



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Stress und Redox Signaling in Zellen der Hämostase

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Victoria Petermann
geb. am 14.11.1986 in Wiesbaden

Mainz, 2019

Dekan: XXX

1. Berichterstatter: XXX

2. Berichterstatter: XXX

Tag der mündlichen Prüfung: XXX

Diese Arbeit widme ich in Gedenken all jenen Menschen meines Herzens, die den Beginn dieser Promotion mit mir erlebt, aber vor ihrem Abschluss von uns gegangen sind.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	14
Abkürzungsverzeichnis	15
1 Einleitung	18
1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen	18
1.1.1 Paraoxonase-2	19
1.2 Die Proteinfamilie der NADPH-Oxidasen	22
1.2.1 NADPH Oxidase 2	24
1.3 Oxidativer Stress	26
1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies	26
1.3.2 Oxidativer Stress und ROS in den Mitochondrien	27
1.3.3 Anti-oxidative Systeme	28
1.4 Das zellbasierte hämostatische System	29
1.4.1 Morphologie der Thrombozyten	31
1.4.2 Thrombozytenfunktion in der primären Hämostase.....	33
1.4.3 Thrombozytenfunktion in der sekundären Hämostase	34
1.4.4 Thrombozytenaktivierung und ROS	35
1.4.5 Rolle der Thrombozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	36
2 Zielsetzung	38
3 Material	39
3.1 Chemikalien	39
3.2 Verbrauchsmaterialien	41
3.3 Laborgeräte.....	42
3.4 Software	42
3.5 Enzyme, Standards und Kits	43
3.6 Puffer, Lösungen und Medien	44
3.7 Antikörper	45
3.7.1 Primärantikörper.....	45
3.7.2 Sekundärantikörper	45
3.8 Oligonukleotide	46
3.9 Versuchstiere	46
4 Methoden	49
4.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	49
4.1.1 DNA-Extraktion aus Gewebe.....	49
4.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Gensequenzen genomischer DNA.....	49

4.1.3	Agarosegelelektrophorese	50
4.1.4	RNA-Extraktion aus primären Zellen	50
4.1.5	Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes.....	51
4.1.6	cDNA-Synthese durch reverse Transkriptase	51
4.1.7	Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR).....	52
4.2	Proteinbiologische Arbeitsmethoden.....	53
4.2.1	Herstellung von Zelllysaten aus primären Zellen	53
4.2.2	Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)	53
4.2.3	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
4.2.4	Western Blot	55
4.3	Mikroskopische Arbeitsmethoden.....	56
4.3.1	Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	56
4.3.1.1	Reinheitsanalyse der pulmonalen, murinen Endothelzellen	57
4.3.1.2	Enzymlokalisation in murinen Thrombozyten.....	58
4.3.2	Elektronenmikroskopie (EM).....	59
4.3.2.1	Probenvorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von murinen Thrombozyten	59
4.3.2.2	Probenvorbereitung für die Immunogoldfärbung von murinen Thrombozyten	60
4.4	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	61
4.4.1	Isolierung pulmonaler, muriner Endothelzellen	61
4.4.2	Bestimmung der Zellzahl, der Zellviabilität und Kultivierung von pulmonalen, murinen Endothelzellen.....	63
4.4.3	Blutbildanalysen im EDTA-antikoagulierten Vollblut bei Mäusen.....	64
4.4.4	Isolierung muriner Thrombozyten.....	64
4.4.4.1	Präparation von Plättchen-reichem-Plasma	65
4.4.4.2	Präparation von gewaschenen Thrombozyten	65
4.4.5	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies in murinen Thrombozyten.....	65
4.4.5.1	Durchflusszytometrische Detektion der Produktion von ROS mit CM- H ₂ DCFDA	65
4.4.5.2	Durchflusszytometrische Detektion der Produktion von ROS mit DHR123 67	
4.4.5.3	Behandlung mit N-Acetyl-Cystein	68
4.4.6	Durchflusszytometrische Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von murinen Thrombozyten	68
4.4.7	Durchflusszytometrische Oberflächenrezeptoranalyse von murinen Thrombozyten	69
4.4.8	Durchflusszytometrische Untersuchung von aktivierungsabhängigen Thrombozytenfunktionen bei Mäusen	70
4.4.8.1	Analyse des aktivierten Fibrinogenrezeptors α I IIb β 3 Integrin (GPIIb/IIIa) 70	

4.4.8.2	Analyse des auf der Thrombozyten-Oberfläche exprimierten P-Selektins	71
4.4.8.3	Analyse der δ -Granula und deren Freisetzung mit Hilfe des Mepacrin-Assays	72
4.4.8.4	Analyse der von-Willebrand-Faktor-Bindung	73
4.4.8.5	Analyse der Exposition von anionischen Phospholipiden	74
4.4.8.5.1	Annexin-Assay	74
4.4.8.5.2	Lactadherin-Assay	75
4.4.9	Durchflusszytometrische Analyse der Ca^{2+} -Ionenfreisetzung in murinen Thrombozyten	75
4.4.10	Analyse der Mitochondrien von murinen Thrombozyten	77
4.4.10.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der mitochondrialen Masse mit Hilfe des Mito-Orange-Markers	77
4.4.10.2	Durchflusszytometrische Analyse des Mitochondrialen Membranpotenzial mit Hilfe des JC-1-Markers	79
4.5	Licht-Transmissionsaggregometrie von murinen Thrombozyten	79
4.6	Flusskammer-basierte Funktionsuntersuchungen von murinen Thrombozyten <i>in vitro</i>	80
4.6.1	Adhäsion muriner Thrombozyten an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen	82
4.6.1.1	Beschichtung der Glaskanäle mit Kollagen Typ I	82
4.6.1.2	Präparation von murinem Vollblut in Versuchsgruppen	82
4.6.1.3	Durchführung der Adhäsion muriner Thrombozyten an die subendotheliale Struktur Kollagen I unter Flussbedingungen	84
4.6.2	Kultivierung eines <i>Monolayers</i> von murinen, pulmonalen Endothelzellen in Kapillaren der Flusskammerplatte	85
4.7	<i>In vivo</i> Durchflussanalyse	86
4.7.1	Arteriell-thrombotisches Modell mit $FeCl_3$	87
4.8	Statistik	88
5	Ergebnisse	89
5.1	Lokalisation und Expression der PON2 in murinen Thrombozyten	89
5.1.1	Verifizierung der Proteinexpression	89
5.1.2	PON2 ist intrazellulär in den Mitochondrien, im ER, in den Vesikeln und in den α -Granula von murinen Thrombozyten lokalisiert	90
5.1.2.1	PON2 ist intrazellulär in murinen Thrombozyten lokalisiert	90
5.1.2.2	PON2 ist in den Mitochondrien, im ER, in den Vesikeln und in den α -Granula von murinen Thrombozyten lokalisiert	92
5.2	Phänotypisierung von PON2- und NOX2-defizienten Mäusen	94
5.2.1	PON2 ^{-/-} -Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Zellvolumen und eine verringerte Konzentration im Vollblut	94
5.2.2	PON2-Defizienz bewirkt eine Veränderung der Oberflächen-Expression verschiedener Rezeptor-Glykoproteine von murinen Thrombozyten	96
5.2.3	PON2 beeinflusst die Anzahl an δ -Granula in murinen Thrombozyten	98

