).

Aktivierung von Thrombozyten mit ADP:

Für manche Versuche erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten mit Adenosin 5'-diphosphat (ADP). Von der 20 mM -Stammlösung wird final eine Konzentration von 10 µmol eingesetzt.

„Alte“ Erythrozyten:

Bei den „alten“ Erythrozyten handelt es sich um Erythrozyten, die aus aussortierten Erythrozytenkonzentraten der universitätsklinikinternen Blutbank entnommen werden. Die Erythrozytenkonzentrate werden nach 30 Tagen verworfen und nicht mehr für Transfusionen eingesetzt. Die hier als „alt“ bezeichneten Erythrozyten sind mindestens 42 Tage alt.

Inkubation mit Überständen:

In verschiedenen Ansätzen werden die Überstände von ruhenden beziehungsweise aktivierten Thrombozyten verwendet. Zur Aktivierung werden die Thrombozyten zuvor für 5 Minuten mit CRP inkubiert. Anschließend werden die Thrombozyten bei 525 g für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zu den Erythrozyten gegeben.

Nach einer 10-minütigen Inkubation dieser Ansätze bei Raumtemperatur können die FACS-Röhrchen für die Durchflusszytometrie vorbereitet werden.

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der eine Quantifizierung von Oberflächenmolekülen möglich ist. Diese werden mithilfe von Fluoreszenz-markierten spezifischen Antikörpern nachgewiesen indem diese Antigen-Antikörper-Reaktionen eingehen. Eine besondere Form der Durchflusszytometrie stellt das hier verwendete FACS dar. Der Begriff FACS ist eine Abkürzung für „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“. Beim FACS findet zusätzlich eine Zellsortierung anhand von Fluoreszenzen statt. Mithilfe von einem elektrostatischen Sortiermechanismus werden die zu sortierenden Zellen in unterschiedliche Gefäße überführt.

Als Untersuchungsmaterial für die Durchflusszytometrie dienen Einzelzellsuspensionen, von der die einzelnen Zellen durch eine Kapillare gesaugt werden und einzeln die Durchflusszelle, auf die ein Laserstrahl gerichtet ist, passieren. Dabei entsteht Streu- und Fluoreszenzlicht, das separat detektiert und ausgewertet wird und nach dem die Zellen charakterisiert werden.

Mithilfe der Lichtstreuung lassen sich die Zellen nach ihrem Volumen (*Forward Scatter*=FSC) und ihrer Granularität (*Side Scatter*=SSC) charakterisieren, was in einem *Dot Plot*, in dem die Zellen nach diesen beiden Charakteristiken aufgeteilt sind, dargestellt wird. Das entstehende Fluoreszenzsignal ist abhängig von den eingesetzten Antikörpern. Die Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, sind gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden in dieser Arbeit PE (R-Phycocerythrin), FITC (Fluorescein Isothiocyanat) und Cy5 (Indodicarbocyanin 5) verwendet. Alle drei Farbstoffe können in einem Durchflusszytometer eingesetzt werden, das mit einem Laser ausgestattet ist, der 488 nm-Licht emittiert sowie 633 nm-Licht, welches speziell für Cy5 benötigt wird. Für PE liegt der Höchstwert der Emission bei 575 nm, was im FL-2-Kanal detektiert wird. Für FITC liegt der Höchstwert der Emission bei 525 nm, was im FL-1-Kanal detektiert wird und für Cy5 liegt der Höchstwert der Emission bei etwa 667 nm, was im FL-4-Kanal detektiert wird. Es sind auch Mehrfachfärbungen möglich, sodass aus einer Messung Informationen über mehrere Proteine gewonnen werden können. Dies setzt aber voraus, dass einerseits verschiedenfarbige Laser vorhanden sind und andererseits, dass sich die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts der benutzten Fluorophore unterscheidet.

Die aus den Messungen gewonnene Information wird dann in Form von sogenannten *Dot Plots* und Histogrammen dargestellt.

Für jeden Antikörper muss die Erstellung eines Messfensters (Aquisition-Fenster) erfolgen, die mithilfe von unspezifischen Antikörpern (IgG-Kontrollen) vorgenommen wird. Werden

mehrere Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig verwendet, ist es notwendig eine Kompensation durchzuführen, da sich die Emissionsspektren der unterschiedlichen Farbstoffe (beispielsweise FITC und PE) überlappen können. Ziel der Kompensation soll die korrekte Quantifizierung des einzelnen Farbstoffes, mit dem die Zellen markiert sind, und eine weitgehende Trennung der Emissionsspektren sein.

Unter 2.1.6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet. Es handelt sich um standardisierte Antikörper, die ohne Vorverdünnung direkt verwendet werden können. Pro Probe werden 5 µl des jeweiligen Antikörpers in einem Durchflusszytometrie-Röhrchen vorgelegt. Dann werden 50 µl der zu untersuchenden Zellsuspension hinzugefügt, woraufhin eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit erfolgt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Färbung mit 400 µl PBS abgestoppt. Besonderheiten der einzelnen Antikörper in ihrer Anwendung sind im Folgenden beschrieben.

Antikörper

Klassifizierung von Zellpopulationen:

Um verschiedene Zellpopulationen zu unterscheiden, kann einerseits die Größe und Granularität der Zellen herangezogen werden, die sich mithilfe des *Forward Scatter* und *Side Scatter* charakterisieren lässt, andererseits werden sogenannter *Gating*-Antikörper verwendet, falls eine Population im *Forward* oder *Side Scatter* schwer abzugrenzen ist. Die Verwendung von *Gating*-Antikörpern ist vor allem bei der Analyse der inhomogenen Thromben von Vorteil. *Gating*-Antikörper sind Antikörper, die eine bestimmte Zellpopulation charakterisieren und anhand von denen *Gates* gesetzt werden können.

So werden CD42a-PE oder CD42a-FITC zum Auffinden von Thrombozyten verwendet, da CD42 ein Glykoprotein ist (Glykoprotein Ib), das nur auf der Oberfläche von Thrombozyten und Megakaryozyten zu finden ist und der Antikörper daher auch nur diese Zellen anfärbt. In einem *Dot Plot* können alle CD42a-positiven Zellen angezeigt und ein *Gate* gesetzt werden, mit dem nur Thrombozyten erfasst werden.

CD235a-FITC hingegen markiert Erythrozyten. CD235 ist auch als Glykophorin A bekannt und wird auf erythroiden Vorläuferzellen, Retikulozyten und Erythrozyten exprimiert. Mithilfe dieses Antikörpers kann ein *Gate* erstellt werden, das nur Erythrozyten erfasst.

Aktivierungsnachweis für Thrombozyten:

Der Antikörper CD62P-PE markiert P-Selektin, ein granuläres Membranprotein, das sich im Falle einer Aktivierung auf der Oberfläche von Thrombozyten zeigt. Es wird in den α-Granula der Thrombozyten gespeichert und gilt als Zelladhäsionsmolekül.

Phosphatidylserin (PS):

Um die auf der Oberfläche von Zellen exponierten Phosphatidylserine zu markieren wird das Protein Annexin V genutzt, das in Anwesenheit von Kalziumionen an Phosphatidylserine binden kann. Hierbei handelt es sich um ein 35 bis 36 kDa großes Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserinen. Es bindet an Zellen, die Phosphatidylserine exponieren.

Das hier verwendete Annexin V ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff CyTM5 markiert. Bei der Färbung von Zellen mit Annexin V -CyTM5 gibt es die Besonderheit, dass Ca²⁺-Ionen anwesend sein müssen, damit die Bindung erfolgen kann. Um dies zu gewährleisten wird ein Bindepuffer hergestellt, der 2,5 mM CaCl₂ enthält. In diesem Bindepuffer muss die zu untersuchende Zellsuspension auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt sein. In einem FACS-Röhrchen werden 4 µl Annexin V -CyTM5 vorgelegt und 50 µl der Zellsuspension hinzugefügt. Darauf folgt eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Färbung wird mit jeweils 400 µl Bindepuffer gestoppt. Die durchflusszytometrische Messung sollte innerhalb der nächsten halben Stunde durchgeführt werden. AnnexinV-Cy5 darf niemals während der Inkubationszeit zu den Ansätzen hinzugegeben werden, da auch neutralisierende Eigenschaften auf die

Phosphatidylserine dieses Proteins bekannt sind und somit die Interaktion zwischen Thrombozyten und Erythrozyten gestört werden könnte.

Fas-Ligand (Fas-L):

Zur Markierung des Fas-Liganden, der auch als CD178 oder CD95L bezeichnet wird, wird der PE-markierte anti-humane CD178-Antikörper verwendet. CD178 gehört zur TNF-Familie und ist auf aktivierten T-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert. CD178 bindet an CD95, um eine Apoptose zu induzieren.

Unspezifische Bindung:

Als Kontrollen für die spezifischen Antikörper-Färbungen, werden unspezifische IgG-Antikörper eingesetzt. Es wurde ein FITC- und ein PE-markiertes IgG eingesetzt.

2.2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung in den statischen Versuchen

Mit dem Durchflusszytometer werden die Oberflächenmarker wie der Fas-Ligand und P-Selektin auf den Thrombozyten und die PS-Exposition auf den Erythrozyten in verschiedenen Ansätzen von aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten mit und ohne Erythrozyten gemessen. Die Messung der PS-Exposition der Zellen mit Annexin V erfolgt in Bindepuffer, um eine Bindung des Annexin V an die Phosphatidylserine zu gewährleisten. So ergeben sich aus den oben aufgeführten Vorinkubationen (s. 2.2.3) verschiedene Ansätze zur Untersuchung in der Durchflusszytometrie. Zur Markierung der Thrombozyten wurde der Antikörper CD42-FITC (5 µl pro Ansatz) verwendet. Der Nachweis des Fas-Liganden erfolgte mit dem Antikörper Fas-L-PE (5 µl pro Ansatz). Der Nachweis des Oberflächenmarkers P-Selektin erfolgte mit dem Antikörper CD62-PE (5 µl pro Ansatz). Zur Markierung der Erythrozyten wurde der Antikörper CD235-FITC (5 µl pro Ansatz) verwendet. Die Darstellung der PS-Exposition erfolgte mit dem Antikörper Annexin-Cy5 (4 µl pro Ansatz).

Es erfolgt eine 20-minütige Inkubation der verschiedenen Ansätze bei Raumtemperatur in Dunkelheit, um eine Bindung der Antikörper und somit eine Färbung zu gewährleisten. In Anschluss an diese Zeit folgt das Abstoppen der Färbung durch eine Verdünnung der Proben. Alle Proben, die den Antikörper Annexin-Cy5 enthalten, werden mit 400 µl Bindepuffer verdünnt. Alle anderen Proben werden jeweils mit 400 µl PBS verdünnt.

2.2.3.3 Thrombinnachweis (TAT und PTF)

Als Maß für die Thrombingenerierung wurde die Bestimmung von Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT) und humanem Prothrombinfragment F 1+2 (PTF 1+2) mithilfe der Enzygnost® TAT micro und F1 +2 (monoclonal) genutzt. Beide Enzygnost® Kits werden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und werden standardmäßig zur Diagnose von Störungen in der Blutgerinnung in der Routine-Diagnostik verwendet.

Die Durchführung der Versuche erfolgt in Zusammenarbeit mit Frau Margarete Blum und Frau Bianca Maaßen-Weingart aus dem Proteinlabor des Universitätsklinikums Düsseldorf. Das Enzygnost® TAT micro ist ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip, das den Human-Thrombin/Antithrombin III-Komplex nachweist. Antithrombin III stellt einen natürlichen Hemmstoff der Blutgerinnung dar und bildet mit Thrombin einen inaktiven Proteinase/Inhibitor-Komplex, der mit diesem Enzygnost bestimmt werden kann und somit eine indirekte Aussage über die Thrombingenerierung trifft.

Im Folgenden wird die Funktionsweise dieses Verfahrens erläutert: zunächst bindet das in der Probe vorhandene TAT an Antikörper gegen Thrombin, die an der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach einem Waschvorgang wird ein Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Human-Antithrombin III hinzugegeben, worauf ein erneutes Waschen folgt um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die gebundene Enzymaktivität kann nun photometrisch bestimmt werden. Der Referenzbereich des Enzygnost® TAT micro liegt zwischen 1,0 und 4,1 µg/l. Ähnlich sieht es beim Enzygnost® F1+2 aus, das auch ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip darstellt. Hierbei werden das Human-

Prothrombinfragment F 1+2 bestimmt, die bei der Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin entstehen. Auf diese Weise kann das gebildete Thrombin quantifiziert werden. Das Enzygnost® F1+2 enthält einen Antikörper, der an der Mikrotitrationsplatte fixiert ist. Dieser ist gegen das in der Probe vorhandene F 1+2-Antigen gerichtet. Nach dem Binden an den ersten Antikörper wird die Platte gewaschen und ein Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Human-Prothrombin hinzugegeben, der an freie F 1+2 Determinanten bindet. Die überflüssigen Antikörper werden entfernt und die gebundene Enzymaktivität photometrisch bestimmt. Der Referenzbereich des Enzygnost® F 1+2 liegt bei 29 – 229 pmol/l.

Alle Daten, die außerhalb der angegebenen Referenzbereiche liegen, werden ausgeschlossen.

Für die TAT- und PTF-Bestimmung werden Überstände der folgenden Ansätze verwendet:

1) Thrombozyten (ruhend) als PRP
2) Thrombozyten (aktiviert) als PRP
3) Erythrozyten + Thrombozyten (ruhend) als PRP
4) Erythrozyten + Thrombozyten (aktiviert) als PRP
5) Erythrozyten (alt) + Thrombozyten (ruhend) als PRP
6) Erythrozyten (alt) + Thrombozyten (aktiviert) als PRP
7) Plättchenarmes Plasma (PPP)

Die Proben werden wie oben beschrieben hergestellt. Die Erythrozyten werden mit Tyrode auf eine Zellzahl von 40.000 Zellen/µl verdünnt. Die Zellzahl der Thrombozyten beträgt 100.000 Zellen/µl. Statt isolierter Thrombozyten wird hier Thrombozyten-reiches Plasma (PRP) verwendet, damit alle Plasmafaktoren vorhanden sind, um eine Thrombingenerierung zu gewährleisten. Die Proben werden nach der 10-minütigen Inkubationszeit bei 525 g für 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wird für die TAT- und PTF-Bestimmung genutzt. Das plättchenarme Plasma (PPP) dient als Kontrolle.

2.2.3.4 Inhibition des Fas-Liganden

In den statischen Versuchen sollen einzelne Liganden oder Rezeptoren blockiert werden, um so den möglichen Einfluss auf die Signalkaskade festzustellen. Als Kontrolle für den möglichen Effekt der Inhibition oder Blockierung einzelner Faktoren gilt der Nachweis oder die Veränderung der PS-Exposition auf insbesondere Erythrozyten aber auch Thrombozyten. Der Angriffspunkt bei der Inhibition des Fas-Liganden liegt auf den Thrombozyten.

Inhibition mit dem Decoy receptor 3 (DcR3) als Fas-Ligand-Inhibitor:

Das rekombinante humane DcR3 Fc Chimär liegt in einer Konzentration von 100 µg/ml vor und agiert als Fas-Ligand-Inhibitor.

DcR3 wird im Ansatz „Erythrozyten + Thrombozyten (aktiviert)“ in den statischen Versuchen in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Es erfolgt eine Vorinkubation der aktivierten Thrombozyten mit DcR3 für 20 Minuten, nach der die Erythrozyten hinzugegeben werden und eine erneute 10-minütige Inkubation folgt. In der Durchflusszytometrie werden die Auswirkungen dieses Inhibitors auf die PS-Exposition der Erythrozyten und Thrombozyten mithilfe von Annexin V untersucht. Als Kontrollen für diesen Versuch wird die PS-Exposition auf Erythrozyten ohne Thrombozyten sowie auf Erythrozyten mit aktivierten Thrombozyten gemessen. Des Weiteren wird der Aktivierungsstatus der Thrombozyten über den

Nachweis der P-Selektin-Exposition sowie die Höhe der Expression des Fas-Liganden auf der Oberfläche der Thrombozyten durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.3.5 Blockierung des Fas-Rezeptors

Auf den Erythrozyten wird als Interaktionspartner in der vermuteten Kaskade der Fas-Rezeptor vermutet. Dieser kann mit dem CD95-Antikörper blockiert werden. Der CD95-Antikörper liegt in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Er wird im Ansatz „Erythrozyten + Thrombozyten (aktiviert)“ in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dazu werden zunächst die Erythrozyten mit dem CD95-Antikörper für 15 Minuten vorinkubiert und erst dann werden die mit CRP oder ADP aktivierten Thrombozyten hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit des gesamten Ansatzes erfolgt die durchflusszytometrische Analyse, wobei speziell die PS-Exposition der Erythrozyten und Thrombozyten mittels Annexin V sowie der Aktivierungsstatus der Thrombozyten mittels der P-Selektin-Exposition untersucht wird. In den Kontrollen wird statt des CD95-Antikörpers IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als Kontrollen gelten hier folgende Ansätze: um den Aktivierungsstatus der Thrombozyten zu kontrollieren, werden die P-Selektin-Level auf den ruhenden und den mit CRP oder ADP aktivierten Thrombozyten gemessen. Als Positivkontrolle für die mit CD95-Antikörper behandelte Probe wird die gleiche Probe ohne CD95-Antikörper vorbereitet und auch hier die PS-Exposition mittels Annexin V gemessen. Als Negativkontrolle wird die PS-Exposition auf frischen unbehandelten Erythrozyten gemessen. Außerdem wird die PS-Exposition der Thrombozyten gemessen, die in Interaktion mit Erythrozyten stehen. Dazu wird eine Dreifachfärbung mit CD235-FITC, CD42-PE und AnnexinV-Cy5 durchgeführt. In der Durchflusszytometrie lässt sich anschließend so ein Gate erstellen, das Aggregate von Erythrozyten und Thrombozyten enthält, die sowohl für CD235 und CD42 positiv sind. In diesem Gate wird die PS-Exposition der Thrombozyten bestimmt.

2.2.4 Adhäsionsversuche

In den Adhäsionsversuchen werden Deckgläschen mit 25 µl CD95 Fc Chimär (50 µg/ml) beschichtet und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert. Die überflüssige CD95-Lösung wird am nächsten Morgen abgegossen und es erfolgt das Blockieren mit 400 µl 1% BSA (in Aqua dest.) für eine Stunde. Vor Verwendung der Deckgläschen muss das überschüssige BSA abgegossen werden. Auf diesen beschichteten Deckgläschen wird nun das Adhäsionsverhalten von isolierten humanen Thrombozyten beobachtet. Als Kontrolle gilt die Adhäsion von ruhenden Thrombozyten an das mit CD95-beschichtete Deckgläschen. Außerdem werden mit ADP aktivierte Thrombozyten auf die Deckgläschen gegeben. ADP wird dabei in einer Konzentration von 10 µM verwendet und für 5 Minuten inkubiert. In einem weiteren Ansatz werden die Thrombozyten zunächst mit ADP aktiviert und zusätzlich mit dem DcR3 behandelt, der in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt wird. In den Kontrollen wird statt DcR3 ein IgG-Fc Protein in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation der Thrombozyten mit DcR3 erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die verwendete Thrombozytenzahl entspricht in allen Versuchen $2 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ Tyrode. Jeweils 25 µl der ruhenden oder behandelten Thrombozyten werden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die beschichteten Objektträger gegeben. Darauf folgt ein 3-maliges Waschen mit PBS. Für 10 Minuten erfolgt eine Fixierung mit 1 % Paraformaldehyd. Anschließend werden die Objektträger mit Fluoromount eingedeckt. Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten wird analysiert und in Bildern dokumentiert, die mit dem Axio Observer.D1 Mikroskop und dem Plan-Neofluar 40x Objektiv aufgenommen werden.

2.2.5 Dynamische Versuche mit der Flusskammer (T-Tas®)

Das *Total Thrombus-formation Analyzing System* (T-TAS) ist ein Gerät, das zur Analyse der Thrombusformation in einer Flusskammer genutzt wird. Die untersuchten Blutproben werden durch einen Mikrochip geleitet und währenddessen wird die Festigkeit des

Thrombus anhand des Druckverlaufes analysiert und der Nutzer erhält die dazugehörige bildliche Information, die von einer Kamera mit Bildern und Videos aufgezeichnet wird. Für jeden Lauf werden nur circa 500 µl Blut in Citratröhrchen (129 mM, 1:10) benötigt. Die Temperatur wird während des ganzen Laufes bei 37°C gehalten.

Der Hersteller stellt verschiedene Mikrochips zur Verfügung. Hier wird der Atheroma-Chip (AR-Chip) verwendet, der zur umfassenden Analyse der Koagulation und Thrombozytenfunktion genutzt wird und insbesondere für die quantitative Analyse der Thrombusformation geeignet ist. In ihm befindet sich eine Kapillare mit einer Breite von 300 µm, einer Tiefe von 80 µm und einer Länge von 15 mm. Er ist mit Kollagen und Gewebethromboplastin (*Tissue factor*/ Faktor III) beschichtet. Auf diese Weise wird ein Gewebdefekt in einem arteriellen Gefäß nachgeahmt. Es lassen sich Scherraten zwischen 200 und 800 s⁻¹ einstellen.

Vergleich der Thrombusbildung in humanem Vollblut und PRP

Für die Flusskammerläufe werden jeweils 480 µl Vollblut aus Citratröhrchen mit 20 µl Ca-CTI (12mM CaCl₂, 50 µg/ml CTI [4%, Corn Trypsin Inhibitor]) versetzt um die Blutprobe zu recalcifizieren. Diese 500 µl recalcifiziertes CTI-behandeltes Vollblut werden in einen kleinen Behälter gegeben, der mit einer Mikropumpe verbunden ist, die Öl in den Behälter pumpt und auf diese Weise das Blut in die Öffnung der Kapillare des AR-Chips treibt. Nun kann der Prozess der Thrombusformation in der Flusskammer kontinuierlich mit einem Video-Mikroskop (10x) und einem Drucksensor verfolgt werden. Die Flussrate der Mikropumpe kann zwischen 4 und 40 µl/min eingestellt werden, wobei hier die Flussrate von 10 µl/min gewählt wurde. Im hier durchgeführten Experiment wird so eine Scherrate von 600 s⁻¹ erreicht, was der Scherrate in mittelgroßen Arterien gleichkommt.

Während das Blut durch die Flusskammer läuft werden gleichzeitig sowohl der extrinsische Weg der Gerinnung angestoßen als auch die Thrombozyten aktiviert, sodass ein Thrombus entsteht und wächst, der zur Okklusion der Kapillare führt und somit zu einem Anstieg des Druckes in der Kapillare.

Sobald ein Druck von 100 kPa erreicht ist, wird der Versuch gestoppt und die Kapillare gilt als verschlossen. Die bis dahin verstrichene Zeit wird als Okklusionszeit bezeichnet.

Äquivalent zu diesem Ansatz erfolgt ein Flusskammerlauf mit PRP. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass im PRP wesentlich mehr Thrombozyten enthalten sind als im Vollblut. Aus diesem Grund wurde mithilfe des Sysmex die Thrombozytenzahl im Vollblut und im daraus hergestellten PRP bestimmt. Um die Thrombozytenzahl im PRP dem Vollblut anzugleichen, wird dieses mit Kochsalzlösung verdünnt. Von diesem verdünnten PRP werden 480 µl mit 20 µl Ca-CTI gemischt und in die Flusskammer gegeben.

Beim Vergleich der Okklusionszeiten des Vollblutes und dem dazu gehörigen PRP werden die T₁₀ und T₁₀₀ beobachtet. Die T₁₀ ist als Dauer (in Sekunden) bis zum Anstieg des Drucks von der Messbasis auf 10 kPa definiert und markiert so den Beginn der Thrombusformation. Die T₁₀₀ ist als Dauer (in Minuten) bis zum Anstieg des Drucks von der Messbasis auf 100 kPa definiert und markiert so die komplette Okklusion der Kapillare.

2.2.6 Dynamische Versuche mit der Flusskammer (Standard)

Bei der Flusskammer handelt es sich um eine Methode, die die Flussbedingungen des Blutes in Gefäßen nachstellt. Auf diese Weise fließt auch unter experimentellen Bedingungen der rheologische Aspekt des Blutes mit ein. Die Flusskammer besteht aus einer dünnen Kammer (50µm x 5mm), die von einem Deckgläschen (24 x 60mm) begrenzt wird, das mit z. B. Kollagen beschichtet ist. Auf diese Weise wird die extrazelluläre Matrix, die bei einem Gefäßdefekt freiliegt, durch das mit Kollagen beschichtete Deckgläschen nachgestellt. Das Blut kann mit verschiedenen Fließgeschwindigkeiten durch die Kammer geleitet werden, wodurch die verschiedenen Blutgefäßgrößen nachgestellt werden können. Während das Blut die Kammer durchfließt, wird mit einem Mikroskop das Adhäsionsverhalten des Blutes und der darin enthaltenen Zellen an das beschichtete Deckgläschen beobachtet. Diese Methode bietet den Vorteil gegenüber den statischen

Versuchen, dass auch die dynamisch wirkenden Kräfte des Blutflusses mit in den experimentellen Aufbau einfließen.

Vorbereitung der Deckgläschen

Die Deckgläschen werden am Tag vor dem geplanten Versuch vorbereitet. Jedes Deckgläschen wird mit 70 µl Kollagenlösung (200 µg/ml) beschichtet und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgt das Blockieren des Kollagens mit BSA. Dazu wird zunächst die überschüssige Kollagenlösung abgegossen, woraufhin auf jedes Deckgläschen 400 µl 1 % BSA (in Aqua dest.) gegeben wird. Das Blockieren erfolgt für eine Stunde. Kurz vor Verwendung des Deckgläschens wird das überschüssige BSA abgegossen.

Vorbereitung der Flusskammer

Zunächst wird das Deckgläschen mit der Kollagen-beschichteten Seite auf der Flusskammer platziert. Die Flusskammer wird mit zwei Aluminiumstiften in einen Aluminiumblock eingespannt, der an einer Stelle eine Aussparung enthält, durch die die Flusskammer mittels eines inversen Mikroskops beobachtet werden kann. Die noch nach dem Einbau in der Flusskammer vorhandenen Luftblasen werden mit destilliertem Wasser aus dem System gespült. Anschließend wird noch einmal mit PBS gespült um eine möglichst physiologische Umgebung für das Blut zu bilden. Beim Start des Experiments wird eine 1 ml-Spritze, die mit 700 µl behandeltem oder unbehandeltem Vollblut gefüllt ist, an die Schläuche der Flusskammer angeschlossen. Die Schläuche führen über Röhrchen, die in einem 20° Winkel in die Kammer münden, zur Flusskammer. Durch diesen Winkel werden Verwirbelungen des Blutstroms verhindert. Die Spritze wird nun an eine pulsfreie Pumpe angeschlossen, die das Blut mit der gewünschten Flussgeschwindigkeit in das System pumpt. Die Thrombus-Entwicklung wird während des Experiments mit einer Kamera in Form von einem 3-minütigen Video von einem repräsentativen Bereich und im Anschluss mit Bildern von der Thrombus-Fläche dokumentiert. Etwa drei Bilder werden an unterschiedlichen Stellen mit einer 400-fachen Gesamtvergrößerung mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) aufgenommen. Dazu wird das Axio Observer.D1 Mikroskop und das Plan-Neofluar 40x Objektiv von Zeiss verwendet. Das Experiment wird bei einer Schergeschwindigkeit von 1000 s⁻¹ und einer Flussgeschwindigkeit von 7,5 ml/h durchgeführt. Der Zusammenhang der Flussgeschwindigkeit und Scherrate wird mit der folgenden Formel beschrieben (Van Kruchten et al., **2012**):

$$\gamma = \frac{100 Q}{h^2 \cdot w \cdot 60}$$

γ bezeichnet die Schergeschwindigkeit in s⁻¹, Q die Flussgeschwindigkeit des Blutes in ml/h, h die Höhe der Kammer in mm und w die Breite der Kammer in mm.