5.3	Redox Kontrolle muriner Thrombozyten durch PON2 und NOX2	100
5.3.1	PON2 und NOX2 beeinflussen antagonistisch den oxidativen Stress in murinen Thrombozyten	100
5.3.1.1	Der Gehalt aller ROS in Thrombozyten steht in inverser Abhängigkeit zu PON2 und NOX2	101
5.3.1.2	PON2 inhibiert die Produktion von H ₂ O ₂ in murinen Thrombozyten	102
5.3.1.3	Die Gabe eines Antioxidans senkt den thrombozytären Gehalt an ROS ..	104
5.3.2	PON2- und NOX2-defiziente Mäuse weisen keine Schädigung der Mitochondrialen Membran in Thrombozyten auf	104
5.4	Einfluss von PON2 und NOX2 auf den intrazellulären pH-Wert von Thrombozyten	107
5.4.1	Der intrazelluläre pH-Wert ist in PON2 ^{-/-} und NOX2 ^{-/-} -defizienten murinen Thrombozyten unverändert	107
5.5	Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Thrombozytenfunktionen	108
5.5.1	Thrombozyten zeigen einen von PON2 und NOX2 abhängigen pro-koagulantem Status <i>ex vivo</i>	108
5.5.1.1	vWF bindet verstärkt an PON2 ^{-/-} Thrombozyten und vermindert an NOX2 ^{-/-} Thrombozyten <i>ex vivo</i>	108
5.5.1.2	PON2 ^{-/-} Mäuse zeigen eine verstärkte, NOX2 ^{-/-} Mäuse eine verringerte Exposition von anionischen Phospholipiden auf der Thrombozytenoberfläche <i>ex vivo</i>	110
5.5.1.3	Der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa ist <i>ex vivo</i> auf PON2-defizienten murinen Thrombozyten nicht aktiviert	113
5.5.1.4	PON2 und NOX2 beeinflussen die Exozytose der α-Granula <i>ex vivo</i> von murinen Thrombozyten gegensätzlich	114
5.5.2	Agonisten induzierte Stimulation führt zu einer Veränderung des Aktivitätsstatus der Thrombozyten von PON2 ^{-/-} und NOX2 ^{-/-} Mäuse	116
5.5.2.1	Die Agonisten-induzierte Aktivierungsreaktivität ist bei PON2-defizienten und NOX2-defizienten murinen Thrombozyten <i>in vitro</i> verändert	116
5.5.2.1.1	Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa ist in PON2 ^{-/-} -Thrombozyten erniedrigt	117
5.5.2.1.2	Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa wird von NOX2 nicht beeinflusst	118
5.5.2.1.3	Die Agonisten-induzierte Oberflächenexpression des α-Granula-Membranproteins P-Selektin ist in PON2 ^{-/-} -Thrombozyten erniedrigt	119
5.5.2.1.4	Die Convulxin-induzierte Oberflächenexpression des α-Granula-Membranproteins P-Selektin ist in NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten erhöht	120
5.5.2.2	Effekt von PON2 und NOX2 auf die murine Agonisten-induzierte Aggregation	121
5.5.2.2.1	Die ADP- und Convulxin-induzierte Aggregation ist in PON2 ^{-/-} -Thrombozyten vermindert	121
5.5.2.2.2	Die ADP--induzierte Aggregation ist in NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten erhöht	122

5.5.2.3	PON2 und NOX2 sind nicht an der Freisetzung der δ -Granula beteiligt .	122
5.6	Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Ca^{2+} -Homöostase in murinen Thrombozyten	123
5.6.1	PON2-defiziente und NOX2-defiziente Thrombozyten weisen eine reziprok veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung auf.....	123
5.6.2	Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst die Funktionsfähigkeit von PON2-defizienten und NOX2-defizienten Thrombozyten.....	126
5.6.2.1	Die Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} beeinflusst die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa in gewaschenen PON2 ^{-/-} -Thrombozyten	126
5.6.2.2	Die Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} beeinflusst nicht die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa in NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten	127
5.6.2.3	Die Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} hebt den hypofunktionellen Zustand bei der Agonisten-induzierten Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin in PON2 ^{-/-} -Thrombozyten auf.....	128
5.6.2.4	Die basale und Agonisten-induzierte Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin ist von gewaschenen NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten nach der Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} erhöht.....	129
5.7	Subendotheliale und endotheliale Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	130
5.7.1	Adhäsion muriner Thrombozyten im Vollblut an einem Kollagen beschichteten Kanal der Flusskammer (<i>in vitro</i>).....	130
5.7.1.1	Thrombozyten von PON2-defizienten Mäusen zeigen eine verminderte Adhäsion an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen	131
5.7.2	Methodenetablierung der Adhäsion muriner Thrombozyten im Vollblut an murinen, pulmonalen Endothelzellen unter Flussbedingungen (<i>in vitro</i>)	134
5.7.2.1	Selektion der murinen pulmonalen Endothelzellen	134
5.7.2.2	Beschichtung der Kapillaren der Flusskammerplatte	138
5.7.2.3	Einsaat der murinen, pulmonalen Endothelzellen in den Kanal der Flusskammerplatte	138
5.7.2.4	Kultur der adhären, murinen, pulmonalen Endothelzellen im Kanal der Flusskammer	140
5.7.3	Vaskuläre Adhäsion muriner Thrombozyten und Thrombusbildung in einem arteriellen FeCl ₃ -induzierten Thrombosemodell der Maus (<i>in vivo</i>).....	141
5.7.3.1	PON2 beeinflusst die arterielle Gefäßverschlusszeit	142
5.7.3.2	NOX2 beeinflusst die Bildung und die Auflösung eines arteriellen Thrombus.	143
6	Diskussion	145
6.1	PON2 und NOX2 regulieren ROS in murinen Thrombozyten	146
6.2	Der pro-koagulatorische Status von murinen Thrombozyten ist abhängig von PON2 und NOX2	149
6.3	Die thrombozytäre Hämostase in Mäusen wird von PON2 und NOX2 reguliert..	152

6.4	Wechselspiel der Ca ²⁺ -Homöostase und PON2 bzw. NOX2 in murinen Thrombozyten	157
6.5	Die Bedeutung der Ergebnisse für zukünftige Forschungsrichtungen und die Rolle der PON2 und NOX2 für gerinnungshemmende Therapieansätze	158
7	Zusammenfassung	161
8	Literaturverzeichnis	163
9	Publikationen	181
10	Danksagung	182
11	Lebenslauf	183

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modellierter 3D-Struktur des PON2-Moleküls.....	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Mechanismus der anti-oxidativen Wirkung der PON2.....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Translokation von PON2 in Reaktion auf oxidativen Stress der Zelle.	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung der NOX-Isoformen mit den jeweiligen assoziierten Proteinen und den hauptsächlich gebildeten ROS.	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des grundlegenden Wirkmechanismus zur Aktivierung der NOX2.	25
Abbildung 6: Übersicht der Erzeugung und des Abbaus von reaktiven Sauerstoffspezies.....	29
Abbildung 7: Model der zellbasierten Gerinnung. TF Tissue Factor, Gewebefaktor; Ca ⁺⁺ ionisiertes Kalzium (= Faktor IV); GP Glykoprotein (Oberflächenrezeptor auf Thrombozyten).	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines ruhenden Thrombozyten....	32
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten nach der Freilegung des Subendothels. Abbildung übernommen und modifiziert nach Jurk ⁶⁷ .	33
Abbildung 10: Schematische Darstellung des β -geo gene-trap Vectors im PON2-Lokus des PON2 ^{-/-} -Modells.	48
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Gene Targeting des murinen gp91phox Gens.	48
Abbildung 12: Übersicht des Reaktionsschemas für den BCA-Assay.	53
Abbildung 13: Aufbau des Semidry-Verfahren im Western Blot.	55
Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM).	57
Abbildung 15: Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs im TEM.	59
Abbildung 16: Negative Selektion der murinen Endothelzellen aus der Lunge.	63
Abbildung 17: Ablauf der chemischen Reaktion des CM-H ₂ DCFDA mit ROS.....	66
Abbildung 18: Ablauf der chemischen Reaktion von DHR123 mit ROS.....	67
Abbildung 19: Struktur der Phenol (A) und der Phenolatgruppe (B) von SNARF TM -4F.	68
Abbildung 20: Chemische Reaktion von Fluo3-AM mit Ca ²⁺ zum fluoreszierenden Fluo3-Ca-Komplex.	76
Abbildung 21: Darstellung der reduzierten und oxidierten Form des Mito Tracker TM Orange CMTMROS.....	78

Abbildung 22: Funktionsprinzip der Licht-Transmissionsaggregometrie.	80
Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Flusskammersystems.	81
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Intravitalmikroskopie.	86
Abbildung 25: Das PON2-Protein ist in murinen Thrombozyten detektierbar.	90
Abbildung 26: Intrazelluläre Lokalisation der PON2 in permeabilisierten murinen Thrombozyten.	91
Abbildung 27: Kontrollgruppen zeigen kein PON2-Signal bei murinen Thrombozyten.	92
Abbildung 28: Intrazelluläre Lokalisation von PON2 in spezifischen Regionen.	93
Abbildung 29: PON2 ^{-/-} -Thrombozyten zeigen kein PON2-Signal.	94
Abbildung 30: PON2 ^{-/-} -Thrombozyten zeigen eine erhöhte MPV und eine erniedrigte Konzentration an Thrombozyten im Vollblut.	95
Abbildung 31: PON2 ^{-/-} -Mäuse behandelt mit NAC zeigen im Vergleich zum unbehandelten PON2 ^{-/-} ein erniedrigtes MPV.	96
Abbildung 32: Rezeptoranalyse von PON2 ^{-/-} -Thrombozyten.	97
Abbildung 33: Rezeptoranalyse von NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten.	98
Abbildung 34: Vergleich der Anzahl der δ -Granula pro Anzahl der Thrombozyten in WT und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	99
Abbildung 35: Die Beladung mit Mepacrine in den δ -Granula wird von PON2 und NOX2 beeinflusst.	99
Abbildung 36: Stimulation der WT-Thrombozyten führt zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).	101
Abbildung 37: PON2 ^{-/-} -Thrombozyten zeigen einen erhöhten, NOX2 ^{-/-} -Thrombozyten einen erniedrigten Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).	102
Abbildung 38: Die Stimulation der WT-Thrombozyten führt zu einer erhöhten Produktion an H ₂ O ₂	102
Abbildung 39: PON2 ^{-/-} -Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Level an H ₂ O ₂ an.	103
Abbildung 40: Das Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) nimmt Einfluss auf das thrombozytäre ROS-Level.	104
Abbildung 41: PON2 und NOX2 beeinflussen die Mitochondrien-Anzahl in murinen Thrombozyten.	105
Abbildung 42: Keine Veränderung des Membranpotenzials durch PON2- oder NOX2-Defizienz.	106
Abbildung 43: PON2- und NOX2-Defizienz verursachen keine Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Thrombozyten.	107

Abbildung 44: vWF bindet verstärkt an PON2^{-/-}-Thrombozyten unter basalen Bedingungen und nach moderater Botrocetin-Behandlung..... 109

Abbildung 45: vWF bindet vermindert an NOX2^{-/-}-Thrombozyten unter basalen Bedingungen. 110

Abbildung 46: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen im basalen Zustand und nach Stimulierung mit Convulxin abhängig von Ca²⁺ eine erhöhte Exposition von anionischen Phospholipiden. 111

Abbildung 47: NOX2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine geringere Exposition an anionischen Phospholipiden *ex vivo*. 112

Abbildung 48: PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}- Thrombozyten zeigen *ex vivo* keinen Unterschied zum WT bei der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors. 113

Abbildung 49: PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine gegensätzliche Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche..... 115

Abbildung 50: Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa ist auf PON2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP verringert. 117

Abbildung 51: Die Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors ist auf NOX2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP im Vergleich zu PRP-WT-Kontrolle überwiegend unverändert. 118

Abbildung 52: Die Thrombin- und Convulxin-induzierte Oberflächenexpression von P-Selektin ist in PON2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP verringert..... 119

Abbildung 53: Die Expression von P-Selektin ist in NOX2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP und gew. TZ nach Stimulation mit Convulxin erhöht. 120

Abbildung 54: Die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung durch ADP und Convulxin ist in PON2^{-/-}- Thrombozyten vermindert. 121

Abbildung 55: Die Thrombozytenaggregation von NOX2^{-/-}-Mäusen ist nach Aktivierung mit ADP signifikant erhöht..... 122

Abbildung 56: Die Freisetzung der δ -Granula wird nicht von PON2 oder NOX2 beeinflusst. 123

Abbildung 57: Die freie Ca²⁺-Konzentration in Thrombozyten ist in PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen *ex vivo* und nach Stimulierung *in vitro* different. 124

Abbildung 58: PON2 und NOX2 beeinflussen die Konzentration freier Kalzium²⁺-Ionen im Ruhezustand der Thrombozyten nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺-Ionen (0.5 mM). 125

Abbildung 59: Die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors ist auf PON2^{-/-}-Thrombozyten nach Zugabe von extrazellularem Ca²⁺-Ionen verringert..... 126

Abbildung 60: Die Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors ist nach der Zugabe von extrazellularem Ca²⁺-Ionen in NOX2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP unverändert..... 127

Abbildung 61: PON2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP und gew. TZ zeigen keine Veränderung der Expression von P-Selektin. 128

Abbildung 62: Die Expression von P-Selektin ist in NOX2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP und gew. TZ erhöht..... 129

Abbildung 63: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine verringerte Adhäsion an Kollagen I unter Flussbedingungen (40 Dyn/cm²). 131

Abbildung 64: Thrombin-Inhibition durch Fragmin® und PPACK zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen Typ I. 132

Abbildung 65: Prokoagulante Thrombozyten aus PON2^{-/-}-Mäusen adhärieren weniger an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen (40 Dyn/cm²). 133

Abbildung 66: Thrombin-Inhibition durch Fragmin® und PPACK führt zu einer signifikant verringerten Oberflächenbedeckung pro-koagulanter WT-Thrombozyten. 133

Abbildung 67: Positive Selektion der murinen, pulmonalen Endothelzellen führt zu einer schlechten Kultivierbarkeit. 135

Abbildung 68: Kultivierung von murinen, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen über mehrere Tage. 136

Abbildung 69: Qualitative Kontrolle der isolierten, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen durch LSM..... 137

Abbildung 70: Quantitative Kontrolle der isolierten, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen durch qRT-PCR..... 138

Abbildung 71: Entstehung eines Monolayers aus murinen, pulmonalen Endothelzellen im Kanal der Flusskammer. 140

Abbildung 72: Monolayer aus murinen, pulmonalen Endothelzellen. 141

Abbildung 73: PON2 nimmt Einfluss auf die arterielle Thrombusbildung. 142

Abbildung 74: PON2^{-/-}-Mäuse zeigen eine verringerte arterielle Thrombusbildung..... 143

Abbildung 75:NOX2 beeinflusst die arterielle Thrombusbildung und Rekanalisation. 144

Abbildung 76:NOX2^{-/-}-Mäuse zeigen eine verringerte arterielle Thrombusbildung.. 144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), unterteilt in radikalische und nicht-radikalische ROS.	27
Tabelle 2: Chemikalien.....	39
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 4: Laborgeräte.....	42
Tabelle 5: Software.....	42
Tabelle 6: Enzyme, Standards und Kits.....	43
Tabelle 7: Puffer, Lösungen und Medien	44
Tabelle 8: Primärantikörper.....	45
Tabelle 9: Sekundärantikörper.....	45
Tabelle 10: Oligonukleotide	46
Tabelle 11: Versuchstiere.....	47
Tabelle 12: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR.....	49
Tabelle 13: Tabellarische Auflistung der verwendete Primer des PCR-Ansatzes zur Bestimmung des Genotyps.	50
Tabelle 14: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der PCR.....	51
Tabelle 15: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der qRT-PCR.....	52
Tabelle 16: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE.....	54
Tabelle 17: Ansätze der Agonisten mit den vier Versuchsgruppen für die Untersuchung des Fibrinogenrezeptors.....	71
Tabelle 18: Ansätze der Agonisten mit den vier Versuchsgruppen für die Untersuchung des P-Selektin.....	72
Tabelle 19: Pipettierschema für die Flusskammerversuche mit Kollagen Typ I.....	83