Vorbereitung des Probenmaterials

Für jeden Flusskammerlauf werden 700 µl Humanblut benötigt, das in Citratröhrchen (129 mM, 1:10) aufgenommen worden ist, um so eine vorzeitige Gerinnung zu verhindern. Die Aufbewahrung des Blutes bis zur Verwendung in der Flusskammer erfolgt im Inkubator bei 37°C. Das Blut wird mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert, um die Auswirkungen auf die Thrombusbildung beurteilen zu können. Dabei ist zu beachten, dass das Blut durch die Zugabe der Inhibitoren verdünnt wird, sodass ein Kontrolllauf mit Vollblut erfolgen muss, das gleichermaßen verdünnt ist.

DcR3:

Die Behandlung des Vollblutes erfolgt mit dem rekombinanten humanen Decoy receptor 3 (DcR3) Fc Chimär.

Das rekombinante humane DcR3 Fc Chimär liegt in einer Konzentration von 100 µg/ml vor und ist in PBS gelöst. In den Flusskammerläufen wird eine Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Zu 700 µl Vollblut werden 70 µl DcR3 Fc Chimär hinzugegeben und direkt im Anschluss der Flusskammerlauf gestartet. Um eine Bindung an den Fas-Liganden auf Thrombozyten, der nur bei Aktivierung der Thrombozyten an der Oberfläche exprimiert wird, zu erreichen, ist eine vorherige Inkubation unnötig, da die Aktivierung erst im Zuge des Flusskammerlaufes erfolgt.

Als Kontrolle für diesen Lauf dient eine mit IgG-Fc in einer Konzentration von 10 µg/ml behandelte 700 µl Vollblut-Probe. Um den Einfluss der Verdünnung der Probe mit 70 µl DcR3 auf das Ergebnis zu verhindern, wird die Kontrolle in gleicher Weise mit PBS verdünnt.

Mepacrine-Färbung:

In einem Teil der Flusskammerläufen des DcR3-behandelten Blutes wird zusätzlich Quinacrine Dihydrochlorid (Mepacrine) hinzugegeben. Mepacrine, bekannt als ein Fluoreszenzmarker, wird von Thrombozyten aufgenommen und in den dichten Granula eingelagert (Wall et al., **1995**). Von der in Aqua dest. gelösten 1 mM-Stammlösung des Mepacrine wird final eine Konzentration von 10 µmol eingesetzt. Mepacrine wird 5 Minuten vor Beginn des Flusskammerlaufes zur Blutprobe gegeben. Nach Abschluss des Flusskammerlaufes können mit dem Axio Observer.D1 Mikroskop und dem Plan-Neofluar 40x Objektiv von Zeiss Bilder aufgenommen werden, die anhand ihrer Fluoreszenz-Intensität mit Hilfe der Software ZEN von Zeiss ausgewertet werden können. Zur Verbesserung der Bildqualität wird nach dem Lauf mit dem behandelten Vollblut 1 Minute PBS über den Objektträger geleitet.

CD95-AK:

Das Vollblut wird in einem weiteren Versuch mit dem CD95-Antikörper der Firma GeneTex behandelt. Dieser Antikörper richtet sich gegen den Fas-Rezeptor aus der Familie der TNF-Rezeptoren und hat blockierende Eigenschaften. Der Fas-Rezeptor-Antikörper wird in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Zu den 700 µl Vollblut-Probenvolumen, das für einen Lauf in der Flusskammer benötigt wird, werden 7 µl des Fas-Rezeptor-Antikörpers, der in einer Konzentration von 1 mg/ml vorliegt, hinzugegeben. Die Inkubationszeit für das mit dem Fas-Rezeptor-Antikörper behandelte Vollblut beträgt 15 Minuten bei Raumtemperatur bevor es in der Flusskammer eingesetzt wird.

Als Kontrolle für diese Läufe dient ein 700 µl Vollblut-Probenvolumen, das mit IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml versetzt wird.

Untersuchung der Zellen in den gebildeten Thromben

Nach Abschluss des Flusskammerlaufs wird das Deckgläschen mit den nun darauf entstandenen Thromben vorsichtig ausgebaut, um die in den Thromben befindlichen Zellen auf ihre Zusammensetzung sowie ihre Oberflächenmoleküle zu untersuchen. Dazu müssen die Zellen zunächst wieder vereinzelt werden, was durch die Behandlung mit Accutase erfolgt. Accutase ist eine Lösung, die speziell für eine sanfte aber effektive Trennung der Zellen entwickelt worden ist. Sie enthält ein Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen, das in Dulbecco's PBS gelöst ist und 0,5 mM EDTA enthält. Außerdem wurde von Bajpai und Kollegen gezeigt, dass die Accutase genutzt werden kann, um zunächst Zellen zu vereinzeln und anschließend in der Durchflusszytometrie einzusetzen (Bajpai et al., **2008**).

Wie durch einen Vorversuch von Christoph Klatt in seiner Masterarbeit gezeigt werden konnte, eignet sich auch in diesem Versuch die Accutase gut, um eine nahezu vollständige Ablösung der Zellen vom Deckgläschen zu erreichen. Nur wenige Zellen bleiben nach der Behandlung der Deckgläschen mit der Accutase auf der noch intakten Kollagenmatrix zurück (Klatt, **2014**).

Die Behandlung der Deckgläschen

Das aus der Flusskammer vorsichtig ausgebaute Deckgläschen wird zunächst mit 3 bis 4 ml PBS gespült. Der Bereich, in dem sich die Thromben auf der Kollagenmatrix gebildet haben, stellt sich als ein mattes Rechteck dar. Die um das Rechteck befindliche Fläche auf dem Deckgläschen wird mittels eines saugfähigen Tuches abgetrocknet. Anschließend werden 120 µl Accutase auf die Thromben-Fläche gegeben und für 15 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit können mit einer Pipette circa 70 µl Zellsuspension vom Deckgläschen abgenommen werden. Diese Zellsuspension kann nun zur durchflusszytometrischen Untersuchung genutzt werden und wird bis dahin bei 37°C im Inkubator aufbewahrt.

Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie

Die in der Zellsuspension befindlichen Zellen sollen bezüglich ihrer Phosphatidylserin-Exposition untersucht werden. Die Phosphatidylserin-Exposition wird mit Annexin V nachgewiesen. Bei Annexin V handelt es sich um ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserinen. Eine genauere Beschreibung dieses Proteins findet sich unter 2.2.3.1 .

Da für die Annexinbindung die Anwesenheit von Calcium nötig ist, wird die Zellsuspension noch mit 2,5 mM CaCl_2 versetzt. 50 µl dieser CaCl_2 -haltigen Zellsuspension werden dann in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen gegeben und mit 5 µl CD235a-FITC-markiertem Antikörper und 4 µl Annexin-Cy5 versetzt. Darauf folgt eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Anschließend werden die Proben mit 180 µl CaCl_2 -haltigem Bindepuffer versetzt und auf diese Weise die Färbung gestoppt. Üblicherweise wird eine größere Menge Flüssigkeit zum Abstoppen der Färbung genutzt. In diesem Fall sollte jedoch möglichst wenig Flüssigkeit zur Zellsuspension hinzugegeben werden, um nicht die ohnehin schon wenigen Zellen in der Zellsuspension zu sehr zu verdünnen.

Die Annexin-Bindung auf Thrombozyten sowie auf Erythrozyten kann nun in der Durchflusszytometrie untersucht werden. In der Zellsuspension befinden sich nur wenige Erythrozyten, sodass in den Durchflusszytometrie-Röhrchen der Antikörper CD235a-FITC hinzugefügt werden sollte. Dieser Antikörper markiert Erythrozyten und hilft in der durchflusszytometrischen Auswertung die Erythrozyten zu identifizieren. Weitere Erklärungen zu diesem Antikörper befinden sich ebenfalls unter dem Punkt 2.2.3.1 .

2.2.7 Analyse der arteriellen Thromben aus der Gefäßchirurgie

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf werden als Untersuchungsmaterial arterielle Thromben zur Verfügung gestellt, die im Rahmen von operativen Eingriffen entfernt worden sind. Die Thromben können aus dem gesamten arteriellen System des Körpers stammen und haben sich bei den Patienten aus verschiedenen Gründen entwickelt. Die Thromben werden noch am Operationstag übermittelt. Dabei befinden sich ein Teil des Thrombus in Kochsalzlösung, der für die Durchflusszytometrie genutzt wird, und ein anderer Teil in Formaldehyd, der für die histologischen Analysen verwendet wird. Zu jedem Thrombus ist eine kurze anonymisierte Information bezüglich der genauen Lokalisation der Entnahme, Alter des Patienten, Geschlecht, Gewicht, Größe und Raucherstatus bekannt (s. 6.2).

2.2.7.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der humanen Thromben

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Thromben wird der Schwerpunkt vor allem auf das Messen der Zellzahl verschiedener Zellpopulationen und die Bestimmung verschiedener Parameter, die im Zusammenhang mit der Thrombusbildung stehen, gelegt. Mit Hilfe von Annexin V wird die Phosphatidylserinexposition auf Erythrozyten und Thrombozyten gemessen. Auf den enthaltenen Thrombozyten wird die Fas-Ligand- und P-Selektin (CD62) -Expression bestimmt.

Vorbereitung der Proben

In der Durchflusszytometrie können nur einzelne Zellen untersucht werden. Aus diesem Grund muss der Thrombus zunächst gelöst werden. Die Herausforderung dabei ist die Oberflächenmoleküle nicht zu zerstören, da diese anschließend noch in der Durchflusszytometrie untersucht werden sollen. Ein Teil des in Kochsalzlösung vorliegenden Thrombus wird mit 500 µl Accutase in ein 15ml-Falcon gegeben.

Der in Accutase befindliche Thrombus wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um so optimalen Bedingungen für die Accutase zu schaffen. Falls sich der Thrombus noch immer nicht gelöst hat, wird der Überstand abgenommen und erneut 500 µl Accutase zum Thrombus hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Über Nacht erfolgt die komplette Lösung des Thrombus, sodass die Probe am nächsten Tag zur Untersuchung in der Durchflusszytometrie zur Verfügung steht. Dazu wird der in Accutase gelöste Thrombus in einem 40 µm-Filter filtriert und das Filtrat in 2 Eppendorfgefäße aufgeteilt, die für 5 Minuten bei 525 g (2500 rpm) zentrifugiert werden. Beim ersten Eppendorfgefäß wird die Accutase, also der Überstand, abgenommen und 500 µl Kochsalzlösung hinzugefügt. Auch beim zweiten Eppendorfgefäß wird die Accutase entfernt und das übrig gebliebene Pellet in 200 µl Bindepuffer resuspendiert.

Vorbereitung der Durchflusszytometrie-Röhrchen

Insgesamt werden für jeden Thrombus fünf Durchflusszytometrie-Röhrchen vorbereitet:

Tabelle 3: Vorbereitung der Durchflusszytometrie-Röhrchen zur Analyse der Thromben

FACS-Röhrchen	Ansätze (jeweils 50 µl)	Antikörper (zur Erstellung des Gates)	Antikörper (für zu untersuchende Oberflächenmarker)
1) Kontrolle	Thrombus in NaCl	CD42a-FITC (5 µl)	IgG-PE (5 µl)
2) P-Selektin- Expression	Thrombus in NaCl	CD42a-FITC (5 µl)	CD62-PE (5 µl)
3) Fas-Ligand- Expression	Thrombus in NaCl	CD42a-FITC (5 µl)	FasL-PE (5 µl)
4) Zelldifferenzierung	Thrombus in NaCl	CD235-FITC (5 µl)	CD45-PE (5 µl)
5) PS-Exposition	Thrombus in Bindepuffer	CD235-FITC (5 µl)	Annexin-Cy5 (4 µl)

Die Kontrolle (1) dient zur Kontrolle der unspezifischen Bindung auf Thrombozyten für PE-markierte Antikörper.

Nach einer 20-minütigen Inkubation dieser Ansätze bei Raumtemperatur in Dunkelheit erfolgt bei den ersten vier Röhrchen das Abstoppen mit 400 µl PBS und beim fünften Röhrchen das Abstoppen mit 400 µl Bindepuffer. Anschließend stehen die Proben für die durchflusszytometrische Untersuchung zur Verfügung.

2.2.7.2 Histologie und Lichtmikroskopie der humanen Thromben

Ein anderer Teil des Thrombus wird in Formaldehyd konserviert und nach Einbetten in Paraffin, Schneiden und Färben zu histologischen Präparaten verarbeitet, die in der Lichtmikroskopie weitere Erkenntnisse über die Lage der Zellen im Thrombus zueinander

geben können. Dabei wird in erster Linie die Hämalaun-Eosin-Färbung angewendet. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer erläutert.

Einbetten in Paraffin

Bevor die Einbettung der Thromben in Paraffin erfolgen kann, muss eine Entwässerung durchgeführt werden. Die Thromben werden einzeln in kleine Kapseln gegeben und zunächst für 30 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend inkubiert man die in den Kapseln enthaltenen Thromben über Nacht für 12 Stunden bei 4 °C in 70%igem Ethanol. Am nächsten Morgen werden die Thromben für 2 Stunden in 80%igen Ethanol überführt, anschließend für weitere 2 Stunden in 90%igen Ethanol, dann 2 Stunden in 96%igen Ethanol. Die Alkoholreihe schließt dann mit einer 2-stündigen Inkubation in 100%igem Ethanol ab. Daraufhin gibt man die Thromben für 12 Stunden in Roti®-Histol. Gleichzeitig sollte schon das Paraffin bei 56°C im Wärmeschrank über Nacht geschmolzen werden. Am nächsten Morgen können dann die Kapseln mit den darin enthaltenen Thromben direkt für 6 Stunden in das flüssige Paraffin gelegt werden.

Nach Ablauf der 6 Stunden erfolgt der eigentliche Vorgang des Einbettens. Die Thromben werden in Paraffin eingelegt und nach dem Auskühlen kann das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgen.

Anfertigung von Präparaten

Mithilfe eines Mikrotoms werden die Paraffinblöcke geschnitten. Eine feine Klinge schneidet 5 µm dicke Schnitte vom Block ab, die daraufhin in ein 37°C-warmes Wasserbad überführt werden. Aus dem Wasserbad lassen sich die Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Zur Fixierung erfolgt ein Erhitzen für 10 Minuten in einen Wärmeschrank bei 37°C.

Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämalaun-Eosin-Färbung wird als Übersichtsfärbung genutzt. Sie besteht aus zwei Einzelfärbungen. Zum einen findet die Färbung des Präparats mit Hämatoxylin statt, welche alle basophilen Strukturen wie beispielsweise die Zellkerne mit der enthaltenen DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum blau färbt. Zum anderen wird der synthetische saure Farbstoff Eosin genutzt, der alle basischen Strukturen rot färbt; dazu gehören Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen und Keratin.

Die Färbung wird folgendermaßen durchgeführt: zunächst müssen die Präparate entparaffiniert werden. Dies erfolgt durch eine 10-minütige Inkubation in Roti®-Histol und eine darauffolgende absteigende Alkoholreihe, bei der die Präparate jeweils 2 Minuten 100%iges, 96%iges, 96%iges und 70%iges Ethanol durchlaufen. In einem nächsten Schritt wird das Präparat für 10 Minuten in Hämalaun überführt. Zur Differenzierung der Kerne werden die Präparate kurz in HCl-Alkohol eingetaucht, woraufhin sie für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen. Nach Eintauchen der Präparate für 1 Minute in 1 % alkoholische Eosin-Lösung folgt eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung, bei der die Präparate jeweils 2 Minuten 70%iges, 96%iges und 100%iges Ethanol durchlaufen. Vor dem Eindecken mit Roti®-Histokitt werden die Präparate in Roti®-Histol überführt. Roti®-Histokitt ist ein wasserfreies Eindeckmittel, das benötigt wird um das Präparat mit einem Deckgläschen zu bedecken.

Mikroskopische Aufnahmen der HE-Färbung

Bei den mikroskopischen Aufnahmen lassen sich die Kerne als bläuliche Strukturen erkennen. Das Zytoplasma hingegen erscheint rosa und Erythrozyten rot. So lässt sich die Zusammensetzung des Thrombus gut beurteilen. Mit einer Kamera werden im Zuge der Mikroskopie Bilder von den Präparaten angefertigt.

2.2.7.3 Elektronenmikroskopie der humanen Thromben

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Labor der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Martin Schaller von Frau Fehrenbacher durchgeführt.

Ein Teil des sich in Kochsalzlösung befindenden Thrombus wird in Karnovsky-Lösung fixiert. Dieser wird an Frau Fehrenbacher übermittelt, die die folgenden Schritte unternimmt. Zunächst wird der Thrombus zweimalig mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und dann für 1 bis 2 Stunden in Osmiumlösung (5 % Kaliumhexacyanoferrat, 2 % Osmium in dH₂O 1:1 mischen) in einem Eisbad in Dunkelheit inkubiert. In Aqua dest. wird das Präparat dann anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Darauf folgt eine 30-45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln in Uranylacetat (0,05 g Uranylacetat in 2,5 ml dH₂O). Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten mit Aqua dest. erfolgt die Entwässerung, die sich aus mehreren aufeinanderfolgenden Waschschritten zusammensetzt: 2 mal 10 Minuten in 50%igem und 70%igem Ethanol, dann 2 mal 5 Minuten in 95%igem Ethanol und 3 mal 1 Minute in 100%igem Ethanol. Nach dieser Entwässerung erfolgt eine zweimalige Inkubation für 30 Sekunden in Propylenoxid und anschließend für 45 Minuten in Propylenoxid/Epon (1:1) auf dem Rüttler. Unter dem Abzug wird das Präparat dann für 2 Stunden in 100% Epon inkubiert. Zur Polymerisation werden die Präparate für 12-20 Stunden bei 45 °C und anschließend 20-40 Stunden bei 60 °C erhitzt.

Mit Hilfe eines Ultramikrotoms werden 30 nm dicke Schnitte angefertigt, welche dann für die Analyse im Transmissionselektronenmikroskop zur Verfügung stehen.

2.2.8 Analyse muriner arterieller Thromben

2.2.8.1 Eisen(III)-chlorid-induzierte Gefäßverletzung muriner Carotiden

Bei den mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) intraperitoneal narkotisierten Mäusen wird die rechte A. carotis communis freipräpariert und mikrochirurgisch eine Sonde angebracht, die den Fluss in diesem Gefäß in ml/min sowie die Herzfrequenz misst (Transonic Systems; 0,5 PSB; AD Instruments). Die Messung durch den in der Sonde befindlichen Ultraschallmesskopf beruht auf dem Doppler-Prinzip. Die zellulären Bestandteile des Blutes reflektieren die ausgesendeten Wellen. Aus den Überlagerungen der Schallwellen kann die Geschwindigkeit des Blutstroms berechnet werden. Das Volumen, das pro Zeiteinheit durch das Gefäß fließt, kann zusätzlich mit Hilfe des bekannten Durchmessers des Flussmesskopfes berechnet werden. Die Größe des angebrachten Messkopfes wird entsprechend dem Kaliber des Gefäßes gewählt. Ein 1x2 mm großes Filterpapier mit 15 % Eisen(III)-chlorid wird für 3 Minuten nahe der Stelle auf die A. carotis communis gelegt, an der auch die Flussrate gemessen wird, und auf diese Weise ein Thrombus generiert. So kann anhand der Flussrate verfolgt werden, zu welchem Zeitpunkt die Thrombusbildung startet und wann das Gefäß vollkommen durch den Thrombus verschlossen ist. Nach Abschluss dieses Versuchs wird das Gefäß mit dem darin enthaltenen arteriellen Thrombus herausgenommen und steht anschließend für die histologische Untersuchung zur Verfügung. Die Durchführung dieser Operation wird von der institutsinternen Tierärztin Frau Gowert übernommen.

2.2.8.2 Histologie und Lichtmikroskopie muriner Thromben

Die histologische Aufarbeitung der murinen Thromben erfolgt äquivalent zu der Aufarbeitung humaner Thromben. Bei den murinen Thromben gilt als Besonderheit, dass das gesamte Präparat, und nicht, wie es bei den humanen Thromben der Fall ist, nur ein Teil, histologisch untersucht werden kann. Außerdem werden die murinen Thromben samt Gefäß, in dem die Thromben enthalten sind, verarbeitet.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Office Excel 2010. Es wurden der Mittelwerte und der Standardfehler (S.E.M., engl. *standard error of the mean*) berechnet. Der Standardfehler wurde in Form von Fehlerbalken in den jeweiligen Grafiken eingezeichnet.

Der Zweistichproben-t-Test wurde zur Prüfung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Mittelwerten verschiedener Daten angewendet. Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen definiert und in den Abbildungen gekennzeichnet:

* : der p-Wert liegt $\leq 0,05$

** : der p-Wert liegt $\leq 0,01$

*** : der p-Wert liegt $\leq 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Thrombus-Bildung in thrombozytenreichem Plasma im Vergleich zu Vollblut unter Flussbedingungen

Um den Einfluss von Erythrozyten auf die Thrombus-Bildung und die Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten währenddessen zu untersuchen, wird zunächst die Thrombus-Bildung von Vollblut mit der von Thrombozyten- bzw. Plättchenreichem Plasma (PRP) verglichen und so die Bedeutung der Erythrozyten für die Thrombus-Bildung untersucht. Um die Flussbedingungen in diesem Versuch den Flussbedingungen *in vivo* möglichst nachzustellen wird das Flusskammersystem T-Tas® verwendet.

Die Bedeutung von Erythrozyten für die Thrombus-Bildung wird anhand der Zeit bis zur Thrombus-Bildung und zum Verschluss der Kapillare (Okklusionszeit) in PRP im Vergleich zu Vollblut analysiert.

Die Bilder in Abbildung 3A veranschaulichen die Entwicklung des Thrombus in Vollblut im Vergleich zu PRP. Im Vollblut entstehen schneller größere Thromben, die dann letztendlich einen frühzeitigeren Verschluss der Kapillare gewährleisten. Beim Vergleich der Okklusionszeit von PRP mit Vollblut fallen große Unterschiede auf. Der Mittelwert der Okklusionszeit von Vollblut liegt bei 10,68 ($\pm 0,424$) Minuten, während der für PRP bei 19,16 ($\pm 1,818$) Minuten liegt (Abb. 3B). In Anwesenheit von Erythrozyten ist folglich die Verschlusszeit signifikant reduziert ($p=0,0027$).

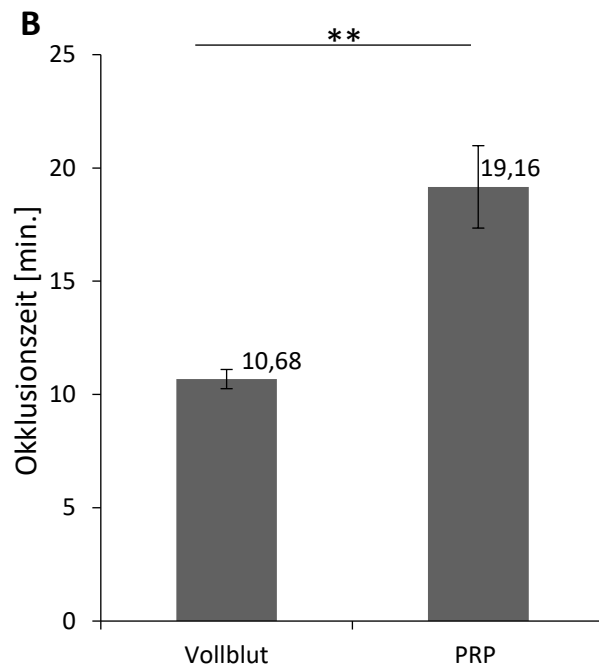
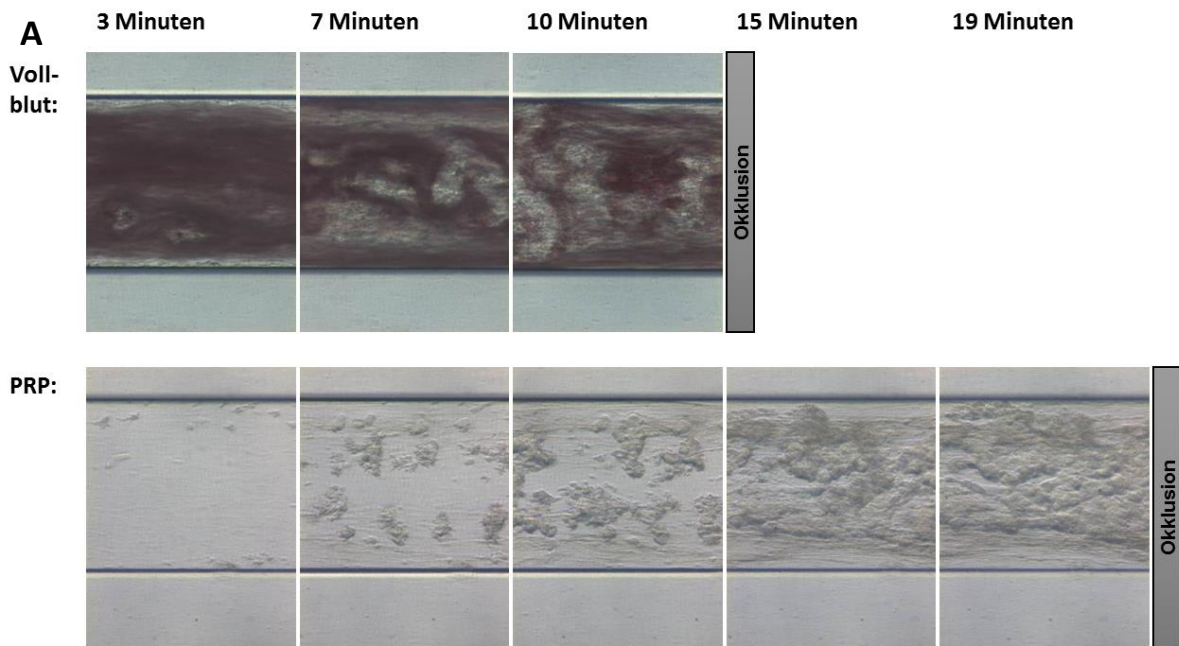


Abb. 3: Vergleich der Okklusionszeiten von PRP und Vollblut im Flusskammersystem T-Tas®

Repräsentative Bilder (**A**) und zeitliche Auswertung (**B**) der Thrombus-Bildung und Okklusion der Kapillare in der Flusskammer T-Tas®. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert der Zeit \pm S.E.M. bis zum Verschluss der Kapillare (Okklusionszeit) in Minuten [min.] an. Die Flussrate beträgt 10 μ l/min. Verglichen werden dabei Vollblut und PRP, dessen Thrombozytenzahl an die des jeweilig verwendeten Vollblutes angepasst worden ist. n=6, ** p \leq 0,01. Abbildung A zeigt repräsentative Bilder der Entwicklung des Thrombus zu verschiedenen Zeitpunkten bis zum Verschluss der Kapillare in Vollblut und PRP. Flussrichtung des Blutes geht von links nach rechts.