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
3OC12	N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Kalzium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
Cu	Kupfer
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMEM	standardisiertes Nährmedium (<i>dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. et alii (und andere)
F	Faktor
F...a	aktivierte Form des Faktors
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)

FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
g	Gramm
xg	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ DCFDA	<i>dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (<i>high density lipoprotein</i>)
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
JNK	c-Jun-Kinase
k	Kilo
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low density lipoprotein particles</i>
M	Molar
m	Meter bzw. Milli
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen (<i>mean platelet volume</i>)
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	Nano
Na	Natrium
NAC	N-Acetylcystein
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid

NOX	NADPH Oxidase
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PLT	<i>platelet count</i>
PO	Paraoxon
PON	Paraoxonase
PON2-iso1	Paraoxonase-2 Isoform 1
PON2-iso2	Paraoxonase-2 Isoform 2
PS	Phosphatidylserin
QH ₂	Ubiquinol
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
Redox	Reduktion-Oxidation
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitogene species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygene species</i>)
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
s	Sekunde
siRNA	kleine eingreifende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TierSchG	Tierschutzgesetz
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	Versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Der Familie der Paraoxonasen gehören die Mitglieder Paraoxonase-1; -2 und-3 an. Die Lokalisation aller 3 Gene, welche PON1-3 codieren, befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q21-22) beim Menschen¹ und Chromosom 6 bei der Maus². Diese physische Nähe sowie eine hohe Strukturmorphologie weisen darauf hin, dass die Gene sich von einem gemeinsam Vorläufer ableiten³. Dabei stellt Paraoxonase-2 (PON2), belegt durch phylogenetische Analysen, den evolutionär ältesten Vertreter der Paraoxonasen dar. Durch Genduplikation gingen daraus dann Paraoxonase-1 (PON1) und Paraoxonase-3 (PON3) hervor⁴. Aber auch innerhalb der Spezies der Säugetiere sind alle drei Gene der Paraoxonasen hoch konserviert und die drei Proteine besitzen eine Größe von ca. 40 kDa. So weist beispielsweise PON2 basierend auf der cDNA-Sequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäurefolge zwischen der Maus und dem Menschen eine Identität von über 85% auf⁵. Namensgeber dieser Enzymfamilie war W.N. Aldrige im Jahre 1953, als er in seinen Studien mittels *in vitro* Analyse zeigte, dass PON1 die Fähigkeit besitzt, dass Organophosphat Paraoxon (PO) sowie verwandte Substrate zu hydrolysieren^{6;7}. Aufgrund der hohen Homologie zu PON1 wurden die später entdeckten Vertreter PON2 und PON3 ebenfalls als Paraoxonasen klassifiziert, obwohl PON2 keine und PON3 nur eine marginale Paraoxonase-Aktivität aufweist⁸. Daher spiegelt der Name Paraoxonase mehr die hohe Strukturmorphologie wider, als die enzymatische Aktivität.

Als Gemeinsamkeit besitzen alle Vertreter der Familie eine Arylesterase, sowie eine Lactonase-Aktivität. Allerdings weisen alle 3 Paraoxonasen unterschiedliche und z.T. überlappende Substratspezifität auf^{9;10}. Die Lactonase-Aktivität ist bei allen Vertretern der Paraoxonase dabei am stärksten ausgeprägt und stellt daher die wichtigste enzymatische Aktivität dar. Im Jahr 2005 veröffentlichten Wissenschaftler einen Bericht, indem sie experimentell nachwiesen, dass Phenylacetat und Organophosphat für PON1, Acyl-Homoserin Lactone für PON2 und Lovastatin und Spironolacton für PON3 die besten und spezifischsten Substrate darstellen⁹. Ein Vertreter eines Acyl-Homoserin Lacton ist unter anderem 3OC12 (N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton), ein Signalmolekül des pathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*. Durch seine Lactonase-Aktivität vermittelt PON2 einen natürlichen Abwehrmechanismus und führt eine effektive Hydrolyse durch, weswegen die bakterielle Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* abgeschwächt wird¹¹.

Als weitere Gemeinsamkeit aller drei PON Isoformen gilt die Fähigkeit signifikant oxidativen Stress zu reduzieren^{12;13;14}. Deswegen werden Paraoxonasen eine wesentliche Bedeutung in Krankheitsbildern zugesprochen, in denen eine Störung des Redox-Gleichgewichtes sowie oxidativer Stress und die dadurch verbundenen induzierten Entzündungsprozesse von Bedeutung sind.

Jedoch weisen die Proteine grundlegende Unterschiede in ihrer enzymatischen Aktivität, Lokalisation und Regulation auf, weswegen man davon ausgeht, dass sie unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben. PON1, das hauptsächlich in der Leber exprimiert und sekretiert wird, liegt zum größten Teil im Serum assoziiert an *high density lipoprotein* (HDL) vor⁴. Im Gegensatz zu PON1 wird PON3 zwar auch in der Leber, aber auch in anderen Teilen des Gewebes exprimiert¹⁵. Ein geringer Anteil von PON3 liegt dabei ebenfalls assoziiert mit HDL im Blutkreislauf vor, wobei die Serum-Lokalisation mit der Spezies zu variieren scheint¹⁶. Allerdings agiert PON3 intrazellulär und wurde in den Mitochondrien sowie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nachgewiesen¹⁷.

1.1.1 Paraoxonase-2

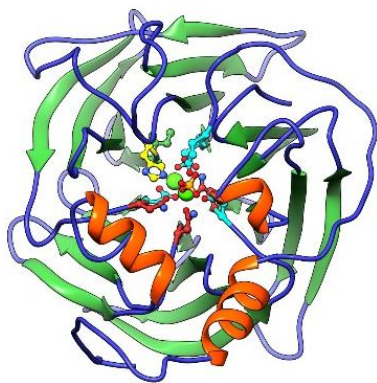


Abbildung 1: Modellierte 3D-Struktur des PON2-Moleküls.
Repräsentatives Bild des Homologiemodell von PON2 erstellt von Dr. Martin Haugwitz mithilfe des Programms UCSF Chimera

PON2 ist belegt durch phylogenetische Analysen (s. 1.1) höchstwahrscheinlich der älteste Vertreter der Familie der Paraoxonasen, obwohl PON1 zuerst entdeckt und beschrieben wurde⁴. Die Expression ist ubiquitär sowohl im Menschen als auch in der Maus nachgewiesen, wobei das Expressionslevel sowohl divergent zu den einzelnen Gewebetypen als auch zu dem untersuchten Geschlecht ist. Das höchste Level an Expression von PON2 wurde in Mäusen im Dünndarm sowie in der Lunge, gefolgt vom Herzen und der Leber nachgewiesen, während das Expressionslevel in den Testikeln, den Nieren und dem Gehirn gering war¹⁸. In Bezug auf das Geschlecht weisen Frauen eine 3-4-mal höhere Expression an PON2 auf wie Männer¹⁸. Die Lokalisation der PON2 ist intrazellulär^{14;19}.

Auf molekularer Ebene betrachtet, besitzt PON2 ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa¹ und es entstehen durch Spleißen der PON2-mRNA beim Menschen zwei Isoformen: PON2-iso1 und PON2-iso2^{14;20}. Allerdings ist von beiden Isoformen der PON2 bis heute nicht bekannt, ob sie sich in ihrer Lokalisation, Expression oder Funktion unterscheiden.

➤ Anti-oxidative Funktion

Die für diese Arbeit wichtigste Eigenschaft der PON2 ist ihre anti-oxidative Wirkung, mit dem es einen Zell-basierten Schutz vor erhöhtem oxidativem Stress vermittelt^{13;21;22}. Dabei beschreibt oxidativer Stress den Zustand in dem eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species*; ROS, s. 1.3) gebildet bzw. vorhanden ist.

In vitro Studien an vaskulären Zellen haben zum einen bei einem RNAi vermittelten *knockdown* der PON2 eine Erhöhung an ROS, zum anderen nach Überexpression der PON2 eine Verringerung des ROS-Gehaltes gezeigt¹⁴. Später wurde auf der Grundlage biochemischer und zellbiologischer Analysen nachgewiesen, dass PON2 spezifisch die Bildung von Superoxid aus der inneren Mitochondrienmembran verringert, aber keinen Einfluss auf andere ROS wie beispielsweise Peroxinitrit oder Wasserstoffperoxid besitzt¹³. Der Mechanismus dahinter wird in Abbildung 2 dargestellt und beschreibt, dass PON2 durch Bindung an der inneren Mitochondrienmembran an das Coenzym Q10 die Übertragung von Elektronen aus dem Komplex I und dem Komplex III der mitochondrialen Atmungskette auf molekularen Sauerstoff verhindert^{13;17;23}.

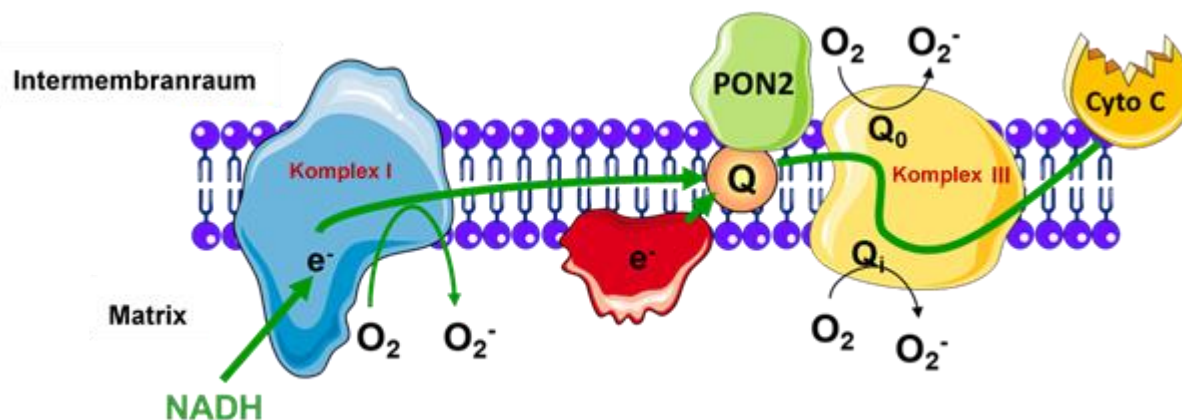


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Mechanismus der anti-oxidativen Wirkung der PON2. Innerhalb der mitochondrialen Atmungskette bindet PON2 an Coenzym Q und bewirkt dadurch eine Prävention der Superoxid-Produktion an Komplex I und III. Abbildung übernommen und modifiziert nach Witte¹⁷.

Da die PON2 also nicht den Abbau der Superoxide, sondern die Coenzym Q10-abhängige Entstehung verhindert, ist ihre Funktion präventiver Natur. Zudem haben Punktmutationsstudien zum spezifischen Ausschalten der enzymatischen Laktonase-Aktivität gezeigt, dass die von PON2 ausgehende anti-oxidative Funktion unabhängig von dieser enzymatischen Laktonase-Aktivität ist¹³.

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass der durch PON2 vermittelte Schutz vor oxidativem Stress zu einer Inhibition der Lipidperoxidation von Plasmamembranlipiden führt. PON2 beschrieben als Transmembranprotein Typ II, transloziert als Antwort auf oxidativen Stress dabei vom ER an die Plasmamembran und hemmt dort durch seine extrazelluläre C-terminale Domäne die von ROS induzierte Lipidperoxidation²⁴. Dies geschieht wahrscheinlich durch seine hydrolytische Aktivität und wird zusammenfassend in der nachfolgenden Abbildung 3 dargestellt.

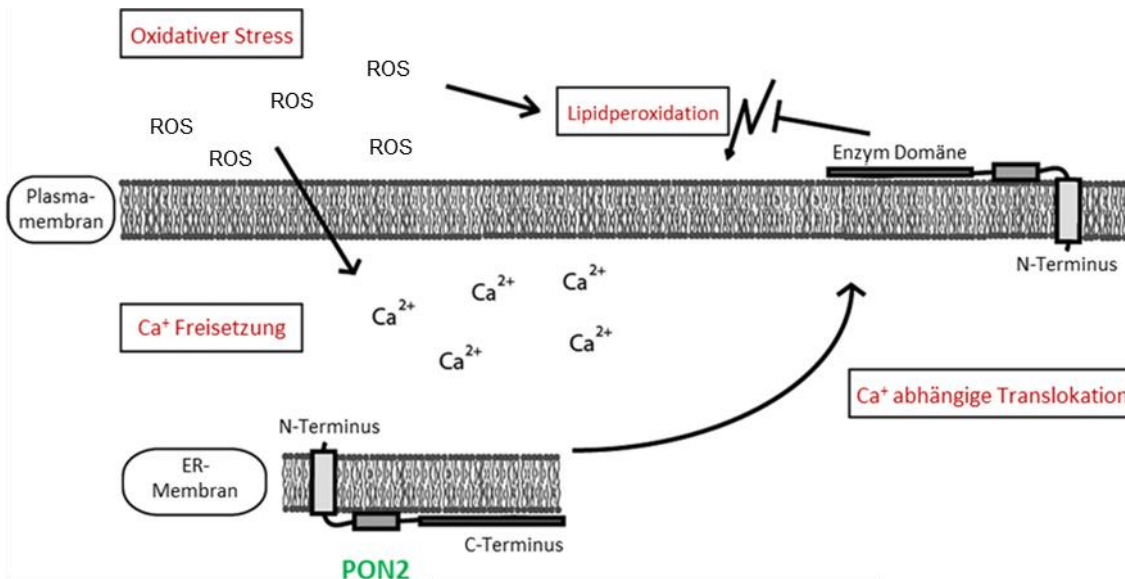


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Translokation von PON2 in Reaktion auf oxidativen Stress der Zelle. Abbildung übernommen und modifiziert nach Hagmann²⁴.

➤ Anti-apoptotische Funktion

Die mitochondriale Superoxid-Produktion ist essentiell in apoptotische Signalwege involviert. Da PON2 wie beschrieben durch seine anti-oxidative Funktion Einfluss auf die mitochondriale Superoxid-Produktion nimmt, besitzt es damit auch Einfluss auf den apoptotischen Zelltod, da normalerweise die durch PON2 verringerte mitochondriale Superoxid-Produktion in einer herabgesetzten mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung resultiert. Das hat wiederum eine verringerte intrinsische Apoptose zur Folge.

Zudem beeinflusst PON2 einen zweiten Einflussfaktor, der zur Initiierung der Apoptose führen kann, dem sogenannten endoplasmatische Retikulum (ER) - Stress. Dieser beschreibt eine Störung der Homöostase, die bedingt durch verschiedene Faktoren wie ROS, Hypoxie o. Ä. ausgelöst wird und den *unfolded protein response* (UPR) Signalweg aktiviert. Dieser hat als Ziel die Funktion der ER-Homöostase wiederherzustellen und damit das Überleben der Zelle zu sichern, leitet bei Misserfolg jedoch die Apoptose ein²⁵.

Studien haben gezeigt, dass es bei ER-Stress zu einer Überexpression von PON2 kommt¹⁴, die eine Reduktion der c-Jun Kinase (JNK) und im Folgenden zu einer Verminderung des proapoptischen *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) führt, was zu einer Hemmung der ER-Stress induzierten Apoptose beiträgt²⁶.

Allerdings beschrieben Studien auch, dass die anti-apoptische Funktion der PON2 von verschiedenen Tumoren durch Überexpression der PON2 benutzt wird, um eine erhöhte Zelltod-Resistenz und eine erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika aufzuweisen^{15;27}.

➤ Anti-atherogene Funktion

Die Pathogenese der Atherosklerose, das heißt die Ausbildung von entzündeten lipidreichen Gefäßläsionen wird durch vaskulären oxidativen Stress und der daraus resultierenden endothelialen Dysfunktion begünstigt²⁸. Zusätzlich kommt es zu einer Beteiligung der durch ROS verursachten oxidativen Modifikation von *low density lipoproteins* (LDL) an der Initiierung und Progression der Atherosklerose²⁹.