3.2 Nachweis des Fas-Rezeptors auf Erythrozyten

Der Fas-Rezeptor, der auch als CD95 (*cluster of differentiation 95*) oder APO-1 (*apoptosis antigen 1*) bekannt ist, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren (Tumornekrosefaktor-Rezeptoren). Als Typ I-Membran Glykoprotein wird er auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen exprimiert. Die molekulare Masse des Fas-Rezeptors beträgt 36 kDa. Im *Western blot* wird er als ein, je nach Glykosylierungsstatus, 45 bis 52 kDa-großes Protein sichtbar. An dieser Stelle soll mit Hilfe des *Western Blots* untersucht werden, ob sich der Fas-Rezeptor auf frischen unbehandelten humanen Erythrozyten nachweisen lässt. Dazu werden verschiedene Zellkonzentrationen sowie isolierte Erythrozyten von unterschiedlichen Vollblutspendern genutzt. Insgesamt werden Erythrozyten-Lysate von verschiedenen Spendern (S1,S2) mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt, die dann im *Western Blot* untersucht werden.

Auf den *Western Blots* in Abbildung 4 ist zu erkennen, dass sich bei der niedrigsten Erythrozyten-Konzentration von $1 \times 10^5 / \mu\text{l}$ kaum Protein-Banden mit dem CD95-Antikörper nachweisen lassen. Hier scheint die Verdünnung der Erythrozyten-Lysate für einen Nachweis zu groß zu sein. Bei der Erythrozyten-Konzentration von $5 \times 10^5 / \mu\text{l}$ sind Protein-Banden bei allen Spendern auf einer Höhe von 52 kDa zu erkennen. Noch deutlicher werden diese Banden bei Erythrozyten-Konzentrationen von $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Fas-Rezeptor auf frischen unbehandelten Erythrozyten nachweisbar ist.

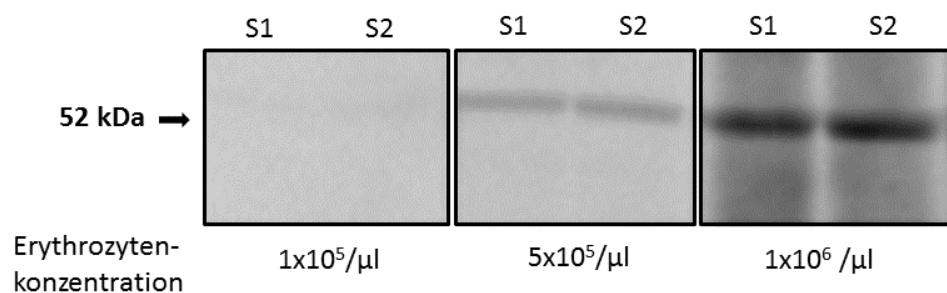


Abb. 4: Nachweis des Fas-Rezeptors auf humanen Erythrozyten im *Western Blot*

Repräsentative *Western Blots* von humanen Erythrozyten-Lysaten zum Nachweis der Expression des Fas-Rezeptors auf diesen Zellen. Die Erythrozyten wurden aus Vollblut von zwei verschiedenen Spendern (S1, S2) isoliert. Aus den isolierten Erythrozyten wurden Erythrozyten-Lysate unterschiedlicher Zellkonzentrationen ($1 \times 10^5 / \mu\text{l}$, $5 \times 10^5 / \mu\text{l}$, $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$) hergestellt, die im *Western Blot* eingesetzt worden sind. Mit Hilfe des CD95-Antikörpers werden Protein-Banden auf einer Höhe von 52 kDa detektiert, die den glykosylierten Fas-Rezeptor in den Erythrozyten-Lysaten darstellen. n=3

3.3 Statische Versuche

3.3.1 Nachweis eines Zell-Zell-Kontaktes zwischen Thrombozyten und Erythrozyten in der Durchflusszytometrie

Um eine mögliche Interaktion zwischen Thrombozyten und Erythrozyten in der Durchflusszytometrie untersuchen zu können, wurden Doppelfärbungen mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-FITC-Antikörper und dem Thrombozyten-spezifischen CD42-PE-Antikörper durchgeführt. Verglichen wird ein Ansatz ruhender Thrombozyten (PRP) mit einem Ansatz, der Thrombozyten (PRP) und Erythrozyten enthält. In der Durchflusszytometrie können die Zellpopulationen mit Hilfe der beiden genannten Antikörper unterschieden werden. Die Darstellung erfolgt in einem *Dot Blot*, in dem die Antikörper CD235-FITC und CD42-PE gegeneinander aufgetragen sind. Im *Dot Blot* des ersten Ansatzes, der ruhende Thrombozyten (PRP) enthält, wurde eine CD42-positive Zellpopulation detektiert, die somit Thrombozyten darstellt (Abb. 5). In Abbildung 5 ist diese als Gate 1 (G1) bezeichnet. Im *Dot Blot* des zweiten Ansatzes, bei dem Thrombozyten mit Erythrozyten inkubiert wurden, konnten hingegen drei unterschiedliche Populationen detektiert werden. Zellen, die nur positiv für CD42 sind, stellen dabei die Thrombozyten dar. Erythrozyten werden durch Bindung von CD235 als eine weitere Zellpopulation im Quadranten 1 (Q1) dargestellt. Zellen, die sowohl für den CD235-FITC-Antikörper als auch für den CD42-PE-Antikörper positiv sind, wurden in Abbildung 5 als Gate 2 (G2) definiert und stellen Erythrozyten-Thrombozyten-Aggregate dar, da diese Population positiv für beide Marker ist.

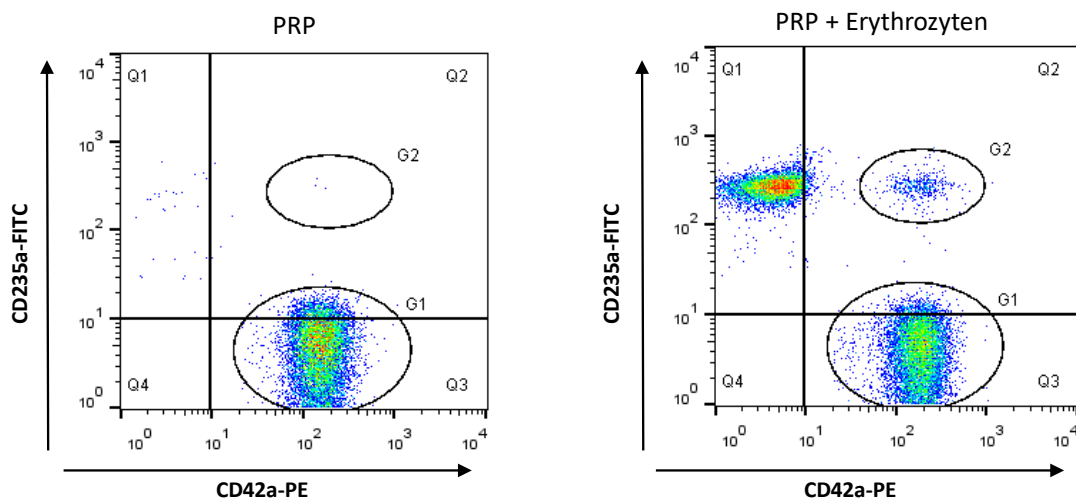


Abb. 5: Analyse der Interaktion von Thrombozyten und Erythrozyten im Durchflusszytometer

Repräsentative Bilder der *Dot Blots* der durchflusszytometrischen Analysen aus verschiedenen Ansätzen mit Erythrozyten und Thrombozyten (in PRP). Zur Analyse der Zellpopulationen wurden die zellspezifischen Marker (Antikörper) CD235-FITC (Erythrozyten) und der CD42-PE (Thrombozyten) verwendet. G1=Gate 1, G2=Gate 2, Q=Quadrant

3.3.2 Veränderung der Fas-Ligand-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten

Eine Aktivierung von Thrombozyten führt zu einer erhöhten Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten (Ahmad et al., 2001). Jedoch ist derzeit unbekannt, ob Erythrozyten die Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten beeinflussen können. Eigene Untersuchungen (Abb. 6) zeigen, dass die Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten bei Aktivierung jedoch nicht signifikant ansteigt. Im Ruhezustand liegt der Mittelwert der Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten bei 11,91 (\pm 1,36). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP liegt der Mittelwert bei 13,65 (\pm 0,51). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit CRP steigt der Mittelwert für die Fas-Ligand-Expression auf 15,14 (\pm 1,63). Der Unterschied der Fas-Ligand-Exposition ruhender gegenüber aktivierten Thrombozyten ist nicht signifikant. Die Zugabe von Erythrozyten zu ruhenden Thrombozyten führt jedoch bereits zu einem signifikanten Anstieg der Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten ($p=0,007$). Der Mittelwert liegt hier bei 16,67 (\pm 0,96). Des Weiteren zeigen sich signifikante Unterschiede in der Fas-Ligand-Expression auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten bei Zugabe von Erythrozyten. Die Mittelwerte der Fas-Ligand-Expression steigen von 11,91 (\pm 1,36) der ruhenden Thrombozyten auf 29,65 (\pm 1,80) bei gleichzeitiger Aktivierung der Thrombozyten mit ADP und Zugabe von Erythrozyten ($p=0,000007$). Bei gleichzeitiger Aktivierung der Thrombozyten mit CRP und Zugabe von Erythrozyten wurde ein Mittelwert von 22,66 (\pm 3,80) ermittelt.

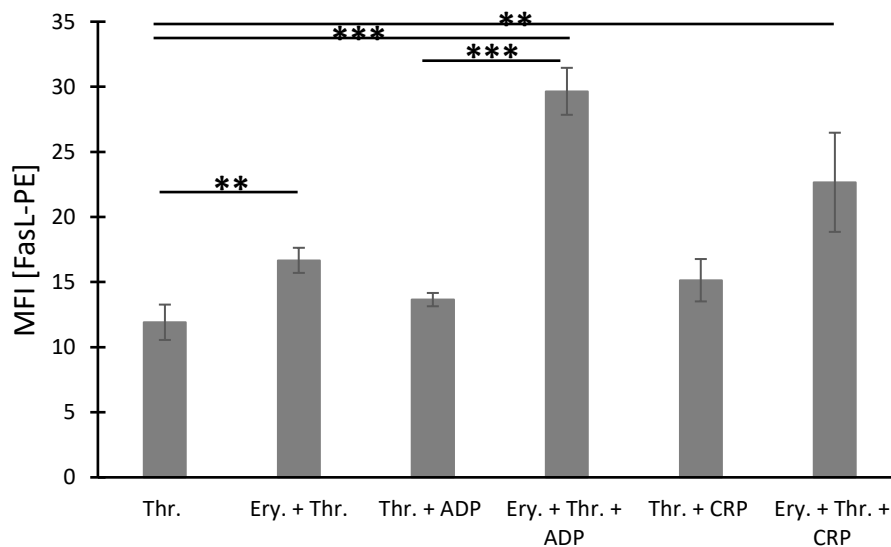


Abb. 6: Durchflusszytometrische Untersuchung der Fas-Ligand-Exposition auf ruhenden und aktivierten Thrombozyten (ADP, CRP) in An- und Abwesenheit von Erythrozyten

Nachweis der Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten (Thr.) unter statischen Bedingungen. In den statischen Versuchen wurden ruhende sowie mit CRP (5 μ g/ml) oder ADP (10 μ M) aktivierte Thrombozyten mit oder ohne Erythrozyten (Ery.) inkubiert und im Anschluss daran die Fas-Ligand-Exposition mit Hilfe eines Fas-Ligand-Antikörpers in der Durchflusszytometrie bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten aus 4-10 Versuchen, sowie die jeweilige S.E.M.. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. MFI= *mean fluorescence intensity*

3.3.3 Veränderung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Erythrozyten die Thrombus-Bildung beeinflussen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Erste *in vitro* Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass durch die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Erythrozyten die Bildung des Prothrombinasekomplexes unterstützt wird, sodass es zur Generierung von Thrombin kommt (Peyrou et al., **1999**). Thrombin ist zum einen ein starker Agonist, der zur Aktivierung von Thrombozyten führt (Brass et al., **2013**). Thrombin kann aber auch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin induzieren und somit zur Stabilität des Thrombus über die sekundäre Hämostase beitragen (Scheraga, **2004**, Coughlin, **2000**). Daher sollte in den nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob Erythrozyten über die Exposition von Phosphatidylserinen an der Thrombusbildung beteiligt sind.

Die Exposition von Phosphatidylserinen kann durch die Bindung von AnnexinV-Cy5 in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Als Maßeinheit für die AnnexinV-Bindung und damit der Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Erythrozyten wird der prozentuale Anteil an Zellen mit einer erhöhten PS-Exposition in einem mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-Antikörper erstellten *Gate* verwendet (% *Gated*).

Als Negativkontrolle wurden frisch isolierte Erythrozyten aus gesundem Spenderblut verwendet. Der Mittelwert der PS-Exposition auf frischen Erythrozyten liegt bei 0,4 % ($\pm 0,14$) (Abb. 7). Im nachfolgenden wurde untersucht, ob die PS-Exposition auf Erythrozyten bei Zugabe von ruhenden oder mit CRP stimulierten Thrombozyten oder bei Zugabe des Überstandes von aktivierten Thrombozyten moduliert wird. Erst nach einer 10-minütigen Inkubationszeit dieser Ansätze erfolgt die Färbung mit AnnexinV-Cy5 zum Nachweis der PS-Exposition.

Bei Zugabe aktivierter Thrombozyten zu Erythrozyten zeigt sich ein signifikanter Anstieg der PS-Exposition (2,5 % ($\pm 0,34$)) im Vergleich zur Zugabe von ruhenden Thrombozyten mit 0,6 % ($\pm 0,17$) ($p=0,0006$) (Abb. 7). Kein signifikanter Anstieg der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten konnte durch Zugabe von Überständen ruhender oder aktivierter Thrombozyten detektiert werden (Abb. 7).

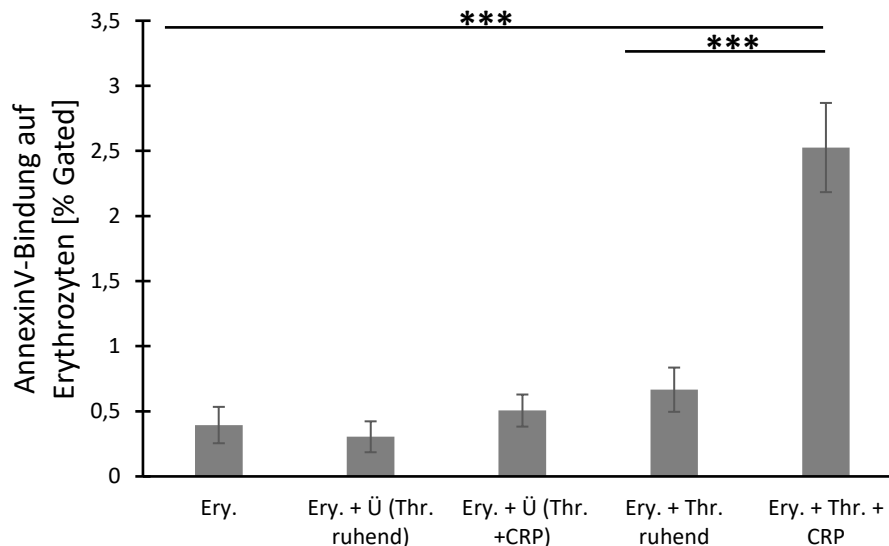


Abb. 7: Veränderung der PS-Exposition auf Erythrozyten durch aktivierte Thrombozyten

Nachweis des Anteils PS-positiver Erythrozyten unter statischen Bedingungen. Es wurden Erythrozyten (Ery.) allein oder mit ruhenden (Thr.) bzw. aktivierten Thrombozyten (Thr. +CRP (5 $\mu\text{g/ml}$)) oder dem Überstand (Ü) der Thrombozyten inkubiert und im Anschluss daran die PS-Exposition durch Bindung des Proteins AnnexinV in der Durchflusszytometrie bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte des Anteils PS-positiver Erythrozyten in % in einem mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-Antikörper bestimmten *Gate* (% *gated*), sowie die S.E.M.. $n=7$.
*** $p \leq 0,001$.

3.3.4 Einfluss des Fas-Ligand-Inhibitors DcR3 auf die PS-Exposition auf Erythrozyten

Der *Decoy Receptor 3* (DcR3) gehört zur TNF Rezeptor Familie und bindet kompetitiv am Membran-gebundenen Fas-Liganden ohne eine Signaltransduktion zu induzieren. In diesem Versuch erfolgt der Einsatz des DcR3, um eine Interaktion von Thrombozyten und Erythrozyten über den Fas-Liganden zu blockieren. Auf diese Weise wird die Hypothese verfolgt, dass der Fas-Ligand der Thrombozyten zur Interaktion mit den Erythrozyten dient und durch diese Interaktion die bereits nachgewiesenen Veränderungen der PS-Exposition durch die Zugabe aktivierter Thrombozyten (Abb. 7) induziert werden. In statischen Versuchen wurden verschiedene Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten hinsichtlich ihrer PS-Exposition auf Erythrozyten untersucht (Abb. 8). Die Zugabe ADP-stimulierter Thrombozyten zu Erythrozyten führt im Vergleich zu Erythrozyten und ruhenden Thrombozyten zu einem signifikanten Anstieg der AnnexinV-positiven Erythrozyten (von 100 % auf 195 % ($\pm 12,27$), $p=0,0001$). Durch die Zugabe von DcR3 zu den ADP-stimulierten Thrombozyten und Erythrozyten sinkt der Anteil AnnexinV-positiver Erythrozyten auf 122,36 % ($\pm 11,83$) im Vergleich zu ADP-stimulierten Thrombozyten und Erythrozyten und führt somit zu einer signifikanten Reduktion von AnnexinV-positiven Erythrozyten ($p = 0,03$).

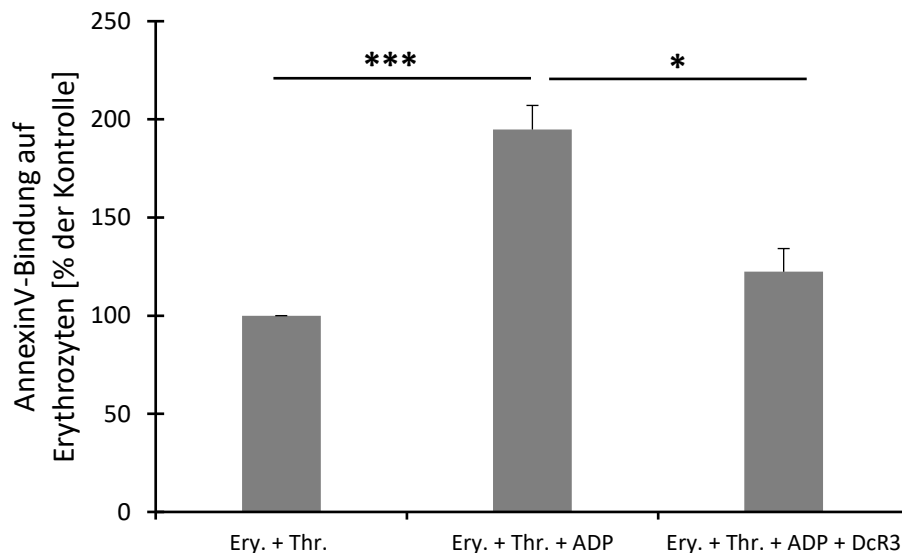


Abb. 8: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten durch DcR3

Nachweis des Anteils PS-positiver Erythrozyten unter statischen Bedingungen. Erythrozyten (Ery.) wurden mit ruhenden (Thr.) oder aktivierten Thrombozyten (Thr. + ADP (10 μ M)) sowie mit dem Fas-Ligand-Inhibitor *Decoy Receptor 3* (DcR3, 10 μ g/ml) inkubiert und die PS-Exposition durch AnnexinV-Bindung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte des Anteils PS-positiver Erythrozyten in % in einem mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-Antikörper bestimmten Gate im Vergleich zur Kontrolle „Erythrozyten + Thrombozyten (ruhend)“ (% der Kontrolle), sowie die S.E.M.. $n=7$. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

3.3.5 Einfluss des inhibierenden Fas-Rezeptor-Antikörpers auf die PS-Exposition von Erythrozyten

Der Fas-Rezeptor auf Erythrozyten induziert als apoptotisches Signal durch einen intrazellulären Signalweg die PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten (Mandal et al., 2005). Der Fas-Rezeptor-Antikörper (CD95-Antikörper) blockiert den erythrozytären Fas-Rezeptor und verhindert eine interzelluläre Interaktion über den Fas-Rezeptor. Um zu untersuchen, ob dieser apoptotische Mechanismus eine Rolle bei der Exposition von PS auf der Erythrozytenoberfläche sowie bei der Bildung eines Thrombus spielt, wurde ein hemmender Fas-Rezeptor-Antikörper verwendet und nachfolgend die PS-Exposition der Erythrozyten gemessen.

Unter statischen Bedingungen wurden dazu verschiedene Ansätze von Erythrozyten und Thrombozyten hinsichtlich ihrer PS-Exposition auf Erythrozyten untersucht (Abb. 9). Als Negativkontrolle dienten Erythrozyten, die mit ruhenden Thrombozyten inkubiert wurden. Erythrozyten, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte AnnexinV-Bindung von 151,6 % ($\pm 16,12$) im Vergleich zur Inkubation von Erythrozyten mit ruhenden Thrombozyten (100%) ($p=0,002$). Werden die Erythrozyten jedoch zuvor mit dem blockierenden Fas-Rezeptor-Antikörper behandelt, wird die Exposition von PS auf der Erythrozytenoberfläche signifikant reduziert ($p=0,012$). Die AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche der mit dem Fas-Rezeptor-Antikörper behandelten Erythrozyten beträgt 107,9 % ($\pm 6,01$) und ist nicht signifikant unterschiedlich zur AnnexinV-Bindung der Negativkontrolle (100%). Signifikante Unterschiede ergeben sich jedoch zur Positivkontrolle in Abwesenheit des blockierenden Antikörpers (Erythrozyten+Thrombozyten+ADP) ($p=0,012$).

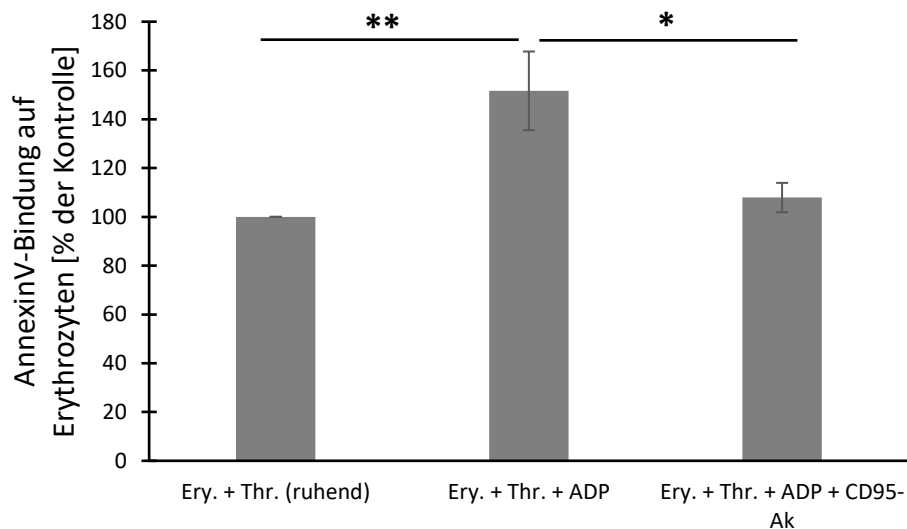


Abb. 9: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten durch den Fas-Rezeptor-Antikörper

Nachweis PS-positiver Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie. Erythrozyten (Ery.) wurden mit ruhenden (Thr.) oder aktivierten Thrombozyten (Thr. + ADP (10 μ M)) sowie mit dem Fas-Rezeptor-/CD95-Antikörper (CD95-Ak, 10 μ g/ml) inkubiert und die PS-Exposition mittels AnnexinV-Bindung in der Durchflusszytometrie bestimmt. In den Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten ohne den CD95-AK wird stattdessen IgG in einer Konzentration von 10 μ g/ml als Kontrolle eingesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte des Anteils PS-positiver Erythrozyten in % in einem mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-Antikörper bestimmten Gate im Vergleich zur Kontrolle „Erythrozyten + Thrombozyten (ruhend)“ (% der Kontrolle), sowie die S.E.M.. $n=9$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.3.6 Einfluss des inhibierenden Fas-Rezeptor-Antikörpers auf die PS-Exposition der Thrombozyten

Unter statischen Bedingungen wurden verschiedene Ansätze von Erythrozyten und Thrombozyten hinsichtlich ihrer PS-Exposition auf Thrombozyten untersucht (Abb. 10). Als Negativkontrolle dienten ruhende Thrombozyten, die mit Erythrozyten inkubiert wurden. Durch eine Aktivierung von Thrombozyten mit ADP oder CRP wird eine signifikante Veränderung der AnnexinV-Bindung an Thrombozyten im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten gemessen ($p=0,04$ für Thr.+ADP, $p=0,002$ für Thr.+CRP im Vergleich zu Thr. (ruhend)). Auf mit Erythrozyten und ADP inkubierten Thrombozyten konnte eine signifikant erhöhte AnnexinV-Bindung von 374,6 % ($\pm 76,18$) im Vergleich zu Erythrozyten mit ruhenden Thrombozyten (100%) detektiert werden ($p=0,002$). Auch bei einer Aktivierung der Thrombozyten mit CRP wird in Inkubationen von Erythrozyten mit aktivierten Thrombozyten im Vergleich zur Negativkontrolle eine stark erhöhte AnnexinV-Bindung an Thrombozyten gemessen ($p=0,001$). In Inkubationen von Erythrozyten und ADP-aktivierten Thrombozyten, die den Fas-Rezeptor-Antikörper enthalten, wird eine signifikant reduzierte AnnexinV-Bindung an Thrombozyten im Vergleich zur Kontrolle ohne den Fas-Rezeptor-Antikörper gemessen ($p=0,04$). In Inkubationen von Erythrozyten und CRP-aktivierten Thrombozyten mit dem Fas-Rezeptor-Antikörper wird eine signifikant reduzierte AnnexinV-Bindung an Thrombozyten im Vergleich zur Kontrolle ohne den Fas-Rezeptor-Antikörper gemessen ($p=0,02$) (Abb. 10).