Obwohl PON2 intrazellulär lokalisiert und nicht im Serum vorliegt, wurde durch Studien eine ausgeprägte anti-atherogene Funktion nachgewiesen, die sich aus der anti-oxidativen Funktion ableitet. So zeigte zum einen eine Überexpression von PON2 an Zellen *in vitro* eine verringerte Effektivität der Oxidation von LDL im Vergleich zu naiven Zellen²², zum anderen wirkt PON2 anti-oxidativ in den Zellen der Gefäßwand, was der endothelialen Dysfunktion entgegenwirkt und zum Schutz vor Atherosklerose beiträgt¹⁴.

1.2 Die Proteinfamilie der NADPH-Oxidasen

Obwohl bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts das Phänomen des *respiratory burst* in Zellen von Seeigelleiern³⁰, Phagozyten³¹ und Spermatozyten³² bekannt war, dauert es bis 1964 bis die NADPH-Oxidase (NOX) als wichtiges Enzym für den *respiratory burst* identifiziert wurde³³. Ihr Name leitet sich aus der kontroversen Diskussion ab, in der NADPH oder NADH als Hauptsubstrat des Enzyms angenommen wurde.

Zur Familie der NOX gehören die 7 NOX Isoformen NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, sowie DUOX1 und DUOX2 als katalytische Untereinheiten an, die generell in 2 Typen, die phagozytären NOX und die nicht-phagozytären NOX unterteilt werden^{34;35}. Es handelt sich bei ihnen ohne Ausnahme um Transmembranproteine, die in Abhängigkeit von NADPH als Substrat, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Eisen die Übertragung von Elektronen auf molekularem Sauerstoff katalysieren^{34;36}.

In Abhängigkeit zur jeweiligen katalytischen Untereinheit werden noch zwei Organisatoruntereinheiten (p47^{phox}; NOX Organisator 1 (NOXO1)) sowie zwei Aktivatoruntereinheiten (p67^{phox}; NOX Aktivator 1 (NOXA1)) und weitere Untereinheiten (p22^{phox}; p40^{phox}; Rac1; Rac2) beschrieben, aus denen sich die jeweilige Isoform des Enzymkomplexes formt³⁷. Zusammenfassend variieren die gebildeten Enzymkomplexe in ihrer Struktur, das NOX-Grundmotiv bleibt jedoch konserviert und besteht aus einem transmembranen Teil (TM Teil) mit mindestens sechs transmembranen Domänen und einer exztracytosolischen Dehydrogenase Domäne (DH-Domäne). Dazu verfügt das Grundmotiv über eine NADPH Bindestelle am äußeren C-Terminus, sowie eine FAD Bindungsstelle in der DH-Domäne³⁸. Graphisch wird dies in der nachfolgenden Abbildung 4 gemeinsam mit dem hauptsächlich gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies der jeweiligen Form der NADPH-Oxidase dargestellt.

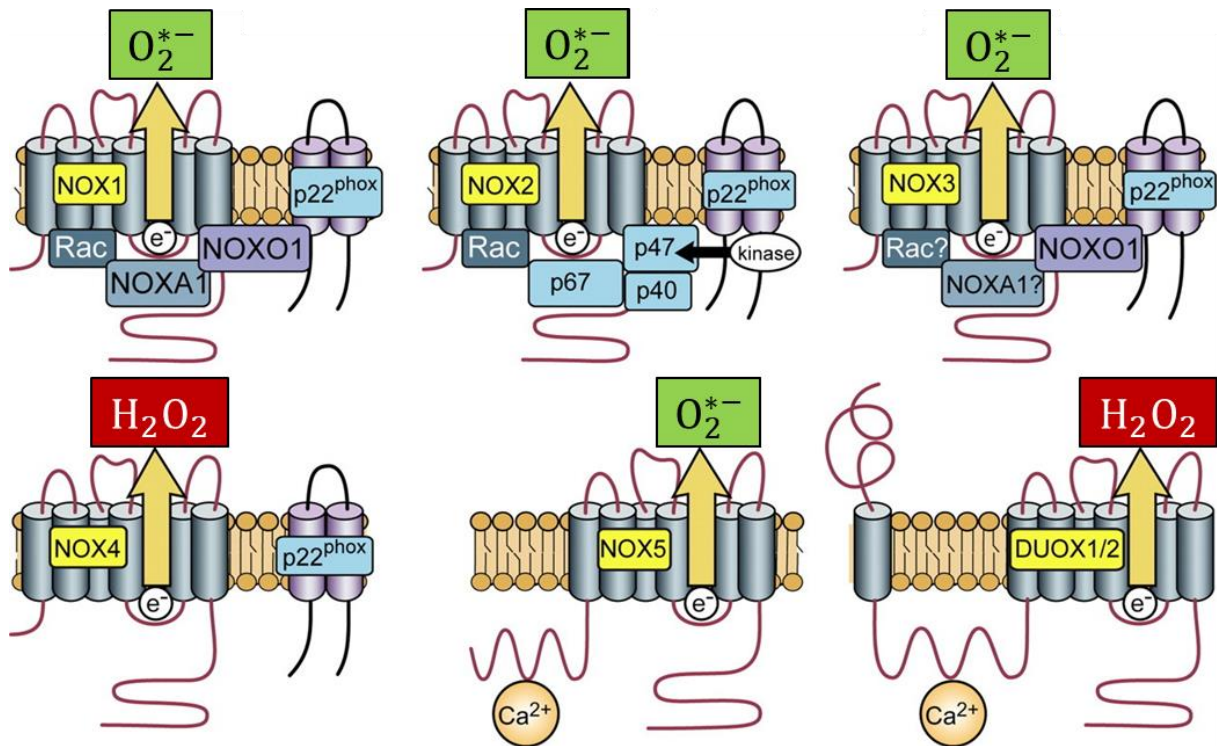


Abbildung 4: Schematische Darstellung der NOX-Isoformen mit den jeweiligen assoziierten Proteinen und den hauptsächlich gebildeten ROS. Abbildung übernommen und modifiziert nach Bedard und Krause³⁸.

1.2.1 NADPH Oxidase 2

Als erstes Mitglied der NOX Familie wurde die NADPH Oxidase 2 (NOX2 bzw. gp91^{phox}) in Leukozyten entdeckt und beschrieben³⁹. Die Lokalisation des Genes, welches NOX2 codiert befindet sich sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf Chromosom X (Xp21.1-11.4)³⁸. NOX2, das auf molekularer Ebene eine Masse von 65 kDa⁴⁰ und keine weiteren Isoformen besitzt, gilt als das am häufigsten im Organismus auftretende Mitglied der NOX Familie und ist in Phagozyten sowohl in den interzellulären Membranen als auch an der Plasmamembran in enger Verbindung mit der Untereinheit p22^{phox} lokalisiert und am höchsten exprimiert³⁸.

Während in nicht-stimulierten, ruhenden Phagozyten die Untereinheiten des multimeren Enzymkomplexes im Zytosol (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) und die Untereinheit Rac2 in einer inaktiven GDP-Form vorliegen, bildet NOX2 zusammen mit seiner Untereinheit p22^{phox} das Flavocytochrom b₅₅₈. In dieser Form ist die NOX2 nicht konstitutiv aktiv und es werden keine reaktiven Sauerstoffspezies produziert. Durch Stimulierung der Phagozyten kommt es zur Phosphorylierung von der Organisatoruntereinheit p47^{phox} und damit zu einer Konformationsänderung durch die Proteinkinase C (PKC). Dies führt zur Interaktion mit p67^{phox} und einer Translokation des p47^{phox}/p67^{phox} Komplexes zur Plasmamembran, wo p47^{phox} mit p22^{phox} interagiert und die Aktivatoruntereinheit p67^{phox} durch eine direkte Protein-Protein Interaktion mit der katalytischen Untereinheit NOX2 reagiert.

Die beiden anderen Untereinheiten p40^{phox}, sowie die nun aktivierte Rac2 in der GTP-Form beteiligen sich an der Translokation des p47^{phox}/p67^{phox}-Komplexes (p40^{phox}), sowie an der Annäherung von p67^{phox} an NOX2 (Rac2). Zusammenfassend geschieht die Aktivierung von NOX2 durch die cytosolischen Proteine und wird in der nachfolgenden Abbildung 5 graphisch dargestellt. Erst durch die Aktivierung der NOX2 werden die reaktiven Sauerstoffspezies produziert und in den extrazellulären Raum freigesetzt^{35;36;38;41;42;43}.

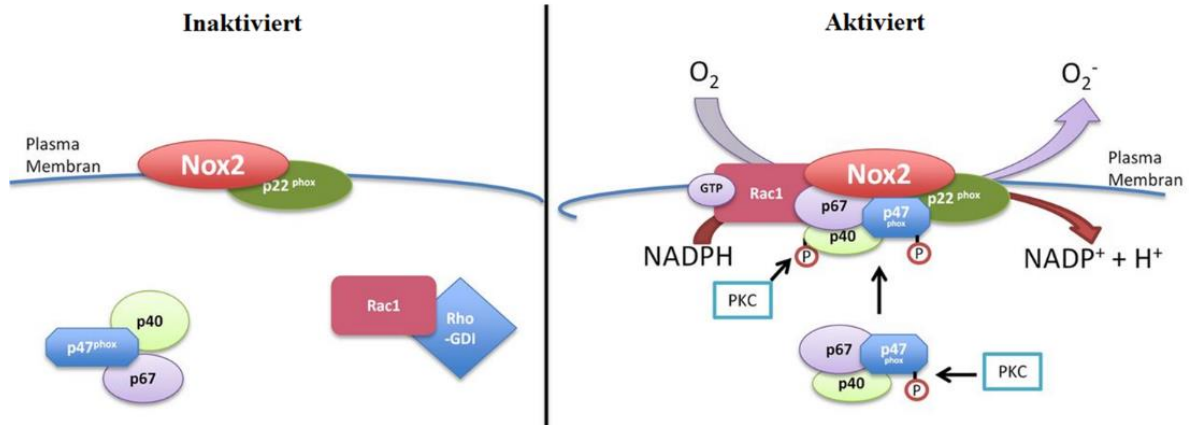
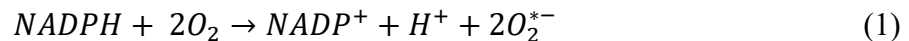


Abbildung 5: Schematische Darstellung des grundlegenden Wirkmechanismus zur Aktivierung der NOX2. Abbildung übernommen und modifiziert nach Sciarretta⁴⁴.

➤ Pro-oxidative Funktion

Wie bereits im obigen Abschnitt 1.2 beschrieben ist die NADPH Oxidase 2 ein Enzym, dass die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid nach der folgenden Reaktionsgleichung 1 katalysiert, wobei NADPH als Elektronendonator fungiert^{34;36}:



Damit ist die NOX2 neben den Enzymen der mitochondrialen Atmungskette, sowie den NO-Synthasen und den Xanthin-Oxidasen für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, im speziellen von Superoxid, im vaskulären System verantwortlich^{45;46;47}.

Schlüsselfunktion für die Produktion von Superoxiden durch NOX2 ist zum einen die Abwehr von Pathogenen auf den Organismus und im speziellen Katalase-positive Organismen (z.B. *Staphylococcus aureus*), die nur durch NOX2-exprimierende Neutrophile abgetötet werden können³⁸. Zum anderen beeinflussen die durch NOX2 produzierten Superoxide indirekt die zellulären Signalwege durch Reaktion und der damit geringeren Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, einem entscheidenden Signalmolekül der Zellen⁴⁸.

➤ Pro-apoptotische Funktion

Der Zelltod als Reaktion auf die Aktivierung von NOX2 wurde in vielen Studien beschrieben. Im Gegensatz zu der erwünschten Abtötung als Verteidigung vor eindringenden Pathogenen, führt die Produktion von Superoxid durch NOX2 indirekt durch Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA), den Lipiden oder von Proteinen zur Apoptose oder indirekt durch ROS-vermittelte Aktivierung von Signalmolekülen wie den MAP-Kinasen (engl. *mitogen-activated protein*) zur Auslösung von Apoptose⁴⁹.

➤ Pro-atherogene Funktion

Wie bereits im Abschnitt 1.1.1 beschrieben, ist die Pathogenese der Atherosklerose durch den vaskulären oxidativen Stress begünstigt, ebenso wie die ROS an der Initiierung und Progression der Atherosklerose durch oxidative Modifikation von LDL beteiligt sind^{28;29}.

Da NOX2 einen der Hauptproduzenten für ROS im vaskulären System stellt, konnte eine pro-atherogene Funktion nachgewiesen werden, die sich aus der pro-oxidativen Funktion ableitet. Studien mit ApoE^{-/-} - Mäusen konnten zudem belegen, dass eine selektive Inhibition von NOX2 zu einem Rückgang der durch die Atherosklerose ausgelösten vaskulären Pathologie führten, was als Hinweis auf die dominante Rolle der durch NOX2 produzierenden ROS gewertet wird⁵⁰.

1.3 Oxidativer Stress

Die Bezeichnung Oxidativer Stress steht für eine Ungleichheit in der Stoffwechsellage der Zelle, die durch übermäßige Produktion von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (ROS/RNS) bei unzureichender anti-oxidativer Verteidigung eintritt. Die Bildung von ROS/RNS ist in aeroben Organismen jedoch unvermeidlich, da Sauerstoff bei verschiedenen Lebensvorgängen eine entscheidende Rolle spielt, sei es in seiner elementaren Form oder in Form seiner Verbindungen. Dabei wurden lange Zeit ROS/RNS traditionellerweise als zufällige und schädliche Nebenprodukte und im besten Fall als Komponenten der körpereigenen Immunabwehr gegen Mikroorganismen betrachtet. Gegenwärtig gibt es inzwischen auch Publikationen, die eine Rolle der ROS/RNS als Signalmoleküle in der Weiterleitung von Redox-Signalen innerhalb verschiedenster physiologischer Prozesse belegen⁵¹.

1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Molekularer Sauerstoff ist ein Biradikal, da beide Sauerstoffatome in den äußeren antibindenden π^* Molekülorbitalen je ein ungepaartes Elektron besitzen. Da aber die Spins dieser äußeren Valenzelektronen im Grundzustand der Hundschen Regel gehorchend parallel ausgerichtet sind, sorgen sie für den relativ stabilen Zustand des molekularen Sauerstoffs mit der niedrigsten Energie.

Eine andere Anordnung der äußeren Elektronen von Sauerstoff führt zu reaktionsfreudigen Derivaten des molekularen Sauerstoffs, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt werden. Eine Auflistung der ROS, die in radikalische ROS und nicht-radikalische ROS unterteilt sind befindet sich in der nachfolgenden Tabelle 1.

Tabelle 1: Auflistung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), unterteilt in radikalische und nicht-radikalische ROS.

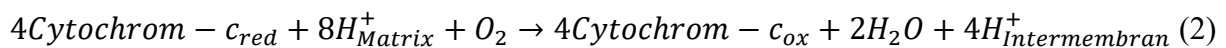
Radikalische ROS		Nicht-radikalische ROS	
Name	Formel	Name	Formel
Superoxid	O_2^{*-}	Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxylradikal	OH^*	Hypochlorige Säure	$HOCl$
Peroxyradikal	RO_2^*	Ozon	O_3
Alkoxyradikal	RO^*	Singulett-Sauerstoff	1O_2
Hydroxyperoxyradikal	HO_2^*	Peroxynitrit	$ONOO^-$

Wegen ihrer hohen Reaktionsfreude können ROS mit allen molekularen Strukturen der Zelle reagieren, was in Abhängigkeit der Lebensdauer des ROS, des Bildungsortes und des Reaktionspartners, zu strukturellen und funktionellen Störungen bis zum Zelltod führen kann. Insbesondere in der DNA kann es durch ROS zu Fehlpaarungen und in der Folge zu Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen kommen⁵², was zur Initiation und Promotion von Tumoren beiträgt.