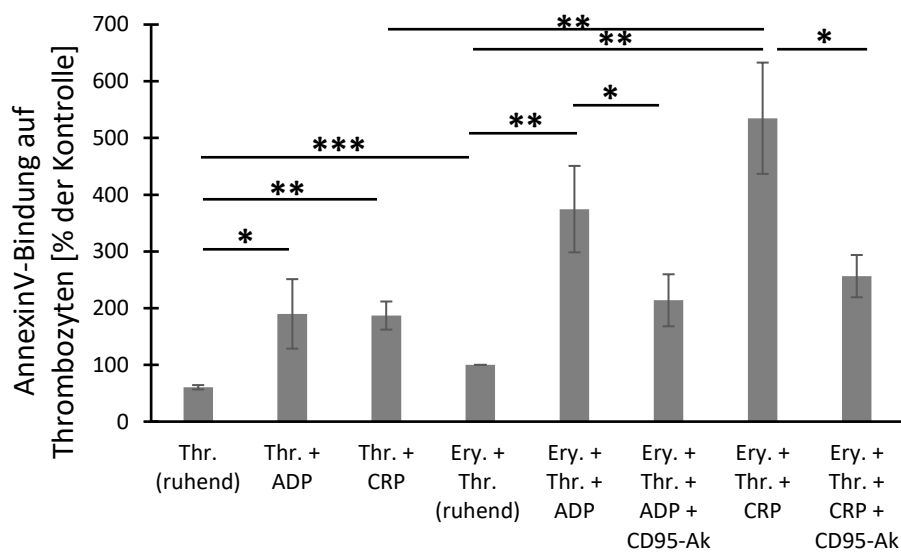


Abb. 10: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Thrombozyten durch den Fas-Rezeptor-Antikörper

Nachweis PS-positiver Thrombozyten unter statischen Bedingungen in der Durchflusszytometrie. Erythrozyten (Ery.) wurden mit ruhenden (Thr.) oder aktivierten Thrombozyten (Thr. + ADP (10 μ M), Thr. + CRP (5 μ g/ml)) sowie mit dem Fas-Rezeptor-/CD95-Antikörper (CD95-Ak, 10 μ g/ml) inkubiert und die PS-Exposition mittels AnnexinV-Bindung in der Durchflusszytometrie bestimmt. In den Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten ohne den CD95-AK wird stattdessen IgG in einer Konzentration von 10 μ g/ml als Kontrolle eingesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte des Anteils PS-positiver Thrombozyten in % im Vergleich zur Kontrolle „Erythrozyten + Thrombozyten (ruhend)“ (% der Kontrolle) \pm S.E.M.. $n=4-6$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.3.7 Thrombinnachweis (TAT und PTF)

Die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Erythrozyten und Thrombozyten führt zur Thrombin-Generierung (Peyrou et al., **1999**, Bevers et al., **1982**, Whelihan et al., **2012**). In statischen Versuchen wird deshalb überprüft, ob die Exposition von Phosphatidylserinen zur Thrombin-Bildung führt. Daher wurde in nachfolgenden Untersuchungen über einen indirekten Nachweis die Thrombin/Antithrombin III Komplexe (TAT) und die Prothrombinfragmente 1+2 (PTF) bestimmt.

Die Anzahl der in diesem Versuch gemessenen Thrombin/Antithrombin III Komplexe liegt in allen Ansätzen (außer in der Positivkontrolle *platelet-poor-plasma* (PPP)) zwischen 1,7 und 1,8 µg/l und damit im Referenzbereich des Tests (Abb. 11 A). Der Vergleich aller Messungen (außer der Vergleich zur Positivkontrolle PPP) zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Die Anzahl der im Versuch gemessenen Prothrombinfragmente 1 und 2 liegt in allen Ansätzen (außer der Positivkontrolle PPP) zwischen 24 und 36 pmol/l und damit teilweise außerhalb des Referenzbereiches des Tests, der über 29 pmol/l liegt (Abb. 11 B). Der Vergleich aller Messungen (außer der Positivkontrolle PPP) zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Eine Aussage über die Thrombin-Generierung in den unterschiedlichen Ansätzen kann mit Hilfe dieser Nachweisverfahren daher nicht gemacht werden.

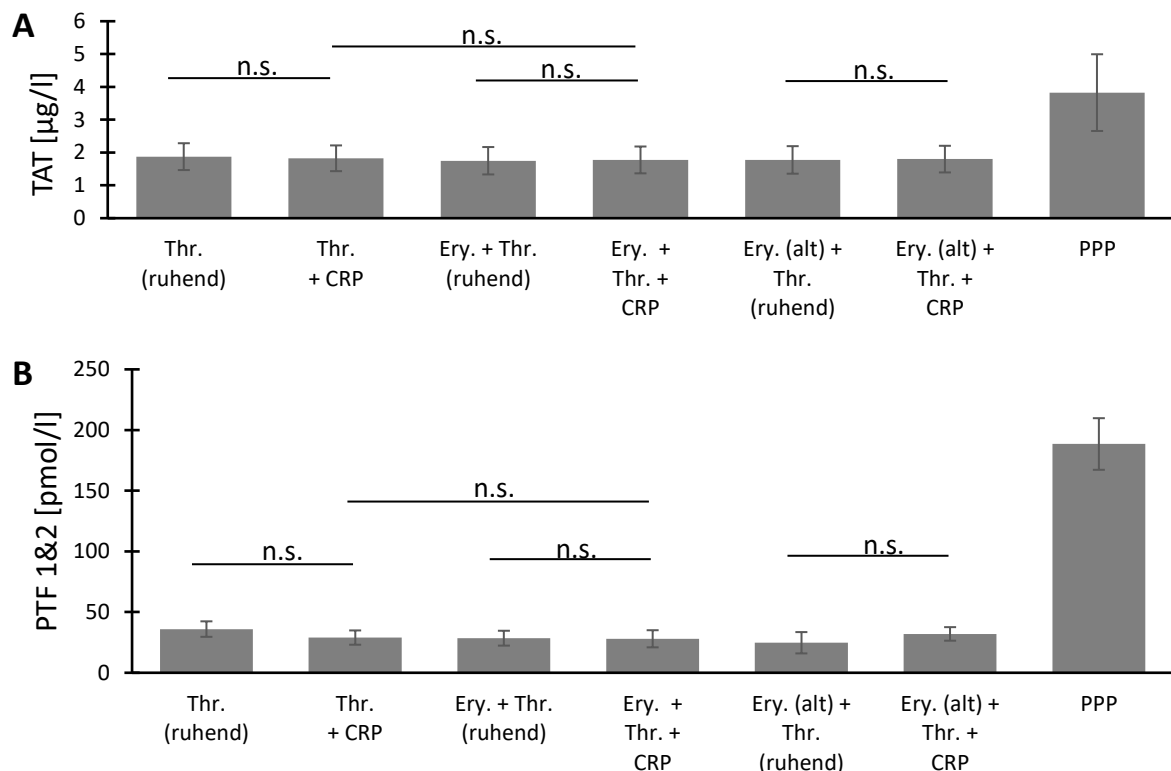
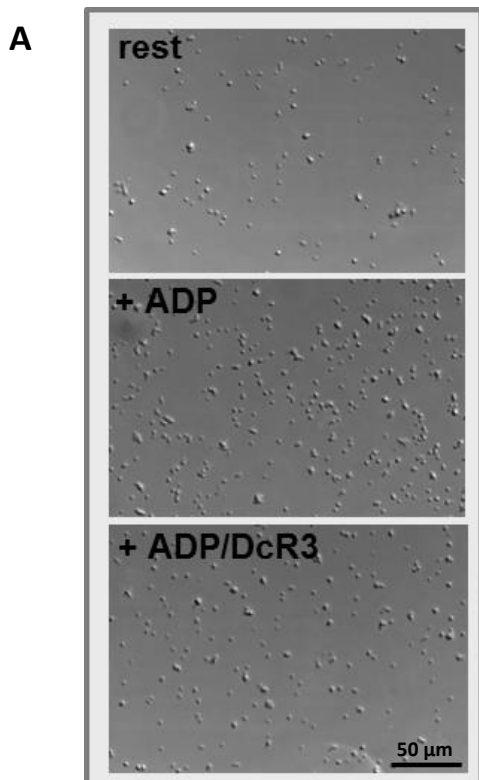


Abb. 11: TAT- und PTF-Messungen zur Thrombinbestimmung im Überstand verschiedener Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten

Der Thrombin/Antithrombin III Komplex (TAT, **A**) und die Prothrombinfragmente 1 und 2 (PTF, **B**) wurden in den Überständen der verschiedenen Ansätze unter statischen Bedingungen bestimmt. Die Ansätze bestehen aus ruhenden oder mit CRP (5 µg/ml) aktivierten Thrombozyten alleine (Thr.) sowie in Anwesenheit von frischen bzw. alten Erythrozyten (Ery.). Das Plättchenarme Plasma (PPP) dient als Kontrolle für diesen Versuch. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus 4 unabhängigen Versuchen. n=4. n.s.= nicht signifikant.

3.4 Quantifizierung adhärenter Thrombozyten an immobilisiertem Fas-Rezeptor

Zur Messung einer Bindung aktivierter Thrombozyten an den Fas-Rezeptor (CD95) werden Adhäsionsversuche auf CD95-beschichteten Deckgläschen durchgeführt. In einem Ansatz wird das Adhäsionsverhalten ruhender Thrombozyten (rest.) an CD95 gemessen. Hier zeigt sich eine geringe Adhäsion (Abb. 12 A). Werden jedoch mit ADP aktivierte Thrombozyten auf die Deckgläschen gegeben, zeigt sich eine mit 210,6 % ($\pm 24,93$) signifikant gesteigerte Anzahl adhärenter Thrombozyten im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten (Abb. 12 A&B) ($p=0,006$). Werden die aktivierten Thrombozyten hingegen zuvor mit dem *Decoy Receptor* 3 (DcR3), der als Fas-Ligand-Inhibitor wirkt, behandelt, zeigt sich eine signifikant reduzierte Adhäsion an CD95 im Vergleich zu den unbehandelten aktivierten Thrombozyten (111,5 % $\pm 10,66$) ($p=0,02$). Zwischen der Kontrolle mit ausschließlich ruhenden Thrombozyten und dem Ansatz mit DcR3-behandelten aktivierten Thrombozyten zeigt sich kein signifikanter Unterschied.



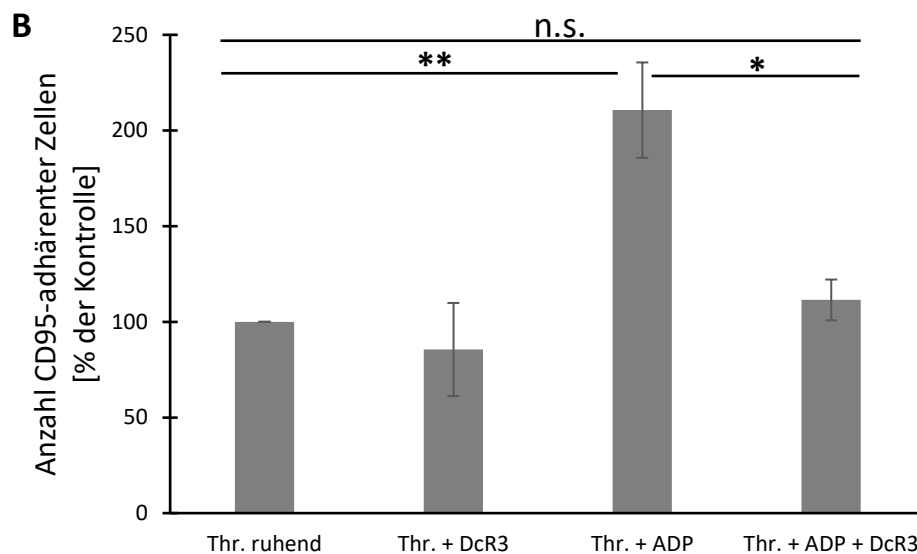


Abb. 12: Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf mit rekombinatem Fas-Rezeptor (CD95)-beschichteten Deckgläschen

Repräsentative Bilder (A) und quantitative Auswertung (B) der Adhäsion von Thrombozyten (Thr.) an Fas-Rezeptor (CD95)-beschichtete Deckgläschen (50 µg/ml) nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten. In A werden ruhende (rest.) Thrombozyten, mit ADP aktivierte Thrombozyten und aktivierte Thrombozyten, die zusätzlich mit dem *Decoy Receptor 3* (DcR3) behandelt wurden, verwendet. Die Anzahl der Thrombozyten beträgt jeweils $2 \times 10^5/\mu\text{l}$. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt mit ADP in einer finalen Konzentration von 10 µM. Der DcR3 wird in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. In den Inkubationen ohne den DcR3 wird stattdessen IgG-Fc in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte von Fas-Rezeptor-adhärenter Zellen in % der Kontrolle aus je 3 Versuchen \pm S.E.M.. $n=3$. (Maßstab Balken = 50 µm), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.5 Dynamische Versuche: Einfluss blockierender Antikörper zur Hemmung der Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-Interaktion auf die Thrombus-Bildung unter Flussbedingungen

In der Flusskammer (Standard) werden blockierende Antikörper zur Hemmung der Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-Interaktion eingesetzt und die Thrombus-Bildung unter Einfluss dieser Antikörper mit der von unbehandeltem Vollblut verglichen.

Mit dem rekombinanten humanen *Decoy Receptor 3* (DcR3) erfolgt die Blockade des Fas-Liganden der Thrombozyten. Die Auswirkungen des DcR3 auf die Thrombus-Bildung werden anhand der Thrombus-Fläche in der Flusskammer gemessen. Des Weiteren wird die PS-Exposition der Erythrozyten in den entstehenden Thromben durchflusszytometrisch bestimmt.

In weiteren Flusskammerexperimenten wird der CD95-Antikörper eingesetzt, der den Fas-Rezeptor der Erythrozyten blockiert und so eine Interaktion von Fas-Ligand und –Rezeptor verhindert. Nach Einsatz des CD95-Antikörpers werden die Thrombus-Bildung in der Flusskammer sowie die PS-Exposition der Erythrozyten in den entstehenden Thromben gemessen.

3.5.1 Einfluss vom DcR3 auf die Thrombus-Bildung unter Flussbedingungen

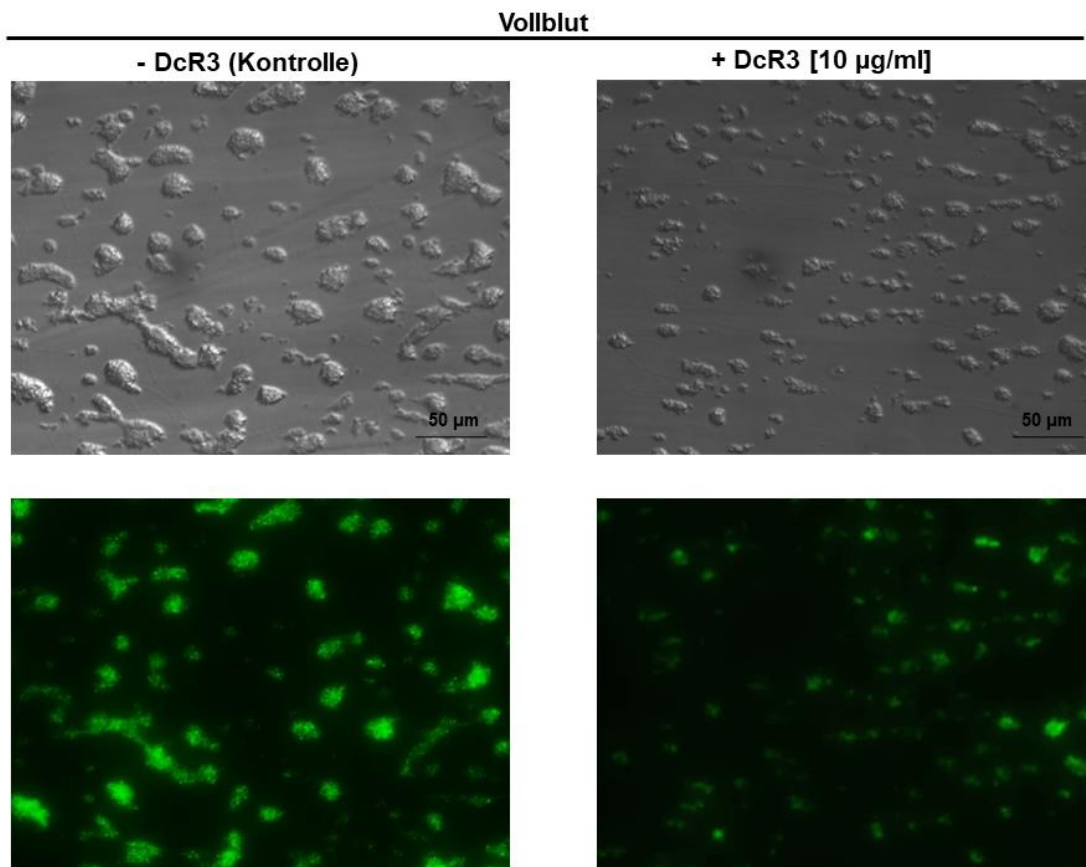
Zur Prüfung der Hypothese, dass der Fas-Ligand der Thrombozyten während der Thrombus-Bildung mit den Erythrozyten interagiert, erfolgt die Blockade des thrombozytären Fas-Liganden mit dem Fas-Ligand-Inhibitor *Decoy Receptor 3* (DcR3). Die Auswirkungen des DcR3 auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer werden mit Hilfe verschiedener Parameter untersucht. Die entstehende Thrombus-Fläche wird als prozentualer Anteil der Gesamtfläche der Flusskammer bestimmt. Zusätzlich wird die mittlere Fluoreszenzintensität der entstehenden Thromben mit Hilfe des

Fluoreszenzmarkers Mepacrine bestimmt. In der Kontrolle (-DcR3) wird eine Thrombus-Fläche von 34,09 % ($\pm 1,69$) gemessen (Abb. 13B). Beim DcR3-behandelten Vollblut beträgt die Thrombus-Fläche 24,57 % ($\pm 2,32$). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Thrombus-Fläche unter Einsatz des Fas-Ligand-Inhibitors DcR3 signifikant verringert ($p = 0,005$).

Auch die Messungen der mittleren Fluoreszenzintensität als Maß für das Thrombus-Volumen bestätigen dieses Ergebnis, da auch hier eine signifikante Reduktion des Thrombus-Volumens bei Zugabe des DcR3 gemessen wird ($p=0,0006$) (Abb. 13C). In der Kontrolle zeigen sich mittlere Fluoreszenzintensitäten von 1389 ($\pm 272,62$). Die Thromben des mit DcR3-behandelten Blutes zeigen mittlere Fluoreszenzintensitäten von 529,57 ($\pm 124,31$).

Im Anschluss an die Flusskammer wird die AnnexinV-Bindung an die Oberfläche der in den Thromben enthaltenen Erythrozyten in der Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 13D). Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion ($p = 0,001$) der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Erythrozyten um 39,2 % bei der Behandlung mit dem DcR3.

A



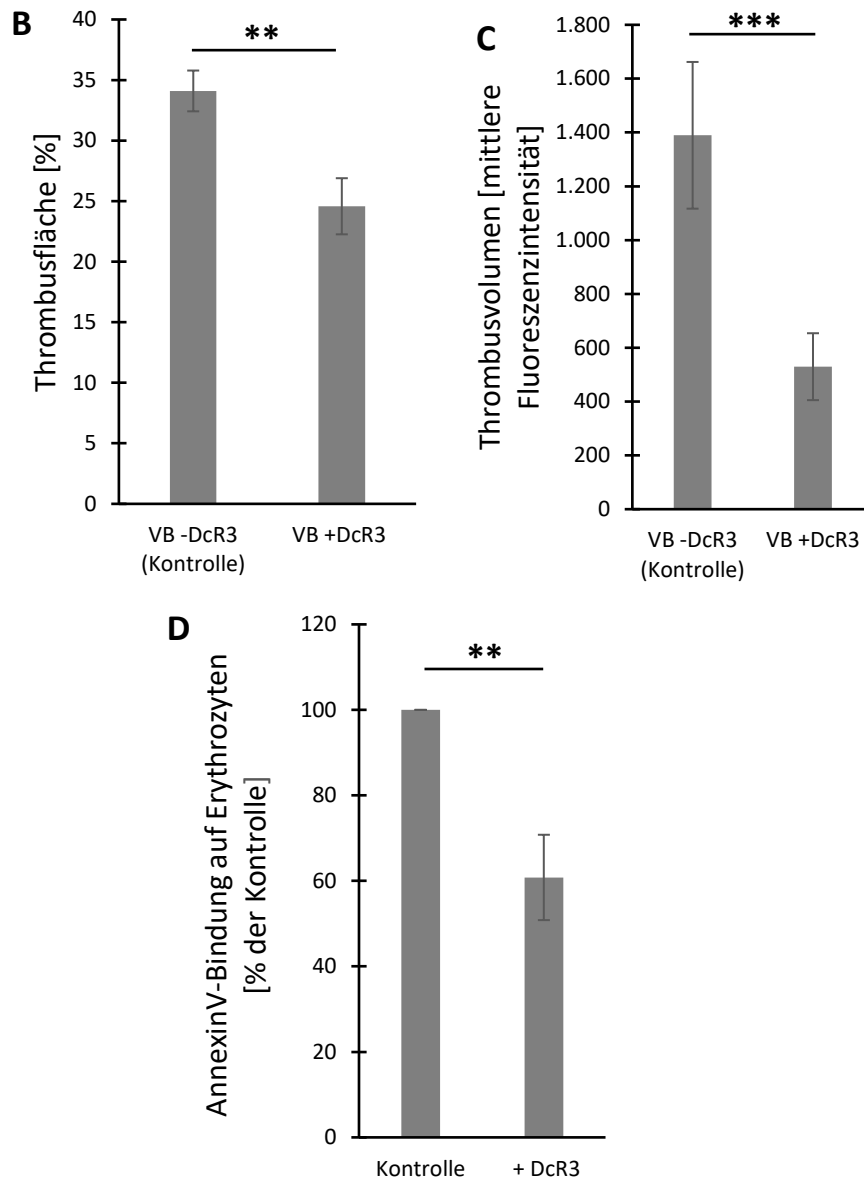


Abb. 13: Einfluss vom Fas-Ligand-Inhibitor DcR3 auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer

Repräsentative Bilder (A) und quantitative Auswertung (B,C,D) zur Thrombus-Bildung von unbehandeltem oder mit *Decoy Receptor 3* (DcR3) behandeltem Vollblut (VB). Die eingesetzte Konzentration des DcR3 entspricht 10 µg/ml. In der Kontrolle wird IgG-Fc in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Thromben haben sich innerhalb von 3 min. auf der Kollagenmatrix in der Flusskammer bei einer arteriellen Schergeschwindigkeit von 1000 s⁻¹ gebildet. Das Balkendiagramm B zeigt die Mittelwerte der Thrombus-Fläche in % aus je 5 Versuchen ± S.E.M. für den Vergleich von Vollblut und mit DcR3-behandeltem Vollblut. n=5. Das Balkendiagramm C zeigt die Mittelwerte des Thrombus-Volumens, das mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität bestimmt wird, aus je 6 Versuchen ± S.E.M. für den Vergleich von Vollblut mit dem DcR3-behandeltem Vollblut. n=6. Als Fluoreszenzmarker wird Mepacrine in einer finalen Konzentration von 10 µM eingesetzt. Im Balkendiagramm D werden die Mittelwerte der *Events* in % der Kontrolle für die AnnexinV-Bindung auf Erythrozyten der Thromben aus 6 Versuchen, sowie die S.E.M. gezeigt. (Maßstabballen= 50 µm), ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

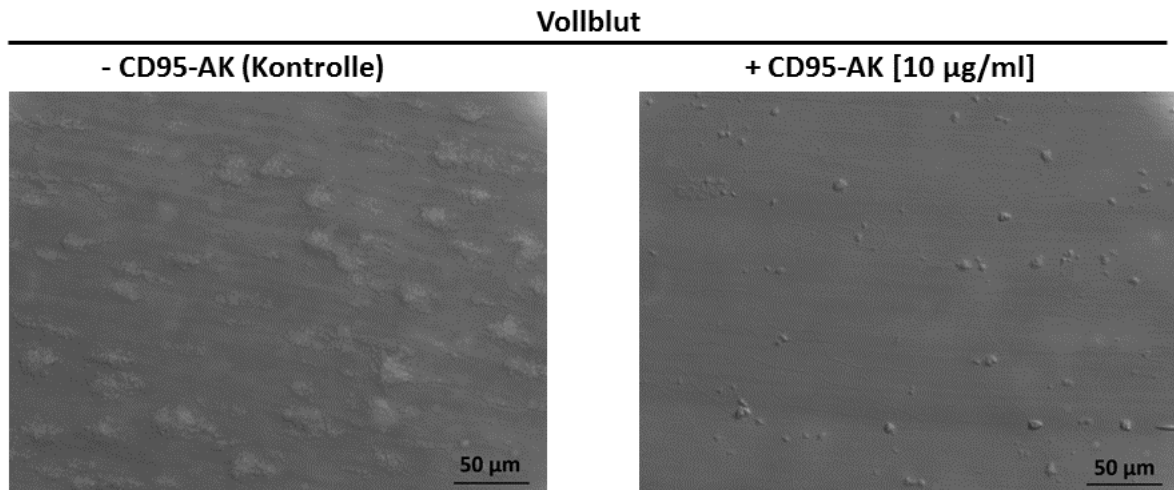
3.5.2 Einfluss des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer

Zur Prüfung der Hypothese, dass der Fas-Rezeptor der Erythrozyten während der Thrombus-Bildung mit den Thrombozyten über den Fas-Liganden interagiert, erfolgt die Blockade des erythrozytären Fas-Rezeptors mit dem CD95-Antikörper. Die Auswirkungen des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer werden mit Hilfe verschiedener Parameter untersucht. Die entstehende Thrombus-Fläche wird als prozentualer Anteil der Gesamtfläche der Flusskammer bestimmt.

Das unbehandelte Vollblut (Kontrolle, -CD95) zeigt mit einer Thrombus-Fläche von 39,5 % ($\pm 1,03$) eine typische Thrombus-Bildung (Abb. 14A). In den Flusskammerexperimenten des mit CD95-inkubierten Vollblutes ist eine deutliche Reduktion der Thrombus-Bildung im Vergleich zum unbehandelten Vollblut zu erkennen ($p=0,000001$). Die Thrombus-Fläche des CD95-behandelten Vollblut beträgt 11,18 % ($\pm 0,63$) (Abb. 14B).

Im Anschluss an den Flusskammerlauf wird die AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche der in den Thromben enthaltenen Erythrozyten und Thrombozyten in der Durchflusszytometrie gemessen. Die absolute Anzahl der AnnexinV-positiven Zellen wird in der Durchflusszytometrie als *Events* gemessen. In allen Thromben aus den Flusskammerläufen wird eine signifikante Reduktion (mit $p= 0,003$) der *Events* von Erythrozyten mit AnnexinV-Bindung bei Behandlung des Vollblutes mit dem CD95-Antikörper im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Es ist eine Reduktion von 100 % der Kontrolle auf 53,98 % ($\pm 12,77$) nachweisbar (Abb. 14C). Des Weiteren wurde die AnnexinV-Bindung an der Oberfläche der in den Thromben enthaltenen Thrombozyten in der Durchflusszytometrie bestimmt. In den Thromben des CD95-inkubierten Vollblutes wird im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion der *Events* von Thrombozyten mit AnnexinV-Bindung detektiert. Der Unterschied von 100 % der Kontrolle auf 54,48 % ($\pm 21,49$) ist signifikant ($p=0,028$) (Abb. 14D).

A



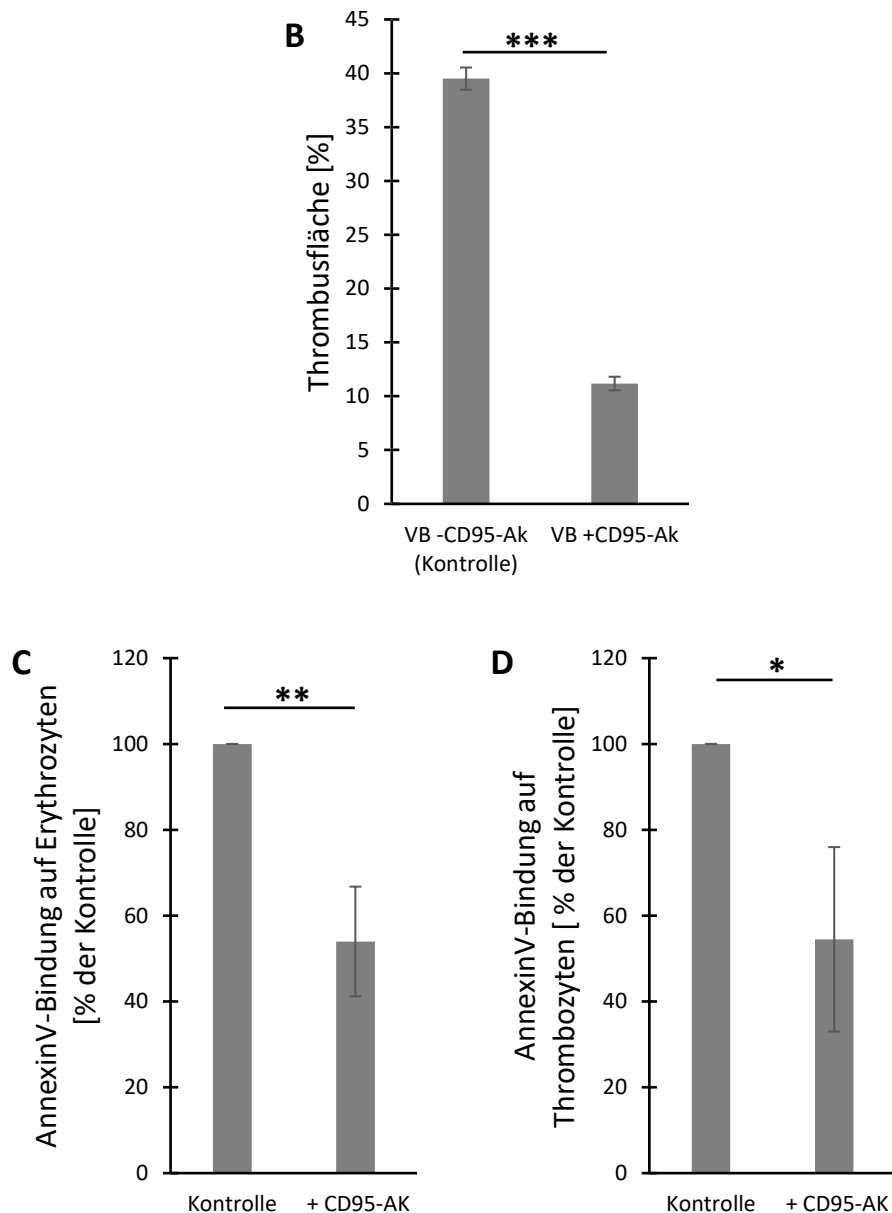


Abb. 14: Einfluss des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Bildung sowie die PS-Exposition der Erythrozyten und Thrombozyten in der Flusskammer

Repräsentative Bilder (A) und quantitative Auswertung (B,C,D) zur Thrombus-Bildung von unbehandeltem (Kontrolle) oder mit CD95-Antikörper (10µg/ml) behandeltem humanem Vollblut (VB). Die Thromben haben sich innerhalb von 3 min. auf der Kollagenmatrix in der Flusskammer bei einer arteriellen Schergeschwindigkeit von 1000 s⁻¹ gebildet. Das Balkendiagramm B zeigt die Mittelwerte der Thrombus-Fläche in % ± S.E.M. für den Vergleich von Vollblut und mit dem CD95-AK-behandeltem Vollblut. n=5. Im Balkendiagramm C werden die Mittelwerte der *Events* in % der Kontrolle für die AnnexinV-Bindung auf Erythrozyten der Thromben, sowie die S.E.M. gezeigt. n=8. Im Balkendiagramm D werden die Mittelwerte der *Events* in % der Kontrolle für die AnnexinV-Bindung auf Thrombozyten der Thromben ± S.E.M. gezeigt. n=7. (Maßstab Balken= 50 µm) * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

3.6 Thrombus-Bildung unter pathologischen Bedingungen

Um die Thrombus-Bildung auch unter pathologischen Bedingungen untersuchen zu können, sind humane arterielle Thromben analysiert worden. Die Thromben stammen von Patienten der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (2.1.7. Biologische Proben). Es erfolgte eine histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Morphologie dieser Thromben und eine durchflusszytometrische Analyse der in den Thromben enthaltenen Zellen.

3.6.1 Morphologie der humanen arteriellen Thromben

Die mikroskopischen Aufnahmen der humanen Thromben zeigen Erythrozyten, die in Form von Erythrozyten-Inseln vorliegen (Abb. 15 A, A'). In einzelnen Thromben lassen sich viele kernhaltige Zellen darstellen. Bei den kernhaltigen Zellen handelt es sich vermutlich um Leukozyten, die an dieser Stelle nicht genauer differenziert werden. Dies ist vor allem im Thrombus in der Abbildung 15 A erkennbar.

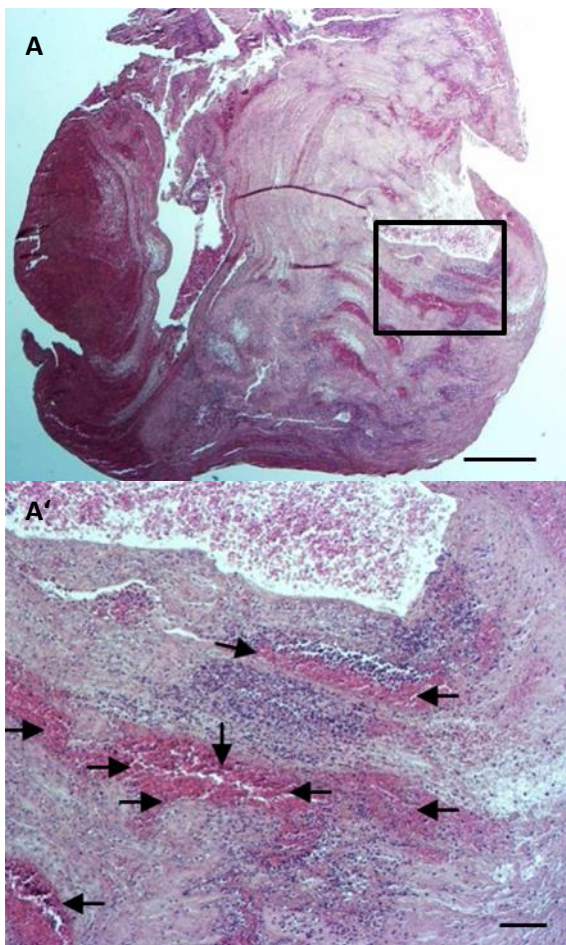


Abb. 15: Morphologie humaner Thromben

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen arteriellen Thromben in einer Hämalaun-Eosin-Färbung (A und A'). Eine Übersicht (A, Vergrößerung 25-fach, Maßstabbalken 500µm) und eine Vergrößerung (A', Vergrößerung 100-fach, Maßstabbalken 100µm), die in der Übersichtsaufnahme durch einen Rahmen gekennzeichnet ist. Erythrozyten-Inseln sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.

3.6.2 Morphologie muriner arterieller Thromben

Die humanen Thromben werden mit Thromben in arteriellen Gefäßen von Mäusen verglichen. Dabei wird durch die Behandlung der Arteria carotis communis mit Eisen(III)-chlorid (FeCl_3) das Gefäß verletzt und so die Bildung eines okklusiven Thrombus induziert.

Die den Thrombus enthaltenden Carotiden werden herauspräpariert und auf die gleiche Weise wie die humanen Thromben histologisch untersucht. In den mikroskopischen Aufnahmen der murinen Thromben sind Erythrozyten-Inseln zu erkennen (Abb. 16). Neben dem hier beschriebenen Thrombus ist die Carotis mit dem typischen Aufbau eines arteriellen Gefäßes erkennbar.

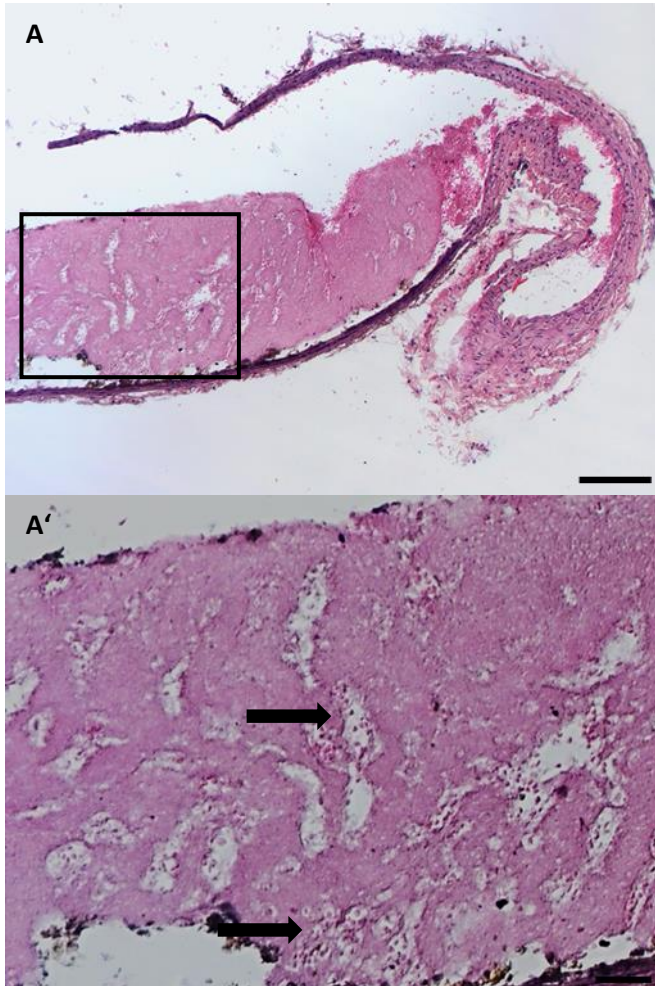


Abb. 16: Lage von Erythrozyten in murinen Thromben

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von murinen arteriellen Thromben in der Carotis. Die Thrombus-Bildung wurde durch eine Verletzung des Gefäßes mit Eisen(III)-chlorid herbeigeführt. Erythrozyten-Inseln sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. Eine Übersicht (Vergrößerung 100-fach, Maßstabbalken 100 μ m) und eine Vergrößerung (Vergrößerung 400-fach, Maßstabbalken 20 μ m), die in der Übersichtsaufnahme durch einen Rahmen gekennzeichnet ist.

3.6.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner arterieller Thromben

Die hohe Auflösung der Elektronenmikroskopie ermöglicht eine detailreichere Darstellung der Thromben als es die Lichtmikroskopie zulässt. Zur morphologischen Untersuchung der humanen arteriellen Thromben werden diese zunächst fixiert und präpariert (2.2.6.3 Elektronenmikroskopie der humanen Thromben). In den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen sind Erythrozyten und Thrombozyten gut zu erkennen (Abb. 17). Nicht aktivierte Thrombozyten zeigen in den Aufnahmen eine Vielzahl verschiedener elektronendichter Granula (Abb. 17A'). Handelt es sich um aktivierte Thrombozyten so erscheinen diese heller, da die zuvor enthaltenen Granula mit der Membran verschmolzen sind. Außerdem bilden die Thrombozyten bei Aktivierung Pseudopodien aus. An einigen Stellen haben Thrombozyten direkten Zellkontakt zu den Erythrozyten (Abb. 17). Schon diese morphologischen Beobachtungen können einen

Hinweis auf eine mögliche Rezeptor-vermittelte Interaktion von Thrombozyten und Erythrozyten geben. In Abbildung 18 liegen die Membranen des Thrombozyten und Erythrozyt nah genug aneinander, sodass eine potentielle Interaktion über Rezeptoren möglich ist.

Neben diesen Beobachtungen konnten in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der arteriellen Thromben weitere Besonderheiten festgestellt werden. In einzelnen Thromben wurden Makrophagen dargestellt (Abb. 19). In Abbildung 19 ist ein Makrophage zu sehen, der einen Erythrozyten phagozytiert. Im gleichen Thrombus zeigen sich mehrere andere Makrophagen, in denen Eisenablagerungen nachgewiesen werden können, die vermutlich aus dem Abbau von Erythrozyten stammen. Des Weiteren stellen sich in den Thromben Zellen dar, die aufgrund der Morphologie vermutlich Schaumzellen darstellen (Abb. 20).

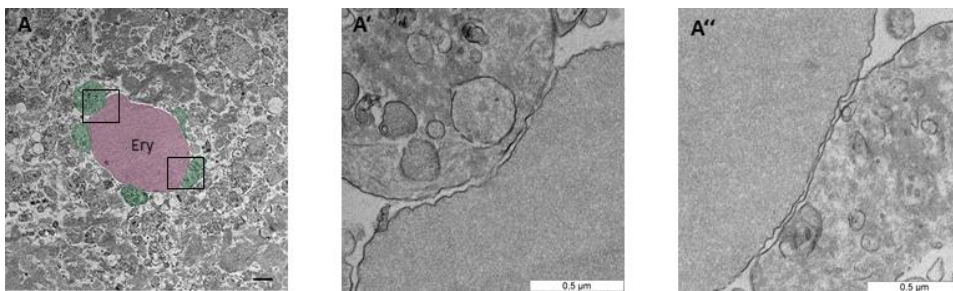


Abb. 17: Lage von Thrombozyten und Erythrozyten in humanen Thromben

Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten humaner arterieller Thromben. Eine Übersicht (linke Spalte, A) mit zwei Vergrößerungen (rechte Spalten, A', A''), die in der Übersicht durch Rahmen gekennzeichnet sind. Der Erythrozyt wird in rot dargestellt, Thrombozyten in grün. Maßstabbalken 0,5 µm.

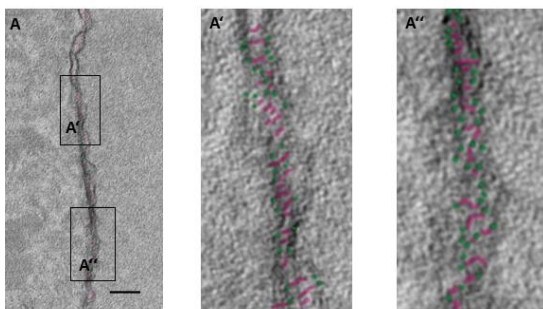


Abb. 18: Mögliche Interaktionen von Erythrozyten und Thrombozyten durch Zell-Zell-Kontakt

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten humaner arterieller Thromben. Eine Übersicht (linke Spalte, A) mit zwei Vergrößerungen (rechte Spalten, A', A''), die in der Übersicht durch Rahmen gekennzeichnet sind. Bei den farbig in grün und rosa dargestellten Strukturen handelt es sich vermutlich um Rezeptoren oder Liganden.

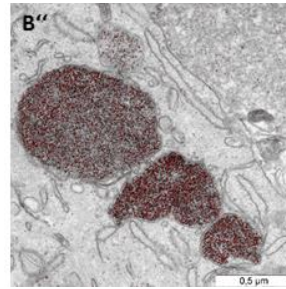
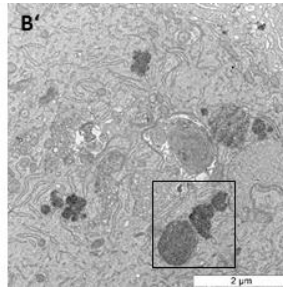
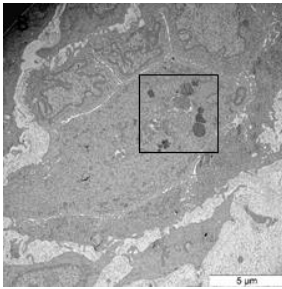
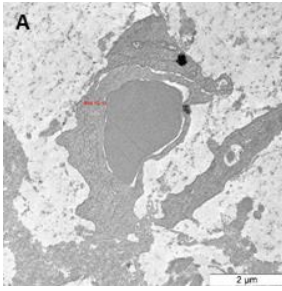


Abb. 19: Makrophagen in humanem arteriellen Thrombus

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Ultradünnschnitt eines humanen arteriellen Thrombus. Ein Makrophage, der einen phagozytierten Erythrozyten beinhaltet, als Teil des Thrombus (A, Maßstabbalken 2 µm). Eisenablagerungen in Makrophagen (B, Maßstabbalken 5 µm). Ausschnitte (B', Maßstabbalken 2 µm, B'', Maßstabbalken 0,5 µm) wurden durch schwarze Rahmen markiert. Das Eisen, hier in rot dargestellt (B''), stammt vermutlich aus phagozytierten Erythrozyten.

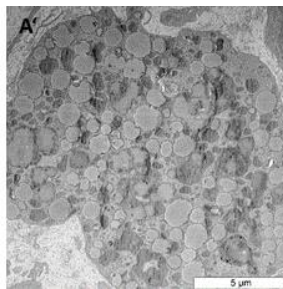
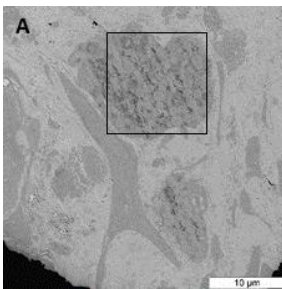


Abb. 20: Schaumzellen in humanen arteriellen Thromben

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten humaner arterieller Thromben. Schaumzellen als Teil des Thrombus (A, Maßstabbalken 10 µm). Der Ausschnitt (A', Maßstabbalken 5 µm) wurde durch einen schwarzen Rahmen markiert.

3.6.4 Zelluläre Zusammensetzung der humanen Thromben

Durchflusszytometrische Analysen der Thromben zeigen die zelluläre Zusammensetzung der Thromben (Abb. 21). Ein hoher Anteil von Erythrozyten und Thrombozyten kann nachgewiesen werden. Die humanen arteriellen Thromben bestehen zu 58,11 % (\pm 4,52) aus Erythrozyten und zu 40,97 % (\pm 4,48) aus Thrombozyten. Der übrige prozentuale Anteil entspricht vermutlich den wenigen Leukozyten, die in den Thromben enthalten sind.

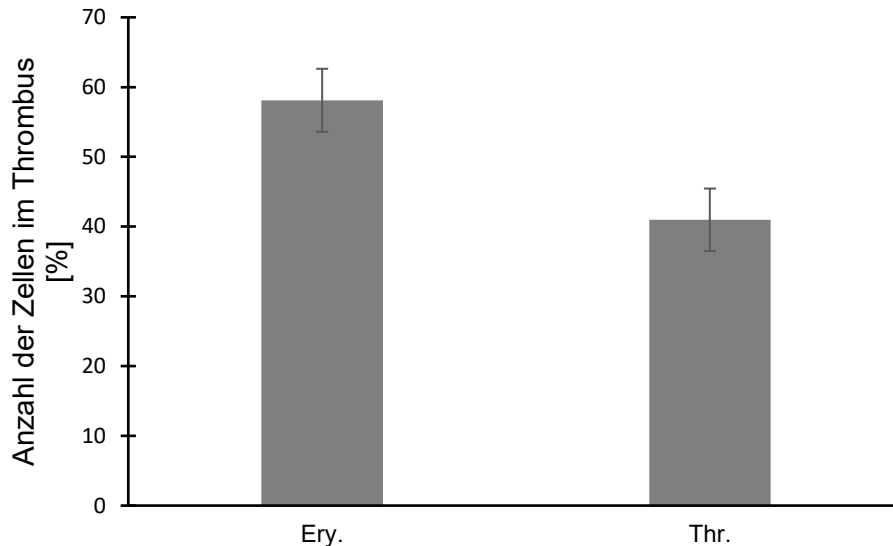


Abb. 21: Anteil von Erythrozyten und Thrombozyten in humanen arteriellen Thromben

Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils von Erythrozyten (Ery.) und Thrombozyten (Thr.) in den humanen arteriellen Thromben; Mittelwerte \pm S.E.M.. n=29.

3.6.5 Charakterisierung der Zellen in den humanen Thromben

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden der Fas-Ligand und das P-Selektin auf Thrombozyten sowie die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Thrombozyten und Erythrozyten bestimmt.

3.6.5.1 Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten in humanen Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten

Zur Bestimmung des Aktivierungsstatus der Thrombozyten in den Thromben wird die Expression von P-Selektin (CD62) auf der Oberfläche von Thrombozyten durchflusszytometrisch bestimmt. P-Selektin ist ein granuläres Membranprotein, das bei einer Thrombozyten-Aktivierung auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert wird. Dieses Protein wird in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert. Die Höhe der Exposition von P-Selektin der Thrombozyten in den Thromben wird mit der P-Selektin-Exposition der Thrombozyten aus statischen Versuchen mit Inkubationen aus ruhenden oder aktivierten Thrombozyten mit oder ohne Erythrozyten verglichen.

Im Ruhezustand liegt der Mittelwert für die P-Selektin-Exposition auf Thrombozyten bei 6,03 (\pm 0,78). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit CRP steigt der Mittelwert für die P-Selektin-Exposition auf 78,23 (\pm 5,85) (Abb. 22). Die Anwesenheit von Erythrozyten führt zu keiner Änderung der P-Selektin Expression CRP-aktivierter Thrombozyten. Bei einer Inkubation von ruhenden Thrombozyten mit Erythrozyten zeigt sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der P-Selektin-Exposition auf Thrombozyten. So liegt der Mittelwert bei ruhenden Thrombozyten bei 6,03 (\pm 0,78) und bei ruhenden Thrombozyten, die mit Erythrozyten inkubiert worden sind bei 7,62 (\pm 1,38) (Abb. 22). Der Mittelwert für die P-Selektin-Exposition aus Thrombozyten der humanen arteriellen Thromben liegt bei 33,66 (\pm 6,18). Die P-Selektin-Exposition der Thrombozyten in den humanen arteriellen Thromben

ist damit signifikant erhöht im Vergleich zu mit Erythrozyten inkubierten ruhenden Thrombozyten ($p=0,0047$).

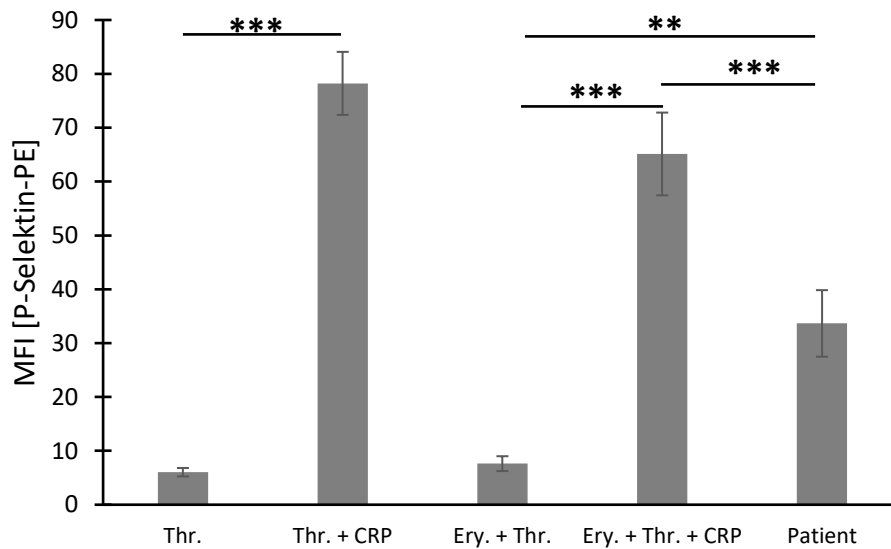


Abb. 22: P-Selektin (CD62)-Exposition der Thrombozyten humaner arterieller Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten

Nachweis der P-Selektin-Exposition auf Thrombozyten unter statischen Bedingungen und auf arteriellen Thromben der Patienten (Patient). Ruhende sowie mit CRP (5 $\mu\text{g/ml}$) aktivierte Thrombozyten werden ohne oder mit Erythrozyten inkubiert und im Anschluss daran die P-Selektin-Exposition mit Hilfe des CD62P-PE-Antikörpers in der Durchflusszytometrie bestimmt ($n=9-11$). Zudem erfolgt die Bestimmung der P-Selektin-Exposition auf den Thrombozyten humaner arterieller Thromben ($n=29$). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte \pm S.E.M. der P-Selektin-Exposition auf Thrombozyten. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. MFI= *mean fluorescence intensity*

3.6.5.2 Exposition des Fas-Liganden auf den Thrombozyten in humanen Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten

Im Vergleich zu mit Erythrozyten inkubierten ruhenden Thrombozyten zeigen die Thrombozyten aus den arteriellen Thromben eine hohe Fas-Ligand-Exposition (Abb. 23). In Inkubationen von Erythrozyten und ruhenden Thrombozyten wird eine Fas-Ligand-Exposition von 15,88 (\pm 1,098) gemessen. Eine Aktivierung der Thrombozyten mit CRP führt zu einer erhöhten Fas-Ligand-Exposition (21,34 (\pm 2,69)). Der Unterschied der Fas-Ligand-Exposition von ruhenden zu mit CRP aktivierten Thrombozyten mit Erythrozyten ist signifikant ($p=0,046$). In den Thromben liegt die Fas-Ligand-Exposition bei 44,43 (\pm 6,13). Damit weisen die in den Thromben enthaltenen Thrombozyten eine signifikant höhere Fas-Ligand-Exposition im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten in Inkubationen mit frischen Erythrozyten ($p=0,015$) sowie im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten in Inkubationen mit alten Erythrozyten ($p=0,0101$) auf.

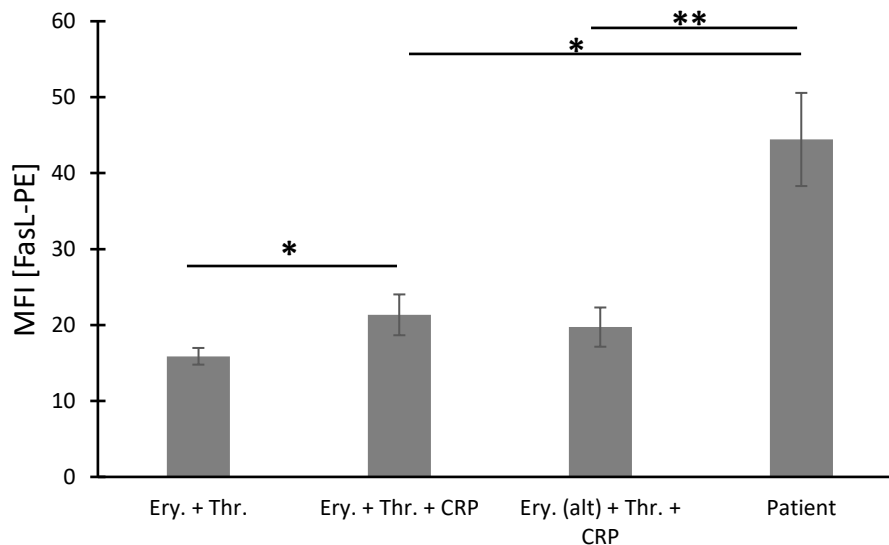


Abb. 23: Fas-Ligand-Exposition der Thrombozyten aus humanen arteriellen Thromben im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten

Nachweis des Fas-Liganden auf der Oberfläche von Thrombozyten. Die Fas-Ligand-Exposition wird auf mit Erythrozyten inkubierten ruhenden Thrombozyten (Ery. + Thr.), aktivierten Thrombozyten mit Erythrozyten (Ery. + Thr. + CRP (5 μ g/ml)), aktivierten Thrombozyten mit alten Erythrozyten (Ery. (alt) + Thr.+ CRP (5 μ g/ml)) sowie Thrombozyten aus den arteriellen Thromben der Patienten (Patient) mit Hilfe des Fas-Ligand-PE-Antikörpers (FasL-PE) in der Durchflusszytometrie bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt jeweils die Mittelwerte sowie die S.E.M. aus 9 unabhängigen statischen Versuchen im Vergleich zu den Patiententhromben. Das Fas-Ligand-Level wurde in 22 arteriellen Thromben (Patient) bestimmt. $n=9-22$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. MFI= *mean fluorescence intensity*

3.6.5.3 PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten in humanen arteriellen Thromben

In den humanen arteriellen Thromben (Patient) wurde eine hohe Phosphatidylserin-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten nachgewiesen. In den Thromben wird eine AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Erythrozyten von 23,36 % ($\pm 2,91$) gemessen (Abb. 24). In Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten ist eine AnnexinV-Bindung von 3,25 % ($\pm 0,53$) auf der Oberfläche von Erythrozyten nachweisbar. Der Unterschied der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Erythrozyten zwischen Thromben (Patient) und Erythrozyten mit ruhenden Thrombozyten ist signifikant ($n=0,002$). Auch der Vergleich der AnnexinV-Bindung von alten Erythrozyten, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert worden sind, mit Erythrozyten der Patiententhromben zeigt einen signifikanten Unterschied ($p=0,03$).

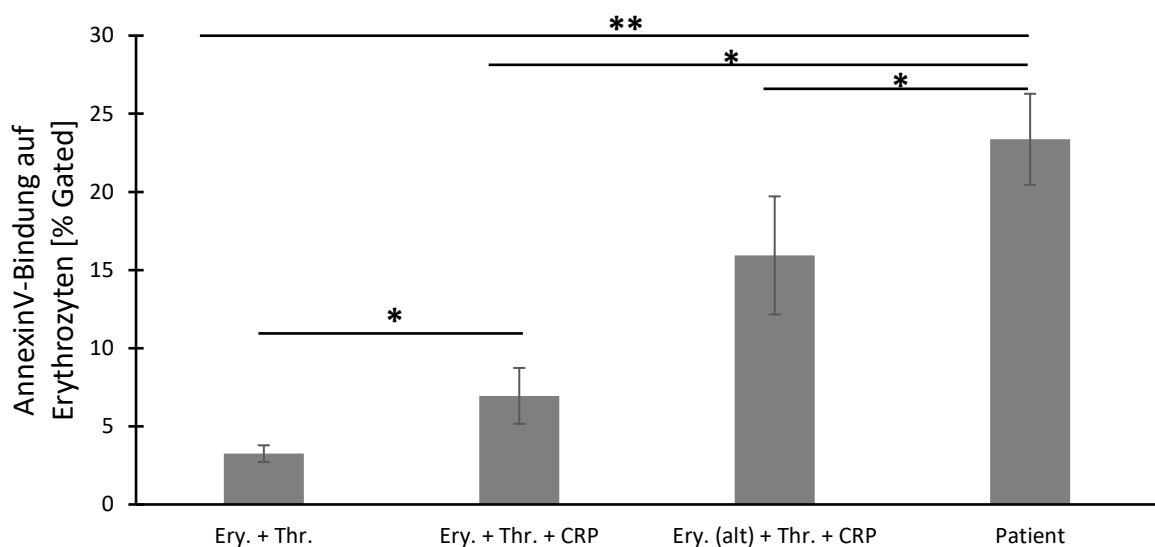


Abb. 24: AnnexinV-Bindung von Erythrozyten im Thrombus und in frischen und alten Erythrozyten

Nachweis der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Erythrozyten zum Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition mittels Durchflusszytometrie. Die Bestimmung erfolgte in den Thromben (Patient, insgesamt 27) und unter statischen Bedingungen. In den statischen Versuchen wurden frische und alte Erythrozyten mit Thrombozyten (Ery. + Thr.) oder mit aktivierten Thrombozyten (Ery. + Thr. + CRP/ Ery. (alt) + Thr. + CRP (5 μ g/ml)) inkubiert. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Erythrozyten in % in einem mit dem Erythrozyten-spezifischen CD235-Antikörper bestimmten *Gate* (% *Gated*) sowie die S.E.M.. $n=7$ (statische Versuche) $n=27$ (Thrombus aus Patient). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.6.5.4 PS-Exposition auf der Oberfläche von Thrombozyten in humanen arteriellen Thromben

Die in den humanen arteriellen Thromben enthaltenen Thrombozyten weisen eine hohe Phosphatidylserin-Exposition auf. Die gemessene AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von den in den Thromben enthaltenen Thrombozyten beträgt 64,2 % ($\pm 5,84$) (Abb. 25). Die AnnexinV-Bindung von Thrombozyten aus Inkubationen mit Erythrozyten wurde mit einem Wert von 5,79 % ($\pm 1,08$) bestimmt. Der Unterschied von der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Thrombozyten der Thromben zu mit Erythrozyten inkubierten ruhenden Thrombozyten ist signifikant ($p=0,00001$). Die AnnexinV-Bindung an aktivierten Thrombozyten in Inkubationen mit frischen Erythrozyten ist signifikant im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten ($p=0,00004$).

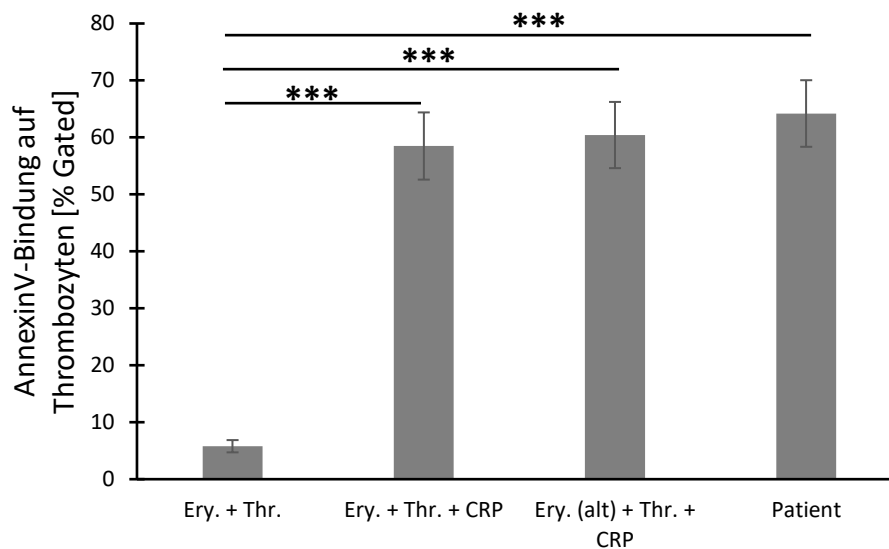


Abb. 25: AnnexinV-Bindung von Thrombozyten im Thrombus und ruhenden sowie aktivierten Thrombozyten

Nachweis der AnnexinV-Bindung auf der Oberfläche von Thrombozyten zur Detektion der Phosphatidylserin-Exposition mittels Durchflusszytometrie. Die AnnexinV-Bindung wurde auf der Oberfläche der Thrombozyten in den Thromben (Patient) (insgesamt 8 Thromben) und in Inkubationen von ruhenden oder mit CRP (5 $\mu\text{g/ml}$) aktivierten Thrombozyten (Thr.) mit frischen oder alten Erythrozyten (Ery.) gemessen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der AnnexinV-Bindung in % in einem Gate, das ausschließlich Thrombozyten beinhaltet (% *gated*), sowie die S.E.M.. $n=5-8$. *** $p \leq 0,001$.

4 Diskussion

4.1 Erythrozyten als essentieller Bestandteil für eine effektive Thrombus-Bildung

In dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Erythrozyten essentiell für eine effektive arterielle Thrombus-Bildung sind. So zeigte sich im hier angewandten T-Tas®-System, das als *in vitro*-Verfahren die Bedingungen *in vivo* in Bezug auf Temperatur und Flussbedingungen nachahmt, dass PRP allein zu einer deutlich verzögerten Thrombus-Bildung im Vergleich zu Vollblut führt (Abb. 3). Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass Erythrozyten eine große Rolle im Rahmen der Thrombus-Bildung spielen. Sie beschleunigen den Prozess der Thrombus-Bildung signifikant und können so einen schnelleren Verschluss der, in diesem Fall, Kapillare gewährleisten ($p=0,0027$) (Abb. 3). Selbstverständlich muss an dieser Stelle bedacht werden, dass sich die Rheologie im PRP von der im Vollblut unterscheidet. Im PRP fehlen die großen Blutbestandteile wie Erythrozyten und Leukozyten. Es bleibt nach diesem Versuch in der T-Tas® also offen, ob es rheologische oder andere Aspekte der Erythrozyten sind, die zu einer verzögerten bis hin zu einer ausbleibenden Thrombus-Bildung des PRPs führen. Schon seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Anzahl der Erythrozyten im Blut einen physikalischen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion hat (Turitto and Weiss, 1980).

Dass Erythrozyten also essentiell für eine effektive Thrombus-Bildung sind, zeigen diese Versuche.

Ausgehend von der Beobachtung, dass Erythrozyten essentiell für eine effektive und schnelle Thrombus-Bildung sind, soll in dieser Arbeit untersucht werden, welche zellulären Bestandteile und molekularen Mechanismen dieser Beobachtung zugrunde liegen.

4.1.1 Die Rolle einer direkten Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten bei der arteriellen Thrombus-Bildung

Dass Erythrozyten die Thrombus-Bildung beeinflussen, konnte gezeigt werden (Abb. 3). Auch Interaktionen zwischen Erythrozyten und Thrombozyten konnten in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden. In bisherigen Arbeiten wurden Mediatoren wie ADP, ATP oder NO als Einflussfaktor der Erythrozyten auf die Hämostase gesehen (Gaarder et al., 1961, Valles et al., 1991, Hellem et al., 1961). So führt die Anwesenheit von Erythrozyten zu einem Anstieg der Thromboxansynthese, ADP- und ATP-Freisetzung durch Thrombozyten (Valles et al., 1991). Die Anwesenheit von Erythrozyten in einer Thrombozyten-Suspension zeigt weiterhin eine verstärkte Integrinaktivierung und P-Selektin-Expression seitens der Thrombozyten (Valles et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit kann weiterhin gezeigt werden, dass die Phosphatidylserin-Exposition auf mit CRP aktivierten Thrombozyten in Anwesenheit von Erythrozyten signifikant erhöht ist im Vergleich zu mit CRP-aktivierten Thrombozyten ohne Erythrozyten ($p=0,02$) (Abb. 10). All diese Ergebnisse lassen auf eine verstärkte Thrombozytenaktivierung und Thrombus-Bildung durch Erythrozyten schließen. Jedoch stellt sich die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten für die verstärkte und schnellere Thrombus-Bildung in Anwesenheit von Erythrozyten verantwortlich ist. Erste Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten liefern Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie (Abb. 5). Hier zeigt eine Inkubation von PRP mit Erythrozyten in der durchflusszytometrischen Analyse eine Subpopulation, die sowohl positiv für den Thrombozytenmarker CD42 als auch für den Erythrozytenmarker CD235a ist. Diese Subpopulation stellt somit ein Aggregat von Erythrozyten und Thrombozyten dar und lässt auf eine Interaktion zwischen diesen Zellen schließen. Es ist an dieser Stelle auf die Besonderheit hinzuweisen, dass in der Durchflusszytometrie Aggregate von Zellen gesehen werden können, da es sich bei der Durchflusszytometrie eigentlich um eine Methode zur Analyse einzelner Zellen handelt. Da es aber in unserem Ansatz keine Zellen gibt, die für beide eingesetzten Marker positiv sind, muss davon ausgegangen werden, dass hier Aggregate von Zellen detektiert werden. In weiteren statischen Versuchen werden Erythrozyten mit dem Überstand aktivierter Thrombozyten inkubiert und die Veränderung

der PS-Exposition auf Erythrozyten beobachtet (Abb. 7). Allein der Überstand führt zu keiner Veränderung der PS-Exposition der Erythrozyten (Abb. 7). Die Zugabe von aktivierten Thrombozyten zu Erythrozyten zeigt jedoch signifikante Veränderungen der PS-Exposition auf Erythrozyten im Vergleich zu Erythrozyten mit ruhenden Thrombozyten ($p=0,0006$) (Abb. 7). Dieses Ergebnis zeigt, dass es kein von den Thrombozyten ausgeschütteter Mediator ist, der eine Erhöhung der PS-Exposition der Erythrozyten herbeiführt, sondern eine direkte Zell-Zell-Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und Erythrozyten notwendig ist. Folglich führt diese Interaktion zwischen Erythrozyten und aktivierten Thrombozyten zur Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Erythrozyten (Abb. 7). Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner arterieller Thromben geben Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten (Abb. 17 & 18). All diese Ergebnisse gaben Anlass zur Suche nach einer Rezeptor-vermittelten Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten.

4.1.2 Die Bedeutung von Phosphatidylserinen in der Thrombus-Bildung

Das anionische Phospholipid Phosphatidylserin (PS) ist ein Bestandteil der zellulären Plasmamembran. Es ist auf der Innenseite der Membran vorzufinden (Schroit and Zwaal, **1991**). Die Existenz der Membranproteine Flippase und Translokase, die ATP-abhängig die Phosphatidylserine von der inneren zur äußeren Schicht der Plasmamembran transportieren, legt die enorme Bedeutung der asymmetrischen Verteilung der Membranproteine in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran für die Zellphysiologie nahe (Schroit and Zwaal, **1991**). So kann vermutet werden, dass die Anwesenheit von Phosphatidylserinen auf der Außen- statt auf der Innenseite der Plasmamembran wichtig für beispielsweise eine Zell-Zell-Interaktion, die Hämostase oder die Zellaktivierung ist. Im Rahmen der Apoptose konnte die Bedeutung der Phosphatidylserine schon nachgewiesen werden. Hier gilt das Auftreten von Phosphatidylserinen auf der Außenseite der Plasmamembran als ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose und als Apoptosesignal für Makrophagen (Martin et al., **1995**, Verhoven et al., **1995**, Kay and Grinstein, **2013**).

Dass Phosphatidylserine also auch eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion spielen, zeigen Beobachtungen von einer Kommunikation zwischen Makrophagen und Erythrozyten. Makrophagen erkennen Erythrozyten über die Veränderung der Verteilung von Phosphatidylserinen in der Lipiddoppelschicht (Schroit et al., **1984**).

Im Rahmen der Hämostase sind Phosphatidylserine ebenfalls von großer Bedeutung. So wurden sie als ein wichtiger Bestandteil des sogenannten Prothrombinasekomplexes identifiziert, der aus dem Faktor Va, Xa, Ca^{2+} und den negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin besteht. Der Prothrombinasekomplex ermöglicht die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin (Zwaal et al., **1998**). Erythrozyten können folglich durch die Bereitstellung von Phosphatidylserinen die Thrombingenerierung vorantreiben und auf diese Weise den Prozess der Thrombus-Bildung antreiben (Peyrou et al., **1999**, Whelihan et al., **2012**). Aus diesem Grund werden Plasmamembranen, in denen Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche exponiert werden, auch als prokoagulante Oberfläche bezeichnet. Der gleiche Mechanismus kann auch bei Thrombozyten beobachtet werden. Auch auf Thrombozyten wird durch die Bereitstellung von Phosphatidylserinen der Prothrombinasekomplex unterstützt und die Thrombingenerierung vorangetrieben (Rosing et al., **1985**, Bevers et al., **1982**). Ein hämatologisches Krankheitsbild, bei dem die Exposition von Phosphatidylserinen auf Erythrozyten in der Pathogenese eine besondere Rolle zu spielen scheint, ist die Sichelzellanämie (Chiu et al., **1981**). Die Sichelzell-Erythrozyten zeigen eine erhöhte Exposition von Phosphatidylserinen auf deren Oberfläche und ein Zusammenhang zwischen dieser Besonderheit der Erythrozyten und den vaso-okklusiven Episoden im Rahmen der Sichelzellanämie wird angenommen. Dies kann als weiterer Hinweis auf die besondere Bedeutung der Phosphatidylserine bei der Thrombus-Bildung gewertet werden (Chiu et al., **1981**). Auch beim nephrotischen Syndrom, das prädisponierend für thrombophile Ereignisse ist, kann eine erhöhte prokoagulante Aktivität der Erythrozyten durch eine verstärkte PS-Exposition nachgewiesen werden (Gao et al., **2012**).

In dieser Arbeit wurde die Expression von Phosphatidylserinen auf Erythrozyten noch genauer untersucht. Die größte Phosphatidylserinexposition kann in Inkubationen von Erythrozyten mit aktivierten Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 7). Bei Inkubationen von Erythrozyten mit ruhenden Thrombozyten zeigen sich keine Veränderung der Phosphatidylserinexposition im Vergleich zu Erythrozyten allein (Abb. 7). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Exposition von Phosphatidylserinen im Prozess der Thrombus-Bildung eben dann von Bedeutung ist, wenn es auch zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt.

Auch für die Thrombozyten kann gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Aktivierung mit ADP oder CRP zu einer erhöhten Phosphatidylserinexposition kommt (Abb. 10 & 25), sodass ebenfalls eine große Bedeutung der Phosphatidylserine für die Thrombus-Bildung bewiesen wird. Interessanterweise kann eine höhere Phosphatidylserin-Exposition auf mit CRP-aktivierten Thrombozyten, die mit Erythrozyten inkubiert wurden, nachgewiesen werden, als auf CRP-aktivierten Thrombozyten, die keinen Kontakt zu Erythrozyten hatten (Abb. 10).

Auch in den untersuchten humanen arteriellen Thromben zeigen sich erhöhte Werte für die Phosphatidylserinexposition auf Erythrozyten (Patient, Abb. 24). Einerseits ist es möglich diese erhöhte Exposition durch den Prozess der Thrombus-Bildung zu erklären, andererseits muss bedacht werden, dass die Phosphatidylserinexposition auch als Apoptosesignal gilt und vom menschlichen Körper ein Abbau des gebildeten Thrombus erwünscht ist. Dass die Phosphatidylserine hier als Apoptosesignal auch eine Rolle spielen, zeigt der Vergleich der Phosphatidylserin-Exposition von alten Erythrozyten mit den Erythrozyten der Thromben, die beide hohe Werte für die AnnexinV-Bindung auf Erythrozyten als Zeichen der Phosphatidylserin-Exposition zeigen (Abb. 24). Auch die Thrombozyten der humanen arteriellen Thromben zeigen eine erhöhte Phosphatidylserin-Exposition (Patient, Abb. 25). Wie für die Erythrozyten, gilt auch für die Thrombozyten in den Thromben, dass die Phosphatidylserin-Exposition ein Resultat der Thrombus-Bildung sowie eine Apoptosesignal sein kann. Um den tatsächlichen Grund für die stark erhöhte Phosphatidylserinexposition auf den Erythrozyten und Thrombozyten der Thromben erklären zu können, müsste zeitlich genau gezeigt werden, wann es zur Phosphatidylserinexposition kommt. Da es sich jedoch um arterielle Thromben aus dem menschlichen Körper handelt, ist eine genauere zeitliche Analyse versuchstechnisch nicht möglich. Bei allen Analysen der humanen Thromben muss also bedacht werden, dass die Patienten schon Stunden bis hin zu Tagen unter der arteriellen Thrombose gelitten haben und die PS-Exposition ebenso durch den apoptotischen Charakter der Zellen bedingt sein kann. Es ist anzunehmen, dass die hohe Phosphatidylserinexposition hier das Resultat aus beiden Prozessen, also der Thrombus-Bildung einerseits und der Apoptose andererseits, ist.

4.1.3 Fas-Rezeptor und Fas-Ligand als Interaktionspartner der Erythrozyten und Thrombozyten bei der arteriellen Thrombus-Bildung

In dieser Arbeit konnten bereits zahlreiche Hinweise auf eine direkte und damit rezeptorvermittelte Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 5,7,18). Als Beispiel für eine rezeptorvermittelte Interaktionen konnten in der Vergangenheit schon verschiedene Rezeptoren und Liganden als Interaktionspartner zwischen Erythrozyten und Thrombozyten identifiziert werden. Der ICAM-4 Ligand auf Erythrozyten wurde als neuer Interaktionspartner für das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) identifiziert und eine relevante physiologische Rolle wird angenommen (Hernand et al., **2004**, Hernand et al., **2003**). Experimente, in denen diese Interaktion inhibiert worden ist, woraufhin eine reduzierte Thrombingenerierung und ein verminderter Einbau von Erythrozyten in einen Thrombus nachgewiesen werden konnten, beweisen diese Annahme (Du et al., **2014**, Du et al., **2012**). Außerdem konnte eine Adhäsion von Erythrozyten an immobilisierte Thrombozyten über die erythrozytären Phosphatidylserine und die thrombozytären Phosphatidylserin-Rezeptoren CD36 und CXCL16 nachgewiesen werden. Eine Bedeutung dieses Zell-Zell-Kontakts für thrombo-embolische Komplikationen im

Rahmen verschiedener Erkrankungen wurde angenommen (Walker et al., 2014). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte hingegen nicht gezeigt werden, dass eine Zell-Zell-Interaktion über diese Rezeptoren im Prozess der Thrombus-Bildung stattfindet, beziehungsweise die Thrombus-Bildung maßgeblich beeinflusst (Klatt, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wird hingegen eine neue Zell-Zell-Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten identifiziert. Auf Erythrozyten kann der Fas-Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 4) (Mandal et al., 2005). Von Thrombozyten ist bekannt, dass sie nach Aktivierung den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen (Abb.23) (Ahmad et al., 2001). Unsere Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass der erythrozytäre Fas-Rezeptor und der thrombozytäre Fas-Ligand miteinander interagieren und diese Interaktion verantwortlich für die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Oberfläche von Erythrozyten ist (Abb. 12,13,14). Dieser Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-vermittelte Erythrozyten-Thrombozyten-Kontakt in der Thrombus-Bildung gilt als vollkommen neues Element bei der Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Der Fas-Ligand oder CD178 gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) (Suda and Nagata, 1994). Bisher ist aus dem Bereich der Apoptose eine Interaktion zwischen dem Fas-Liganden und dem Fas-Rezeptor bekannt. Zytotoxische T-Zellen, die den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen, binden mit diesem an den Fas-Rezeptor einer Zielzelle und können auf diese Weise eine Apoptose induzieren (Suda and Nagata, 1994). Auch bei der Regulation des Immunsystems und der Tumorentstehung spielt die Fas-Rezeptor-Fas-Ligand-Interaktion eine Rolle (Strasser et al., 2009, Peter et al., 2015). Der Fas-Ligand konnte auch auf Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 6) (Ahmad et al., 2001). *In vitro*-Versuche zeigen, dass auch der Fas-Ligand der Thrombozyten eine Rolle im Rahmen der Apoptose spielt. Dabei kann der Fas-Ligand der Thrombozyten eine Apoptose in Fas-positiven Tumorzellen induzieren (Ahmad et al., 2001). Eine Rolle des thrombozytären Fas-Liganden im Rahmen der Apoptose ist also bereits bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen zudem eine bedeutende Rolle des thrombozytären Fas-Liganden für die Thrombus-Bildung. Bei der Beobachtung des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten auf einer Fas-Rezeptor-beschichteten Oberfläche zeigen aktivierte Thrombozyten eine starke Adhäsion (Abb. 12). Diese Ergebnisse zeigen, dass Thrombozyten bei Aktivierung mit Hilfe des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor binden und diese Bindung durch einen Fas-Ligand-Inhibitor (DcR3) verringert werden kann (Abb. 12). DcR3 ist ein Rezeptor, der zur TNF Rezeptor Familie zählt und daher auch als TNFRSF6B bezeichnet wird (Pitti et al., 1998). Vom *Decoy* Rezeptor 3 ist bekannt, dass er mit gleicher Affinität wie der Fas-Rezeptor um die Bindung am Fas-Liganden konkurriert (Pitti et al., 1998). Auf diese Weise kann DcR3 die Fas-Ligand-induzierte Apoptose inhibieren (Pitti et al., 1998).

Auch weitere Inhibitionsversuche mit dem *Decoy receptor* 3 (DcR3), der als Fas-Ligand-Inhibitor agiert, zeigen eine verminderte Zell-Zell-Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten über den Fas-Rezeptor beziehungsweise -Liganden, da eine reduzierte Phosphatidylserin-Exposition auf den Erythrozyten (Abb. 8) sowie eine reduzierte Thrombus-Bildung unter Flussbedingungen nach Inhibition des Fas-Liganden nachweisbar ist (Abb. 13 A-B). In weiteren Versuchen wurde eine Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten über den Fas-Rezeptor und Fas-Liganden mittels eines Fas-Rezeptor/CD95-Antikörpers verhindert. Hier kann eine essentielle Rolle des Fas-Rezeptors für die Thrombus-Bildung nachgewiesen werden, da eine Inhibition des Fas-Rezeptors durch eine Antikörper-Behandlung die Phosphatidylserin-Exposition auf Erythrozyten reduziert (Abb. 9) sowie die Thrombus-Bildung unter Fluss nahezu verhindert (Abb. 14 A-B).

Folglich zeigen diese Ergebnisse, dass der Fas-Rezeptor als Interaktionspartner für den Fas-Liganden der Thrombozyten dient und die PS-Exposition auf Erythrozyten sowie die Thrombus-Bildung über diesen Weg beeinflusst wird.

Beim Vergleich dieser beiden Inhibitionsversuche unter Fluss fällt auf, dass durch die Verwendung des Fas-Rezeptor-Antikörpers eine stärkere Reduktion der Phosphatidylserin-Exposition auf Erythrozyten und der Thrombus-Bildung erreicht wird (Abb. 14 A-B) als bei den Versuchen, in denen der Fas-Ligand mittels DcR3 inhibiert wird (Abb. 13 A-B). Auch in

den statischen Versuchen mit dem DcR3 (Abb. 8) und dem Fas-Rezeptor-Antikörper (Abb. 9) wird eine stärkere Reduktion der PS-Exposition der Erythrozyten durch den Fas-Rezeptor-Antikörper erreicht. Mit dem Fas-Rezeptor-Antikörper werden sogar vergleichbare Werte für die PS-Exposition auf Erythrozyten wie in der Kontrolle erreicht (Abb. 9). Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Fas-Ligand der Thrombozyten nicht der einzige Interaktionspartner der Thrombozyten mit dem Fas-Rezeptor ist. Möglicherweise gibt es einen weiteren, bisher unbekanntes Liganden auf der Thrombozyten-Membran, der dazu in der Lage ist, den Fas-Rezeptor der Erythrozyten zu aktivieren. Andererseits muss bedacht werden, dass die Versuchsaufbauten dieser beiden Versuche nicht exakt gleich sind und auch nicht gleich sein können. Wie bereits erwähnt, wird der Fas-Ligand erst bei Aktivierung der Thrombozyten auf deren Oberfläche verstärkt präsentiert (Ahmad et al., **2001**). Und die Anwesenheit von Erythrozyten führt zu einer verstärkten Fas-Ligand-Exposition auf Thrombozyten (Abb. 6). Im Versuch (Abb. 13) bedeutet dies, dass die ruhenden Thrombozyten nicht mit dem DcR3 vor-inkubiert werden können, da eine Bindung an alle Fas-Liganden hier noch nicht möglich ist. Die Bindung vom DcR3 kann erst unter Fluss bei Aktivierung der Thrombozyten durch das Kollagen und in Anwesenheit von Erythrozyten in der Flusskammer erfolgen. Die Zeit für die Bindung von DcR3 an den Fas-Liganden ist also limitiert. Ob eine effiziente Bindung vom DcR3 an den Fas-Liganden in diesem kurzen Zeitfenster des Experiments von drei Minuten möglich ist, kann hier nicht überprüft werden. Eine Abänderung des Experiments hinsichtlich einer früheren Thrombozyten-Aktivierung lassen jedoch die Versuchsbedingungen nicht zu. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Effekt des DcR3 noch größer wäre, wenn eine längere Zeit zur Bindung zur Verfügung stehen würde. Der Fas-Rezeptor der Erythrozyten hingegen ist dauerhaft auf den Erythrozyten vorhanden (Abb. 4) (Mandal et al., **2005**). Hier ist eine Vorinkubation der Erythrozyten mit dem Fas-Rezeptor-Antikörper möglich und eine suffiziente Bindung an den Fas-Rezeptor kann gewährleistet werden, ohne dass nur ein begrenzter Zeitraum für die Bindung zur Verfügung steht. Eventuell ist diese zeitliche Limitation der Grund, warum durch den DcR3 eine geringere Thrombus-Reduktion erreicht werden kann als durch den Fas-Rezeptor-Antikörper.

Beim Vergleich der Inhibitionsversuche mit dem DcR3 und dem CD95-Antikörper in der Flusskammer ist außerdem auffällig, dass sich die prozentualen Anteile der Thrombus-Fläche in den Kontrollen zum mit DcR3 oder CD95-Antikörper behandeltem Vollblut unterscheiden. Die Kontrolle zum DcR3-behandeltem Vollblut zeigt im Mittel eine Thrombus-Fläche von nur 34,099 % (Abb. 13 B), während die Kontrolle zum CD95-Antikörper-behandeltem Vollblut mittlere Werte von 38,6 % aufweist (Abb. 14 B). Diese Differenz kommt durch die unterschiedliche Verdünnung der Kontrollen zustande. Beim Versuch mit DcR3 muss die Kontrolle stärker mit PBS verdünnt werden, um den gleichen Verdünnungsfaktor wie für das mit DcR3 behandelte Vollblut zu erhalten. Dies erklärt die geringere mittlere Thrombus-Fläche in der Kontrolle der Versuche mit DcR3.

4.1.4 Einfluss der Erythrozyten auf die Thrombozyten

Es ist bekannt, dass Erythrozyten durch die Exposition von Phosphatidylserinen eine prothrombotische Oberfläche schaffen, die die Bildung des Prothrombinasekomplexes unterstützt und in einer erhöhten Thrombingenerierung resultiert (Peyrou et al., **1999**). Thrombin gilt als effizienter Thrombozytenaktivator (Brass et al., **2013**). Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung von Thrombozyten zu einer Fas-Ligand-Expression führt (Ahmad et al., **2001**). Auf humanen Erythrozyten konnte bereits der Fas-Rezeptor als möglicher Interaktionspartner des Fas-Liganden nachgewiesen werden (Abb. 4) (Mandal et al., **2005**). Um zu untersuchen, ob der Fas-Ligand als Interaktionspartner für die Erythrozyten infrage kommt, erfolgt zunächst ein Nachweis des Fas-Liganden auf Thrombozyten (Abb. 6). Auch auf ruhenden Thrombozyten gelingt hier der Fas-Ligand-Nachweis. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich die analysierten Thrombozyten im Verlauf des Versuches nicht mehr alle im Ruhezustand befinden. Möglicherweise präsentieren Thrombozyten aber auch schon unter ruhenden Bedingungen den Fas-

Liganden auf ihrer Oberfläche. Eine Aktivierung der Thrombozyten mit ADP oder CRP allein zieht keine signifikant erhöhte Fas-Ligand-Expression im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten nach sich (Abb. 6). Eine signifikant erhöhte Fas-Ligand-Expression zeigt sich hingegen bei einer Ko-Inkubation von mit CRP oder ADP aktivierten Thrombozyten oder Thrombozyten alleine mit Erythrozyten (Abb. 6). Die Kombination von Erythrozyten und Thrombozyten ist folglich ein Stimulus für die Hochregulation der Fas-Ligand-Expression. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die Erythrozyten die Thrombingenerierung über ihre Phosphatidylserin-Expression unterstützen und es folglich zu einer vermehrten Thrombozytenaktivierung und damit Fas-Ligand-Expression kommt. Durch die Aktivierung der Thrombozyten mit CRP oder ADP kommt es zur Sekretion von Gerinnungsfaktoren aus den α -Granula und Calcium aus den elektronendichten Granula (Rendu and Brohard-Bohn, 2001). Auf diese Weise werden die für den Prothrombinasekomplex benötigten Gerinnungsfaktoren und Calcium bereitgestellt. Gemeinsam mit den Phosphatidylserinen der Erythrozyten wird über den Prothrombinasekomplex Thrombin generiert. Thrombin führt zur Thrombozytenaktivierung und damit Fas-Ligand-Expression. Dies ist ein denkbarer Erklärungsansatz für die signifikant erhöhten Fas-Ligand-Level in den Ko-Inkubationen von aktivierten Thrombozyten und Erythrozyten.

Die mit Abstand höchste Fas-Ligand-Expression auf Thrombozyten kann unter pathologischen Bedingungen in den humanen arteriellen Thromben beobachtet werden. Hier wird eine Fas-Ligand-Expression von $44,43 (\pm 6,13)$ beobachtet (Abb. 23). Neben der Bedeutung des Fas-Liganden für die Thrombus-Bildung sollte an dieser Stelle die Bedeutung des Fas-Liganden im Rahmen der Apoptose bedacht werden. Es ist bekannt, dass der Fas-Ligand der Thrombozyten in Fas-positiven Tumorzellen eine Apoptose induzieren kann (Ahmad et al., 2001). Möglicherweise zeigt sich in den Thromben auch aus diesem Grund eine solch starke Fas-Ligand-Expression.

4.1.5 Die Interaktion von Erythrozyten und Thrombozyten spielt auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle

Auch die Analyse humaner arterieller Thromben, die aus Thrombektomien verschiedener Patienten stammen, zeigt, dass eine Interaktion zwischen Erythrozyten und Thrombozyten über den Fas-Liganden und den Fas-Rezeptor auch unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt. In mikroskopischen Aufnahmen dieser Thromben konnte ein hoher Anteil von Erythrozyten nachgewiesen werden (Abb. 15), der durch die durchflusszytometrische Analyse ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Abb. 21). Teilweise sind sie Erythrozyten in Form von Inseln in den Thromben angeordnet (Abb. 15). Eine bedeutende Rolle der Erythrozyten im Prozess der Thrombus-Bildung kann daher angenommen werden. Jedoch sollte bedacht werden, dass bei keinem der Patienten, von denen die Thromben stammen, genau bekannt ist, über welchen Zeitraum sich die Thromben entwickelt haben. Womöglich handelt es sich bei der Entstehung dieser Thromben um einen über Tage andauernden Prozess, in dem der Thrombus langsam und Schicht für Schicht entstanden ist, wobei immer wieder Erythrozyten eingeschlossen worden sind, ohne eine größere Rolle für die eigentliche Entstehung des Thrombus zu spielen. Weiterhin ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Thromben aus großen arteriellen Gefäßen wie der Arteria brachialis oder den Arteriae femorales stammen und dementsprechend groß sind, wenn sie zum Verschluss führen (s. 6.2). Zur mikroskopischen Untersuchung sowie zur durchflusszytometrischen Analyse können lediglich repräsentative Anteile des Thrombus untersucht werden. Dass manche Thromben Erythrozyten-reicher erscheinen kann auch an der Wahl der repräsentativen Stelle liegen. Der eigentliche Beginn der Thrombus-Bildung kann morphologisch nicht erkannt werden, obwohl dies womöglich die interessanteste Stelle für unsere Untersuchungen wäre. Weiter entfernte Anteile vom eigentlichen Beginn des Thrombus können möglicherweise nur aus sich vor dem Verschluss stauenden Erythrozyten bestehen und somit bei der Analyse die Ergebnisse verzerren.

Dass Erythrozyten eine relevante Rolle für die Thrombus-Bildung unter pathologischen Bedingungen spielen, zeigen auch die Untersuchungen von verschiedenen Krankheitsbildern, die mit erhöhten Zahlen von Erythrozyten oder veränderten Erythrozyten assoziiert sind. An dieser Stelle ist die Polycythaemia vera (PV) zu nennen. Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild aus der Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen, bei dem es zu einer Vermehrung aller drei Blutzellreihen, insbesondere der Erythrozyten, kommt (Herold, **2014**). Die PV ist mit einem erhöhten Thrombose-Risiko assoziiert und ursächlich dafür ist vor allem der erhöhte Hämatokrit und nicht etwa die erhöhte Anzahl von Thrombozyten (Boneu, **1994**). Auch bei der β -Thalassämie, bei der eine Störung der Hämoglobinbildung der Erythrozyten vorliegt, kann eine erhöhte Erythrozytenaggregation beobachtet werden (Chen et al., **1996**). Damit konnten an dieser Stelle zwei wichtige Krankheitsbilder genannt werden, bei denen thrombotischen Komplikationen im Zusammenhang mit erhöhten oder veränderten Erythrozyten beobachtet wurden. Verschiedene Studien zeigen auch, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Hämatokrit und Thrombosen sowie Gefäßverschlüssen gibt. Eine Studie mit Kaninchen zeigte reduzierte Thromboseraten sowie verlängerte Blutungszeiten in einer stenosierten Arteria carotis bei einem vermindertem Hämatokrit (Ouaknine-Orlando et al., **1999**). Auch bei Patienten, bei denen ein Verschluss der A. carotis und ein Schlaganfall nachgewiesen wurde, kann eine Korrelation zwischen der Größe des Infarktes und dem Hämatokrit festgestellt werden (Harrison et al., **1981**).

4.1.5.1 Morphologische Untersuchung humaner arterieller Thromben

Zur morphologischen Untersuchung der Thromben werden zwei Mikroskopie-Verfahren verwendet; die Lichtmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie. Lichtmikroskopisch kann ein guter Überblick über die Zusammensetzung des Thrombus gewonnen und die Lage der Zellen zueinander beurteilt werden (Abb. 15). Die Transmissionselektronenmikroskopie bietet den Vorteil, dass sie eine stärkere Vergrößerung zulässt und einzelne Zellen somit genauer differenziert werden können und deren Inhalt beurteilt werden kann. So sind hier beispielsweise einzelne Granula in den Thrombozyten nachweisbar (Abb. 17 A'). In den lichtmikroskopischen Aufnahmen der humanen und murinen Thromben sind zahlreiche Erythrozyten erkennbar, die sich teilweise in Form von Inseln in den Thromben anordnen (Abb. 15&16). Dabei bleibt offen, ob es sich dabei um einen zufälligen Einschluss der Erythrozyten in den Thromben im Zuge der Thrombus-Bildung handelt oder, ob die Erythrozyten hier an der Thrombus-Bildung beteiligt waren. Dies kann lichtmikroskopisch jedoch nicht beurteilt sondern ausschließlich beschrieben werden. Um diese Frage zu klären wird zusätzlich die Durchflusszytometrie genutzt und die Oberflächenmarker der Erythrozyten in den Thromben analysiert (s. 4.1.5.2.). Direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen Erythrozyten und Thrombozyten, die in den transmissionselektronischen Bildern nachweisbar sind, zeigen zusätzlich die Bedeutung der Erythrozyten für die Thrombus-Bildung auf (Abb. 17,18). In Abbildung 18 werden sogar potentielle Interaktionen über Rezeptoren nachgewiesen.

Zusätzlich zu dem zahlreichen Vorkommen von Erythrozyten in den humanen und murinen Thromben (Abb. 15&16) in der Lichtmikroskopie, können in manchen Thromben kernhaltige Zellen, die Leukozyten darstellen, nachgewiesen werden (Abb. 15A). Leukozyten sind als zelluläre Elemente des Immunsystems bekannt. Es ist bekannt, dass durch sie eine Ausschüttung von proinflammatorischen und prokoagulanten Faktoren erfolgt und auf diese Weise eine Beeinflussung der Thrombus-Bildung möglich ist (Swystun and Liaw, **2016**). Auch eine Interaktion von Leukozyten mit Thrombozyten und Endothelzellen während der Thrombus-Bildung wird beschrieben (Swystun and Liaw, **2016**).

Zu den Leukozyten zählen auch die Monozyten (Herold, **2014**). Verlassen Monozyten das zirkulierende Blut werden sie als Makrophagen bezeichnet (Herold, **2014**). In den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern lassen sich vereinzelt Makrophagen nachweisen (Abb. 19). Makrophagen werden zu den mobilen Bindegewebszellen gezählt und zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus, phagozytieren zu können; das heißt, größere Partikel oder Zellen aufnehmen zu können. Während des Phagozytose-Prozesses werden

Zellfortsätze oder lamellenartige Membranen ausgebildet, die den Partikel oder die Zelle umfließen (Welsch et al., 2014). Es entsteht eine intrazelluläre Vakuole (Phagosom), die mit Endo- und Lysosomen zu einem Phagolysosom verschmilzt, in dem die aufgenommenen Partikel abgebaut werden (Welsch et al., 2014). Auf diese Weise tragen die Makrophagen zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts in den Organen des Körpers bei, da sie auf Veränderungen im Gewebe wie Apoptose-Prozesse reagieren können (Welsch et al., 2014). Dass Makrophagen in einzelnen Thromben nachweisbar sind, spricht dafür, dass sich diese schon im Prozess der Apoptose befinden. Zusätzlich können einzelne Schaumzellen in den Thromben dargestellt werden (Abb. 20). Bei Schaumzellen handelt es sich um mit Lipiden beladene Makrophagen, die in atherosklerotischen Regionen nachgewiesen werden können (Yu et al., 2013). Die Lipide befinden sich in den großen Vesikeln von geringer Elektronendichte (Abb. 20). Die Atherosklerose kann als Ursache für die Entstehung eines arteriellen Thrombus gesehen werden (Jackson, 2011). Dies erklärt, warum diese Zellen in den Thromben nachgewiesen werden können. Außerdem ist beschrieben, dass Thrombozyten unter atherosklerotischen Bedingungen Monozyten rekrutieren und eine Differenzierung zu Schaumzellen induzieren können (Daub et al., 2006), womit zusätzlich das Vorhandensein einer Schaumzelle im Thrombus erklärt werden kann.

Neben diesen vereinzelt vorkommenden Makrophagen und Schaumzellen sind in der Transmissionselektronenmikroskopie vor allem Erythrozyten und Thrombozyten zu erkennen, die teilweise in engem Kontakt zu einander stehen (Abb. 17&18). Dies deutet auf eine Interaktion und einen dementsprechenden Informationsaustausch hin. In den teilweise schon älteren humanen arteriellen Thromben fällt zusätzlich ein hoher Anteil von Zellfragmenten zerstörter Zellen auf, sodass eine Differenzierung dieser Zellen nicht mehr möglich ist (Abb. 17A). Sicherlich ist nachvollziehbar, dass nicht mehr alle Zellen in einem guten Zustand sind, denn die Thromben sind teilweise schon über mehrere Stunden oder Tage in den Patienten entstanden. Außerdem wurden die Thromben im Rahmen einer Thrombektomie entfernt, in der sie zusätzlichen Schaden nehmen können. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch noch ein großer Anteil intakter Zellen wie Erythrozyten und Thrombozyten in den Thromben vorhanden ist (Abb. 21) (s. 4.1.5.2.).

4.1.5.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen humaner arterieller Thromben

In dieser Arbeit werden verschiedene Methoden zur Analyse der humanen arteriellen Thromben verwendet. Zur Analyse der Oberflächenmarker der einzelnen Zellen in den Thromben wird die Durchflusszytometrie verwendet. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich auch eine Aussage bezüglich des Mechanismus der Thrombus-Bildung machen. Zunächst konnte in den humanen arteriellen Thromben mit durchschnittlich 58,11% ($\pm 4,52$) Erythrozyten ein großer Anteil dieser Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21). Die zweitgrößte Population stellen mit durchschnittlich 40,97% ($\pm 4,48$) die Thrombozyten dar (Abb. 21). Sowohl auf den Erythrozyten als auch auf den Thrombozyten der humanen arteriellen Thromben kann eine hohe Phosphatidylserin-Exposition mit Hilfe der AnnexinV-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 24&25). Auf Erythrozyten ist diese mit 23,36% ($\pm 2,91$) signifikant erhöht im Vergleich zu mit ruhenden und aktivierten Thrombozyten inkubierten Erythrozyten aus den statischen Versuchen ($p=0,002$, $p=0,03$) (Abb. 24). Diese hohe Phosphatidylserin-Exposition in den Thromben kann einerseits dadurch erklärt werden, dass in den statischen Versuchen eben nicht alle physiologischen Bedingungen nachgeahmt werden können und es daher hier nicht zu der maximalen Phosphatidylserin-Exposition durch die Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-Interaktion kommt. Andererseits muss das höhere Alter der Thromben und der darin enthaltenen Zellen im Vergleich zu den verwendeten frischen Zellen in den statischen Versuchen und die Bedeutung der Phosphatidylserin-Exposition im Rahmen von apoptotischen Prozessen bedacht werden (Tanaka and Schroit, 1983, Martin et al., 1995, Zwaal and Schroit, 1997). Die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Außenseite der Erythrozyten führt zu einer Erkennung dieser Zellen durch Makrophagen (Tanaka and Schroit, 1983) und ist damit als Beginn des

apoptotischen Prozesses anzusehen (Martin et al., 1995). Dennoch ist die Phosphatidylserin-Exposition der Erythrozyten in den Thromben noch signifikant höher als die auf alten Erythrozyten ($p=0,03$) (Abb. 24). Es handelt sich bei der hohen Phosphatidylserin-Exposition auf Erythrozyten und Thrombozyten in humanen arteriellen Thromben um ein Resultat aus beiden Prozessen, der Phosphatidylserin-Exposition im Rahmen der arteriellen Thrombus-Bildung und dem Beginn des apoptotischen Prozesses (s. 4.1.2). Eine Unterscheidung dieser Prozesse ist in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der Interpretation der Fas-Ligand-Exposition der Thrombozyten in den humanen arteriellen Thromben. Die Fas-Ligand-Exposition auf den Thrombozyten der Patiententhromben ist signifikant höher im Vergleich zu den nachweisbaren Fas-Liganden auf den mit Erythrozyten inkubierten aktivierten Thrombozyten der statischen Versuche ($p=0,015$) (Abb. 23). Ein denkbarer Erklärungsansatz ist auch hier, dass unter physiologischen Bedingungen wie in den humanen Thromben eine höhere Aktivierung der Thrombozyten stattfindet als in den statischen Versuchen und damit höhere Fas-Ligand-Level auf den Thrombozyten humaner Thromben nachweisbar sind. Möglicherweise spielt die Fas-Ligand-Exposition der Thrombozyten in den humanen arteriellen Thromben aber auch eine Rolle im Rahmen eines apoptotischen Prozesses (Ahmad et al., 2001). Auch an dieser Stelle wäre interessant, ob diese hohe Fas-Ligand-Exposition schon zu Beginn der Thrombus-Bildung vorliegt oder sich erst nach Ende der Thrombus-Bildung entwickelt. Dies kann nach Ende der Thrombus-Bildung in unserem Versuchsaufbau nicht geklärt werden. Bei der Betrachtung der P-Selektin-Exposition der Thrombozyten in den Patiententhromben fällt eine signifikant niedrigere P-Selektin-Exposition im Vergleich zu mit Erythrozyten inkubierten aktivierten Thrombozyten auf ($p=0,008$) (Abb. 22). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Thrombozyten-Aktivierung bei den Thrombozyten der Patienten-Thromben zum Zeitpunkt der Untersuchung geringer ist als bei einer Aktivierung dieser durch CRP in den statischen Versuchen.

4.2 Grenzen der statischen Versuche

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Erythrozyten die Hämostase durch ihre PS-Exposition unterstützen. Über die PS-Exposition schaffen Erythrozyten eine prokoagulante Oberfläche, die einen Teil des Prothrombinase-Komplexes darstellt, welcher aus Faktor Va, Xa, Calcium und den negativ geladenen Phospholipiden wie den Phosphatidylserinen besteht. Durch den Prothrombinasekomplex wird die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin gewährleistet. Die Erythrozyten tragen auf diese Weise einen Teil zur Thrombingenerierung bei (Peyrou et al., 1999, Klatt et al., 2018). Ein Nachweis dieser erhöhten Thrombingenerierung durch PS-exponierende Erythrozyten sollte auch in dieser Arbeit erfolgen. Eine erhöhte PS-Exposition von Erythrozyten, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden, konnte in den statischen Versuchen nachgewiesen werden (Abb. 7). In den statischen Versuchen werden zum Nachweis einer dadurch induzierten Thrombingenerierung die TAT- und PTF 1&2-Level in den Überständen verschiedener Ansätze ruhender oder aktivierter Thrombozyten mit Erythrozyten bestimmt, wodurch ein indirekter Nachweis des Thrombins erfolgt (Abb. 11). Bei TAT handelt es sich um einen Thrombin/Antithrombin III-Komplex, der im Ablauf der Hämostase entsteht. Bei PTF 1 & 2 handelt es sich um die Prothrombinfragmente F 1 & 2, die bei der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin anfallen. Beim Nachweis vom TAT sind in allen Proben keine signifikanten Unterschiede nachweisbar, wobei alle Werte im Referenzbereich des Tests liegen (Abb. 11A). Auch beim Nachweis der PTF 1 & 2 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten, wobei die Werte sogar teilweise außerhalb des Referenzbereiches des Tests liegen (Abb. 11B). Mögliche Gründe für die fehlenden Signifikanzen könnten eine zu große Verdünnung der Ansätze durch die Versuchsbedingungen und ein damit verbundene Mangel an Plasmafaktoren sein. Grund für diese Annahme gibt der Messwert im unverdünnten PPP der Kontrolle, der sowohl für die TAT-Bestimmung sowie die PTF 1&2- Bestimmung höher als in allen anderen Ansätzen ausfällt. Die Verdünnung des Thrombozyten-enthaltenden Plättchen-reichen Plasmas mit

Tyrode-Lösung ist jedoch nötig, um die gleiche Verdünnung aller Ansätze, also auch derer, die mit Tyrode-Lösung verdünnte Erythrozyten enthalten, zu erhalten und damit eine Vergleichbarkeit der Daten zu schaffen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte auch sein, dass die Tyrode-Lösung in irgendeiner Weise nicht mit den Enzygnost® TAT und PTF 1&2 kompatibel ist und aus diesem Grund kein Nachweis erfolgen kann. Eine Verdünnung in Tyrode-Lösung (und keinem anderen Medium) ist jedoch nötig, um eine frühzeitige Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Weiterhin wäre denkbar, dass die Anzahl der in den Proben enthaltenen Erythrozyten nicht ausreichend ist, um eine nachweisliche Thrombingenerierung zu erreichen. Eine andere Nachweismethode sollte in Zukunft angedacht werden. Da alle Voraussetzungen für eine Thrombingenerierung aber eigentlich gegeben sind, da sowohl die PS nachweisbar und Plasmafaktoren wie Faktor V und X in den Proben enthalten sind, ist eine andere Methode sicherlich vielversprechend.

4.3 Grenzen der Flusskammerversuche

In verschiedenen Versuchen dieser Arbeit ist mit einer Flusskammer gearbeitet worden (Abb. 3,13,14). Es sind Flusskammern von verschiedenen Anbietern verfügbar, wobei hier eine Flusskammer von *Maastricht Instruments* verwendet worden ist (Abb. 13,14) sowie das T-Tas von Zacros (Abb. 3). Die Verwendung einer Flusskammer ist vor allem dann sinnvoll, wenn die natürlichen Bedingungen der Hämostase und Thrombus-Bildung nachgestellt werden sollen und währenddessen der Prozess der Thrombus-Bildung genau beobachtet und ausgewertet werden soll. Dabei bietet eine Flusskammer gegenüber statischen Versuchen den Vorteil, dass eine Quantifizierung der Thrombus-Fläche unter Fluss möglich ist. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass aufgrund der verschiedenen Bauarten von Flusskammern verschiedener Anbieter die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht unbedingt gewährleistet werden kann (Roest et al., 2011).

Die Auswertung der Thrombus-Bildung erfolgt in dieser Arbeit über die Messung der bedeckten Fläche der Thromben nach Ablauf des Flusskammerexperiments (Abb. 13 B, 14 B). Zudem wird die Fluoreszenzaktivität der Thromben gemessen (Abb. 13 C). Das dazu verwendete Blut wird zuvor mit Quinacrine Dihydrochlorid (Mepacrine) versetzt. Mepacrine ist ein Fluoreszenzmarker, der von Thrombozyten aufgenommen und in den dichten Granula eingelagert wird (Wall et al., 1995). Mit Hilfe der Fluoreszenzaktivität kann zusätzlich eine Aussage über die Höhe der Thromben getroffen werden. Umso höher ein Thrombus ist, desto höher ist auch die gemessene Fluoreszenzaktivität. So werden weitere Informationen über die Dreidimensionalität der Thromben erhalten. Der Einsatz eines Fluoreszenzmarkers ist vor allem dann sinnvoll, wenn die Ergebnisse der Analyse der Thrombus-Fläche verifiziert werden sollen. Um den Einfluss von DcR3 auf die Thrombus-Fläche deutlicher darzustellen ist in Abbildung 13 A eine Darstellung mit dem Fluoreszenzmarker Mepacrine erfolgt. In den Flusskammerversuchen, in denen der CD95-Antikörper verwendet worden ist, wurde auf die Verwendung von Mepacrine verzichtet, da sich der Einfluss des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Fläche schon anhand der zweidimensionalen Messung bereits deutlich zeigt (Abb. 14 A-B).

Im Vergleich zu statischen Versuchen können mit Flusskammerexperimenten die physiologischen Bedingungen im lebenden Organismus nachgeahmt werden. Selbstverständlich sind noch immer zahlreiche natürliche Bedingungen, wie sie in einem lebendigen Organismus vorzufinden sind, in der Flusskammer nicht erfüllt. An erste Stelle ist hier die Temperatur, unter der die Versuche stattfinden, zu nennen. In der einfachen Flusskammer von *Maastricht Instruments* erfolgen die Versuche bei Raumtemperatur. Um die Versuche bei Körpertemperatur stattfinden zu lassen wäre beispielsweise eine Inkubationskammer für das Mikroskop notwendig. Unklar ist dabei, wie die verwendeten Antikörper auf die erhöhte Temperatur reagieren. Das T-Tas bietet hingegen den Vorteil, dass die Experimente bei 37 °C stattfinden und somit die Bedingungen der Körpertemperatur entsprechen.

Als weitere Abweichung von den natürlichen Bedingungen ist das verwendete Blut zu erwähnen. In den Flusskammerexperimenten wird venöses Blut zur Analyse der arteriellen Thrombus-Bildung genutzt. Insbesondere die Sauerstoffpartialdrücke von arteriellem Blut

unterscheiden sich stark von venösem Blut. Der Sauerstoffpartialdruck in arteriellem Blut liegt bei 70-100 mmHg, während dieser in venösem Blut wesentlich geringer ist (Herold, 2014). Eine arterielle Blutabnahme bei den freiwilligen Spendern ist jedoch wesentlich invasiver als eine venöse Blutabnahme und aus diesem Grund nicht erfolgt. Eine andere Möglichkeit ist die zusätzliche Sauerstoff-Begasung während der Versuche. Dies ist in der Flusskammer jedoch nicht möglich, da diese für eine einwandfreie Funktion luftfrei bleiben muss (Van Kruchten et al., 2012).

Unter natürlichen Bedingungen finden außerdem zahlreiche regulatorische Maßnahmen statt, die in der Flusskammer nicht nachgestellt werden können. Zu den Regulatoren zählen unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin I₂ (PGI₂), die vor einer unbegründeten Thrombozytenaktivierung schützen (Brass et al., 2013). In unserem Versuch sind Erythrozyten und Thrombozyten enthalten. Zwar ist bekannt, dass auch Erythrozyten und Thrombozyten NO freisetzen aber der größere Beitrag zur NO-Freisetzung liegt bei anderen Zellen wie den Endothelzellen, Monozyten oder neutrophilen Granulozyten (Cortese-Krott et al., 2012, Brass et al., 2013). Durch diese fehlenden inhibitorischen Signale ist eine schnellere oder stärkere Thrombus-Bildung in der Flusskammer denkbar, als es unter physiologischen Bedingungen der Fall wäre. Weiterhin bleibt offen, ob überhaupt eine NO-Freisetzung durch die Erythrozyten in der Flusskammer erfolgt, da der Zustand der endotheliale NO-Synthase (eNOS) der Erythrozyten, durch die die Synthese des NO in den Erythrozyten erfolgt (Cortese-Krott et al., 2012), unbekannt ist.

Festzuhalten ist an dieser Stelle, dass die Flusskammer ein geeignetes System zur Analyse der Thrombus-Bildung unter Fluss ist. Alle *in vivo*-Bedingungen können jedoch nicht mit dieser Methode nachgestellt werden, sodass *in vivo*-Versuche, in denen die Ergebnisse dieser Flusskammerexperimente überprüft werden, sicherlich sinnvoll sind.

In Anschluss an die Flusskammerexperimente erfolgt die Analyse der in entstandenen Thromben enthaltenen Zellen in Bezug auf ihre PS-Exposition mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Abb. 13 D, 14 C, D). Die Ablösung der entstandenen Thromben erfolgt mit Accutase und dient der Vereinzelung der Zellen. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Untersuchung befinden sich die Zellen noch immer in Accutase. Es ist bekannt, dass die Accutase in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden kann (Bajpai et al., 2008).

4.4 Schlussfolgerung und Aussicht

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die essentielle Rolle der Erythrozyten für die Hämostase und arterielle Thrombose dar. Dabei konnte die Interaktion des thrombozytären Fas-Liganden mit dem erythrozytären Fas-Rezeptor, wodurch eine Phosphatidylserin-Exposition auf der Membran der Erythrozyten vermittelt wird, als ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der arteriellen Thrombus-Bildung identifiziert werden. Somit wird durch die prokoagulante Oberfläche der Erythrozyten ein entscheidender Beitrag an der Thrombozytenaktivierung geleistet, da die exponierten Phosphatidylserine den Prothrombinase-Komplex unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten weit über die rheologischen Aspekte ein essentieller Bestandteil der Hämostase und arteriellen Thrombose sind.

Ein Großteil der Versuche wurde *in vitro* durchgeführt. Mit Hilfe der Flusskammersysteme konnte ein Teil der Bedingungen *in vivo* nachgestellt werden. Und auch die Analyse der humanen arteriellen Thromben ist ein translationaler Ansatz zur Untersuchung der *in vivo*-Bedingungen. *In vivo*-Versuche im murinen System stellen sicherlich den nächsten Schritt zur Bestätigung der hier dargestellten Ergebnisse dar. Dabei wären Experimente mit Fas-Rezeptor- oder Fas-Ligand-*knock-out*-Mäusen notwendig, um die Bedeutung der Interaktion für die arterielle Thrombus-Bildung aufzuzeigen. Am besten würden sich hierfür konditionale *knock-out*-Tiere eignen, denen nur der erythrozytäre Fas-Rezeptor bzw. nur der thrombozytäre Fas-Ligand fehlen. Der Einsatz des Blutes der *knock-out*-Mäuse in der Flusskammer wäre sinnvoll, um den Einfluss des genetischen Defektes des Fas-Liganden bzw. Fas-Rezeptors auf die Thrombus-Bildung zu beobachten. Auch die Beobachtung der Blutungs- und Okklusionszeiten dieser *knock-out*-Tiere ist sicherlich vielversprechend.

Ein wichtiges Ziel ist es außerdem herauszufinden, ob das Wissen über die Fas-Ligand-Fas-Rezeptor-Interaktion in der arteriellen Thrombus-Bildung in Bezug auf eine antithrombotische Therapie genutzt werden kann. Die Beeinflussung dieser Interaktion über beispielsweise Inhibitoren stellt einen vielversprechenden Versuch für eine komplett neue gezielte antithrombotische Therapie dar.

5 Literaturverzeichnis

- (AWMF), A. D. W. M. F. E. V. **2016**. S3-Leitlinie Polytrauma/Schwerverletzten-Behandlung. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.
- AHMAD, R., MENEZES, J., KNAFO, L. & AHMAD, A. **2001**. Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J Leukoc Biol*, 69, 123-8.
- ANTITHROMBOTIC_TRIALISTS'_COLLABORATION **2002**. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj*, 324, 71-86.
- AUMÜLLER, G., GABRIELE AUST, ANDREAS DOLL, JÜRGEN ENGELE **2010**. *Anatomie*.
- BAJPAI, R., LESPERANCE, J., KIM, M. & TERSKIKH, A. V. **2008**. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, 75, 818-27.
- BAMBACE, N. M. & HOLMES, C. E. **2011**. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost*, 9, 237-49.
- BASSE, F., STOUT, J. G., SIMS, P. J. & WIEDMER, T. **1996**. Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J Biol Chem*, 271, 17205-10.
- BEHRENDTS, J. **2012**. *Duale Reihe-Physiologie*.
- BERGER, D., ENGELHARDT, R. & MERTELSMANN, R. **2014**. *Das rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie*, ecomed MEDIZIN.
- BERGFELD, G. R. & FORRESTER, T. **1992**. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res*, 26, 40-7.
- BEVERS, E. M., COMFURIUS, P., VAN RIJN, J. L., HEMKER, H. C. & ZWAAL, R. F. **1982**. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem*, 122, 429-36.
- BONEU, B. **1994**. Laboratory investigations and prediction of thrombotic risk in polycythemia vera. *Nouv Rev Fr Hematol*, 36, 183-5.
- BRASS, L. F., TOMAIUOLO, M. & STALKER, T. J. **2013**. Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response. *Hematol Oncol Clin North Am*, 27, 381-409.
- BROOS, K., FEYS, H. B., DE MEYER, S. F., VANHOORELBEKE, K. & DECKMYN, H. **2011**. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, 25, 155-67.
- CHEN, S., ELDOR, A., BARSHEIN, G., ZHANG, S., GOLDFARB, A., RACHMILEWITZ, E. & YEDGAR, S. **1996**. Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients. *Am J Physiol*, 270, H1951-6.
- CHEUNG, R. C., MCAULEY, R. J. & POLLARD, J. B. **2005**. High mortality rate in patients with advanced liver disease independent of exposure to general anesthesia. *J Clin Anesth*, 17, 172-6.
- CHIU, D., LUBIN, B., ROELOFSEN, B. & VAN DEENEN, L. L. **1981**. Sickled erythrocytes accelerate clotting in vitro: an effect of abnormal membrane lipid asymmetry. *Blood*, 58, 398-401.
- CLEMETSON, J. M., POLGAR, J., MAGNENAT, E., WELLS, T. N. & CLEMETSON, K. J. **1999**. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem*, 274, 29019-24.
- CORTESE-KROTT, M. M., RODRIGUEZ-MATEOS, A., SANSONE, R., KUHNLE, G. G., THASIAN-SIVARAJAH, S., KRENZ, T., HORN, P., KRISP, C., WOLTERS, D., HEISS, C., KRONCKE, K. D., HOGG, N., FEELISCH, M. & KELM, M. **2012**. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*, 120, 4229-37.
- COUGHLIN, S. R. **2000**. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407, 258-64.
- COX, D., KERRIGAN, S. W. & WATSON, S. P. **2011**. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*, 9, 1097-107.

- DARMON, A., BHATT, D. L., ELBEZ, Y., ABOYANS, V., ANAND, S., BOSCH, J., BRANCH, K. R., CONNOLLY, S. J., DYAL, L., EIKELBOOM, J. W., FOX, K. A. A., KELTAI, K., PROBSTFIELD, J., YUSUF, S., ABTAN, J., SORBETS, E., EAGLE, K. A., DUCROCQ, G. & STEG, P. G. **2018**. External applicability of the COMPASS trial: an analysis of the reduction of atherothrombosis for continued health (REACH) registry. *Eur Heart J*, 39, 750-757a.
- DAUB, K., LANGER, H., SEIZER, P., STELLOS, K., MAY, A. E., GOYAL, P., BIGALKE, B., SCHONBERGER, T., GEISLER, T., SIEGEL-AXEL, D., OOSTENDORP, R. A., LINDEMANN, S. & GAWAZ, M. **2006**. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *Faseb j*, 20, 2559-61.
- DU, V. X., DE GROOT, P. G., VAN WIJK, R., RUGGERI, Z. M. & DE LAAT, B. **2012**. Binding of Erythrocyte ICAM-4 to the Platelet Activated Integrin α _{IIb} β ₃ leads to a Direct Erythrocyte-Platelet Adhesion Under Venous Flow Shear Rate. *Blood*, 120, 105-105.
- DU, V. X., HUSKENS, D., MAAS, C., AL DIERI, R., DE GROOT, P. G. & DE LAAT, B. **2014**. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin Thromb Hemost*, 40, 72-80.
- ENOUF, J., BOBE, R., LACABARATZ-PORRET, C., BREDOUX, R., CORVAZIER, E., KOVACS, T. & PAPP, B. **1997**. The platelet Ca²⁺ transport ATPase system. *Platelets*, 8, 5-14.
- F. BAUER, H. T., G. BAUMANN **2014**. *Gerinnung im klinischen Alltag*, Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark.
- FALK, E. **1985**. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*, 71, 699-708.
- FROJMOVIC, M. M. **1998**. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J*, 135, S119-31.
- GAARDER, A., JONSEN, J., LALAND, S., HELLEM, A. & OWREN, P. A. **1961**. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*, 192, 531-2.
- GAO, C., XIE, R., YU, C., WANG, Q., SHI, F., YAO, C., XIE, R., ZHOU, J., GILBERT, G. E. & SHI, J. **2012**. Procoagulant activity of erythrocytes and platelets through phosphatidylserine exposure and microparticles release in patients with nephrotic syndrome. *Thromb Haemost*, 107, 681-9.
- GAY, L. J. & FELDING-HABERMANN, B. **2011**. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11, 123-34.
- GOLDSMITH, H. L. **1972**. The flow of model particles and blood cells and its relation to thrombogenesis. *Prog Hemost Thromb*, 1, 97-127.
- GOWERT, N. S., DONNER, L., CHATTERJEE, M., EISELE, Y. S., TOWHID, S. T., MUNZER, P., WALKER, B., OGORREK, I., BORST, O., GRANDOCH, M., SCHALLER, M., FISCHER, J. W., GAWAZ, M., WEGGEN, S., LANG, F., JUCKER, M. & ELVERS, M. **2014**. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 9, e90523.
- HARRISON, M. J., POLLOCK, S., KENDALL, B. E. & MARSHALL, J. **1981**. Effect of haematocrit on carotid stenosis and cerebral infarction. *Lancet*, 2, 114-5.
- HAYAKAWA, M. & KUZUYA, F. **1991**. Effects of ticlopidine on erythrocyte aggregation in thrombotic disorders. *Angiology*, 42, 747-53.
- HELLEM, A. J., BORCHGREVINK, C. F. & AMES, S. B. **1961**. The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol*, 7, 42-50.
- HELLEY, D., ELDOR, A., GIROT, R., DUCROCQ, R., GUILLIN, M. C. & BEZEAUD, A. **1996**. Increased procoagulant activity of red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease and beta-thalassemia. *Thromb Haemost*, 76, 322-7.
- HERMAND, P., GANE, P., CALLEBAUT, I., KIEFFER, N., CARTRON, J. P. & BAILLY, P. **2004**. Integrin receptor specificity for human red cell ICAM-4 ligand. Critical residues for α IIb β 3 binding. *Eur J Biochem*, 271, 3729-40.

- HERMAND, P., GANE, P., HUET, M., JALLU, V., KAPLAN, C., SONNEBORN, H. H., CARTRON, J. P. & BAILLY, P. **2003**. Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated alpha IIb beta 3 integrin. *J Biol Chem*, 278, 4892-8.
- HEROLD, G. **2014**. *Innere Medizin*, Dr. med. Gerd Herold, Arzt für Innere Medizin/Arbeitsmedizin, Köln.
- HOFFMAN, M. & MONROE, D. M., 3RD **2001**. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85, 958-65.
- HOFFMAN, M. M. & MONROE, D. M. **2005**. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep*, 4, 391-6.
- JACKSON, S. P. **2011**. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*, 17, 1423-36.
- KAWAKAMI, S., KAIBARA, M., KAWAMOTO, Y. & YAMANAKA, K. **1995**. Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelial cell-coated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface. *Biorheology*, 32, 521-36.
- KAY, J. G. & GRINSTEIN, S. **2013**. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. *Adv Exp Med Biol*, 991, 177-93.
- KLATT, C. **2014**. Mechanismen der Thrombusbildung in Hämostase und Thrombose anhand des Flusskammermodells. In: DÜSSELDORF, M.-N. F. H. (ed.).
- KLATT, C., KRUGER, I., ZEY, S., KROTT, K. J., SPELLEKEN, M., GOWERT, N. S., OBERHUBER, A., PFAFF, L., LUCKSTADT, W., JURK, K., SCHALLER, M., AL-HASANI, H., SCHRADER, J., MASSBERG, S., STARK, K., SCHELZIG, H., KELM, M. & ELVERS, M. **2018**. Platelet-RBC interaction mediated by FasL-FasR induces procoagulant activity important for thrombosis. *J Clin Invest*.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. **2009**. *Physiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- KUMAR, R. & CARCAO, M. **2013**. Inherited abnormalities of coagulation: hemophilia, von Willebrand disease, and beyond. *Pediatr Clin North Am*, 60, 1419-41.
- LIER, H., KAMPE, S. & SCHRODER, S. **2007**. [Prerequisites of a functional haemostasis. What must be considered at the scene of an accident, in the emergency room and during an operation?]. *Anaesthesist*, 56, 239-51.
- LIVIO, M., GOTTI, E., MARCHESI, D., MECCA, G., REMUZZI, G. & DE GAETANO, G. **1982**. Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet*, 2, 1013-5.
- LUTHJE, J., SCHOMBURG, A. & OGILVIE, A. **1988**. Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocytes, capable of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. *Eur J Biochem*, 175, 285-9.
- MANDAL, D., MAZUMDER, A., DAS, P., KUNDU, M. & BASU, J. **2005**. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*, 280, 39460-7.
- MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P., MCGAHON, A. J., RADER, J. A., VAN SCHIE, R. C., LAFACE, D. M. & GREEN, D. R. **1995**. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182, 1545-56.
- MARTINEZ, M., VAYA, A., LABIOS, M., GABRIEL, F., GUIRAL, V. & AZNAR, J. **1997**. The effect of long-term treatment with hypotensive drugs on blood viscosity and erythrocyte deformability in patients with essential arterial hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*, 17, 193-8.
- MCEVER, R. P. **2001**. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*, 86, 746-56.
- NAGATA, S. **1997**. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-65.
- NIESWANDT, B., PLEINES, I. & BENDER, M. **2011**. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1, 92-104.

- NIESWANDT, B. & WATSON, S. P. **2003**. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102, 449-61.
- OUAKNINE-ORLANDO, M. D. B., SAMAMA, M. D. P. C.-M., RIOU, M. D. P. B., BONNIN, M. D. P. P., GUILLOSSON, P. J.-J., BEAUMONT, M. D. J.-L. & CORIAT, M. D. P. **1999**. Role of the Hematocrit in a Rabbit Model of Arterial Thrombosis and Bleeding *Anesthesiology*, 90, 1454-1461.
- PAWLOSKI, J. R., SWAMINATHAN, R. V. & STAMLER, J. S. **1998**. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*, 97, 263-7.
- PETER, M. E., HADJI, A., MURMANN, A. E., BROCKWAY, S., PUTZBACH, W., PATTANAYAK, A. & CEPPI, P. **2015**. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ*, 22, 549-59.
- PEYROU, V., LORMEAU, J. C., HERAULT, J. P., GAICH, C., PFLIEGGER, A. M. & HERBERT, J. M. **1999**. Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood. *Thromb Haemost*, 81, 400-6.
- PITTI, R. M., MARSTERS, S. A., LAWRENCE, D. A., ROY, M., KISCHKEL, F. C., DOWD, P., HUANG, A., DONAHUE, C. J., SHERWOOD, S. W., BALDWIN, D. T., GODOWSKI, P. J., WOOD, W. I., GURNEY, A. L., HILLAN, K. J., COHEN, R. L., GODDARD, A. D., BOTSTEIN, D. & ASHKENAZI, A. **1998**. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396, 699-703.
- PLOSKER, G. L. & LYSENG-WILLIAMSON, K. A. **2007**. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of thrombosis. *Drugs*, 67, 613-46.
- REIMERS, R. C., SUTERA, S. P. & JOIST, J. H. **1984**. Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood*, 64, 1200-6.
- RENDU, F. & BROHARD-BOHN, B. **2001**. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261-73.
- RIDDEL, J. P., JR., AOUIZERAT, B. E., MIASKOWSKI, C. & LILLICRAP, D. P. **2007**. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs*, 24, 123-31.
- ROEST, M., REININGER, A., ZWAGINGA, J. J., KING, M. R. & HEEMSKERK, J. W. **2011**. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost*, 9, 2322-4.
- ROSING, J., VAN RIJN, J. L., BEVERS, E. M., VAN DIEIJEN, G., COMFURIUS, P. & ZWAAL, R. F. **1985**. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood*, 65, 319-32.
- SCHERAGA, H. A. **2004**. The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophys Chem*, 112, 117-30.
- SCHLEICHER, R. I., REICHENBACH, F., KRAFT, P., KUMAR, A., LESCAN, M., TODT, F., GOBEL, K., HILGENDORF, I., GEISLER, T., BAUER, A., OLBRICH, M., SCHALLER, M., WESSELBORG, S., O'REILLY, L., MEUTH, S. G., SCHULZE-OSTHOFF, K., GAWAZ, M., LI, X., KLEINSCHNITZ, C., EDLICH, F. & LANGER, H. F. **2015**. Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood*, 126, 1483-93.
- SCHMIDT, R. F. & LANG, F. **2007**. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* Springer, Berlin, Heidelberg.
- SCHROIT, A. J., TANAKA, Y., MADSEN, J. & FIDLER, I. J. **1984**. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell*, 51, 227-38.
- SCHROIT, A. J. & ZWAAL, R. F. **1991**. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1071, 313-29.
- SEIGNEURET, M. & DEVAUX, P. F. **1984**. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3751-5.
- SIKKA, P. & BINDRA, V. K. **2010**. Newer antithrombotic drugs. *Indian J Crit Care Med*, 14, 188-95.

- SOFI, F., MANNINI, L., MARCUCCI, R., BOLLI, P., SODI, A., GIAMBENE, B., MENCHINI, U., FRANCO GENSINI, G., ABBATE, R. & PRISCO, D. **2007**. Role of haemorheological factors in patients with retinal vein occlusion. *Thrombosis and Haemostasis*.
- STAMLER, J. S., JIA, L., EU, J. P., MCMAHON, T. J., DEMCHENKO, I. T., BONAVENTURA, J., GERNERT, K. & PIANTADOSI, C. A. **1997**. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 276, 2034-7.
- STATISTISCHES_BUNDESAMT **2014**. Die 10 häufigsten Todesursachen, Sterbefälle insgesamt nach der ICD-10 im Jahr 2014. Statistisches_Bundesamt.
- STRASSER, A., JOST, P. J. & NAGATA, S. **2009**. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, 30, 180-92.
- SUDA, T. & NAGATA, S. **1994**. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med*, 179, 873-9.
- SWYSTUN, L. L. & LIAW, P. C. **2016**. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood*, 128, 753-62.
- TANAKA, Y. & SCHROIT, A. J. **1983**. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. *J Biol Chem*, 258, 11335-43.
- TRZECIAK-RYCZEK, A., TOKARZ-DEPTULA, B. & DEPTULA, W. **2013**. Platelets--an important element of the immune system. *Pol J Vet Sci*, 16, 407-13.
- TURITTO, V. T. & WEISS, H. J. **1980**. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science*, 207, 541-3.
- VALERI, C. R., CASSIDY, G., PIVACEK, L. E., RAGNO, G., LIEBERTHAL, W., CROWLEY, J. P., KHURI, S. F. & LOSCALZO, J. **2001**. Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of nonsurgical blood loss. *Transfusion*, 41, 977-83.
- VALLES, J., SANTOS, M. T., AZNAR, J., MARCUS, A. J., MARTINEZ-SALES, V., PORTOLES, M., BROEKMAN, M. J. & SAFIER, L. B. **1991**. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood*, 78, 154-62.
- VALLES, J., SANTOS, M. T., AZNAR, J., MARTINEZ, M., MOSCARDI, A., PINON, M., BROEKMAN, M. J. & MARCUS, A. J. **2002**. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood*, 99, 3978-84.
- VAN KRUCHTEN, R., COSEMANS, J. M. & HEEMSKERK, J. W. **2012**. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide. *Platelets*, 23, 229-42.
- VERHOVEN, B., SCHLEGEL, R. A. & WILLIAMSON, P. **1995**. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 182, 1597-601.
- WALKER, B., TOWHID, S. T., SCHMID, E., HOFFMANN, S. M., ABED, M., MUNZER, P., VOGEL, S., NEIS, F., BRUCKER, S., GAWAZ, M., BORST, O. & LANG, F. **2014**. Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to immobilized platelets via platelet phosphatidylserine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306, C291-7.
- WALL, J. E., BUIJS-WILTS, M., ARNOLD, J. T., WANG, W., WHITE, M. M., JENNINGS, L. K. & JACKSON, C. W. **1995**. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol*, 89, 380-5.
- WEISS, H. J., LAGES, B., HOFFMANN, T. & TURITTO, V. T. **1996**. Correction of the platelet adhesion defect in delta-storage pool deficiency at elevated hematocrit--possible role of adenosine diphosphate. *Blood*, 87, 4214-22.
- WELSCH, U., KUMMER, W. & DELLER, T. **2014**. *Lehrbuch Histologie*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- WHELIHAN, M. F., ZACHARY, V., ORFEO, T. & MANN, K. G. **2012**. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*, 120, 3837-45.

- YU, X. H., FU, Y. C., ZHANG, D. W., YIN, K. & TANG, C. K. **2013**. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 424, 245-52.
- ZWAAL, R. F., COMFURIUS, P. & BEVERS, E. M. **1992**. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 1-8.
- ZWAAL, R. F., COMFURIUS, P. & BEVERS, E. M. **1998**. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*, 1376, 433-53.
- ZWAAL, R. F. & SCHROIT, A. J. **1997**. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89, 1121-32.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der primären und sekundären Hämostase.....	6
Abb. 2: Darstellung der Hypothese	12
Abb. 3: Vergleich der Okklusionszeiten von PRP und Vollblut im Flusskammersystem T-Tas®.....	34
Abb. 4: Nachweis des Fas-Rezeptors auf humanen Erythrozyten im Western Blot .	35
Abb. 5: Analyse der Interaktion von Thrombozyten und Erythrozyten im Durchflusszytometer	36
Abb. 6: Durchflusszytometrische Untersuchung der Fas-Ligand-Exposition auf ruhenden und aktivierten Thrombozyten (ADP, CRP) in An- und Abwesenheit von Erythrozyten	37
Abb. 7: Veränderung der PS-Exposition auf Erythrozyten durch aktivierte Thrombozyten	38
Abb. 8: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten durch DcR3.....	39
Abb. 9: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Erythrozyten durch den Fas-Rezeptor-Antikörper.....	40
Abb. 10: Hemmung der PS-Exposition auf der Oberfläche von Thrombozyten durch den Fas-Rezeptor-Antikörper.....	41
Abb. 11: TAT- und PTF-Messungen zur Thrombinbestimmung im Überstand verschiedener Inkubationen von Erythrozyten und Thrombozyten	42
Abb. 12: Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf mit rekombinantem Fas- Rezeptor (CD95)-beschichteten Deckgläschen.....	44
Abb. 13: Einfluss vom Fas-Ligand-Inhibitor DcR3 auf die Thrombus-Bildung in der Flusskammer	46
Abb. 14: Einfluss des CD95-Antikörpers auf die Thrombus-Bildung sowie die PS- Exposition der Erythrozyten und Thrombozyten in der Flusskammer.....	48
Abb. 15: Morphologie humaner Thromben	49
Abb. 16: Lage von Erythrozyten in murinen Thromben.....	50
Abb. 17: Lage von Thrombozyten und Erythrozyten in humanen Thromben.....	51
Abb. 18: Mögliche Interaktionen von Erythrozyten und Thrombozyten durch Zell- Zell-Kontakt.....	51
Abb. 19: Makrophagen in humanem arteriellen Thrombus.....	52
Abb. 20: Schaumzellen in humanen arteriellen Thromben	52
Abb. 21: Anteil von Erythrozyten und Thrombozyten in humanen arteriellen Thromben	53
Abb. 22: P-Selektin (CD62)-Exposition der Thrombozyten humaner arterieller Thromben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten Thrombozyten.....	54
Abb. 23: Fas-Ligand-Exposition der Thrombozyten aus humanen arteriellen Thromben im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten	55
Abb. 24: AnnexinV-Bindung von Erythrozyten im Thrombus und in frischen und alten Erythrozyten.....	56
Abb. 25: AnnexinV-Bindung von Thrombozyten im Thrombus und ruhenden sowie aktivierten Thrombozyten	57

6.2 Charakterisierung der Patiententhromben

Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Datum der Probenentnahme	Entnahmeort	Gewicht [kg]	Größe [cm]	Raucher
1	weiblich	1941	25.05.2014	Ellenbeugenshunt links	90	163	Ex
2	weiblich	1939	30.05.2014	Bypass A. femoralis u. A. tibialis anterior	51	162	Ex
3	männlich	1945	16.06.2014	A. femoralis communis	40	174	Ja
4	männlich	1954	09.07.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	120	181	Ex
5	männlich	1952	11.07.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	70	172	Ex
6	weiblich	1929	18.07.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	74	158	Nein
7	männlich	1954	21.07.2014	A. brachialis u. A. radialis u. A. ulnaris	72	173	Ja
8	männlich	1961	23.07.2014	A. femoralis u. A. poplitea	75	180	Ja
9	weiblich	1939	13.08.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	67	168	Ja
10	weiblich	1935	29.08.2014	A. radialis u. A. ulnaris	61	171	Nein
11	männlich	1946	04.10.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	92	183	Ja
12	männlich	1960	11.10.2014	A. femoralis communis	68	167	Ja
13	weiblich	1934	22.10.2014	A. radialis u. A. ulnaris	79	170	Nein
14	männlich	1936	01.11.2014	A. poplitea	76	169	Nein
15	männlich	1946	01.11.2014	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	92	183	Ja
16	männlich	1953	04.01.2015	A. iliaca communis	72	180	Nein
17	männlich	1951	04.01.2015	A. iliaca communis	73	176	Nein
18	weiblich	1943	21.01.2015	Bypass A. femoralis	66	176	Nein
19	weiblich	1939	28.01.2015	A. radialis u. A. ulnaris	53	158	Nein
20	weiblich	1959	08.02.2015	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	37	161	Nein
21	männlich	1952	26.04.2015	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	69	172	Ja
22	weiblich	1930	06.06.2015	A. femoralis	k.A.	k.A.	Nein
23	weiblich	1940	08.06.2015	A. radialis	74	164	Nein

24	männlich	1948	10.06.2015	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	77	182	Ja
25	männlich	1939	19.06.2015	Bypass A. femoralis u. A. poplitea	76	178	Nein
26	männlich	1951	14.07.2015	A. brachialis	110	180	Ja
27	männlich	1944	29.07.2015	A. femoralis	87	190	Ja
28	weiblich	1944	29.09.2015	A. femoralis	90	176	Nein
29	weiblich	1958	07.10.2015	A. femoralis	50	163	Ja