1.3.2 Oxidativer Stress und ROS in den Mitochondrien

Jede Zelle eines Organismus braucht um ihre jeweilige Tätigkeit auszuführen Energie, die von den in den Zellen vorkommenden Mitochondrien durch die Regenerierung des universalen Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) bereitgestellt wird. Diese Regenerierung geschieht hauptsächlich durch Energieumwandlungsprozesse an der mitochondrialen Atmungskette durch Umwandlung von einer elektromotorischen in eine protonenmotorische Kraft⁵³.

Dabei ist ein aerober Organismus wie der des Menschen vollständig auf Sauerstoff angewiesen, der von der mitochondrialen Atmungskette hauptsächlich an der Cytochrom-C Oxidase (Komplex IV) nach der folgenden Reaktion 2 umgesetzt wird⁵³:



Allerdings verlaufen 1-3 % der kontrollierten Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff, entweder direkt am Komplex IV oder indirekt an den anderen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette, nicht vollständig ab⁵⁴, so dass die im Abschnitt 1.3.1 beschriebenen reaktiven Sauerstoffspezies entstehen und gleichsam bei übermäßiger Produktion und schwachem Gehalt an Antioxidantien, oxidativer Stress in der Zelle herrscht.

Zu den Folgen davon gehören die Lipidperoxidation, die Proteinoxidation sowie die Schädigung der DNA⁵⁵, wobei gerade bei der Lipidperoxidation die ungesättigten Fettsäuren der humanen und pflanzlichen Lipide der Membran eine besondere Anfälligkeit für eine Oxidation mit ROS besitzen, da sie zahlreiche Doppelbindungen enthalten, welche die sich zwischenzeitlich bildenden Lipidradikale mesomeriestabilisieren. Die dabei entstandenen Schäden verringern die Fluidität der betroffenen Membran und steigern dafür die Membranpermeabilität, was zu einer Beeinträchtigung der membrangebundenen Enzyme und Rezeptoren und damit zur Behinderung des Ionentransportes und anderer damit verbundener Prozesse führt. Am Ende dieses mehrstufigen Prozesses kommt es zum programmierten Zelltod, der Apoptose.

1.3.3 Anti-oxidative Systeme

Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht in Säugetierzellen ein Gleichgewicht zwischen den ROS und den anti-oxidativ wirkenden Substanzen, zu denen Enzyme und nicht-enzymatische Antioxidantien gehören, deren wichtigste Vertreter in den folgenden Unterteilungen aufgeführt sind:

➤ Anti-oxidative Enzyme:

Zu dieser Gruppe gehören die Superoxiddismutasen (SOD), die nach ihrem zentralen Metallanteil in Kupfer/Zink- (Cu/ZnSOD), Mangan- (MnSOD) und Eisensuperoxiddismutasen (FeSOD) aufgeteilt und Spezies-, Gewebe- sowie Zellorganellspezifisch verteilt sind⁵⁶. Alle Varianten der SOD katalysieren die Dismutation von Superoxid nach der folgenden Reaktionsgleichung 3:



Ebenso gehören die Eisen enthaltene Katalase, sowie die Gluthathion- und Thioredoxinperoxidasen zu dieser Gruppe der anti-oxidativen Enzyme. Diese katalysieren die Umsetzung von Wasserstoffperoxid in eine Dismutation zu Wasser und Sauerstoff direkt (Katalase) oder sie reduzieren Wasserstoffperoxid indirekt zu zwei Wasser-Molekülen durch Oxidation der Moleküle Gluthathion bzw. Thioredoxin. Die beiden letztgenannten werden durch NADPH wieder reduziert und der Zyklus der Wasserstoffperoxid-Reduktion dadurch komplettiert.

➤ Antioxidantien

Im weitesten Sinne sind Antioxidantien Verbindungen, die in der Lage sind die Produktion von ROS einzuschränken bzw. die schädlichen Folgen der Reaktion von ROS zu verringern. Dieser Zellschutz geschieht auf der Basis der Elektronenabgabe und „Neutralisierung“ der ROS, wobei die Antioxidantien dabei selbst zu organischen Radikalen werden und Schäden verursachen können⁵⁷. Beispiele sind die durch die Nahrung zugeführten Vitamine C und E oder sekundäre Pflanzenstoffe wie β -Carotin oder Lycopin.

Zusammengefasst werden die anti-oxidativen Mechanismen durch Abbildung 6, welche die beteiligten Enzyme und Antioxidantien, die an der Erzeugung sowie dem Abbau der ROS beteiligt sind, darstellt.

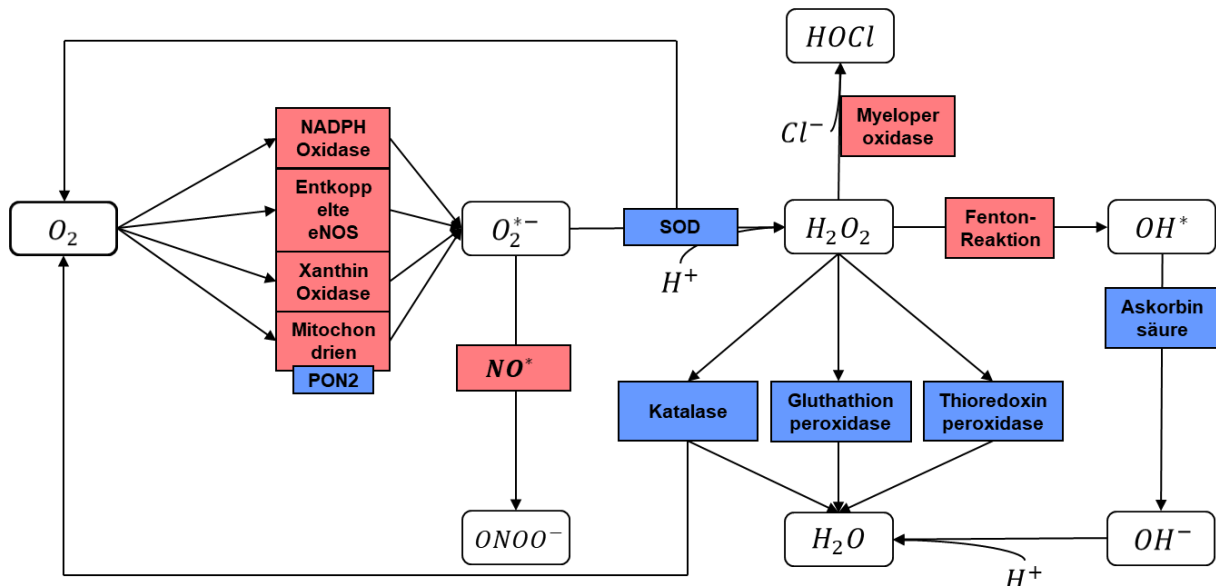


Abbildung 6: Übersicht der Erzeugung und des Abbaus von reaktiven Sauerstoffspezies. Pro-oxidative Systeme (rot) und anti-oxidative Systeme (blau).

1.4 Das zellbasierte hämostatische System

Das hämostatische System umfasst die Summe aller physiologischen Reaktionen, die den Stillstand einer Blutung herbeiführen und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Gerinnung und der Fließfähigkeit des Blutes aufrechterhalten^{58;59}. Dabei dient die primäre und sekundäre Hämostase, wie sie auch in den nachfolgenden Abschnitten 1.4.2 und 1.4.3 vorgenommen wird, nur dem besseren Verständnis, *in vivo* laufen beide Phasen zur gleichen Zeit ab und stehen in enger Verknüpfung zueinander^{60;61}. Dies wird im zellbasierten Modell der Hämostase verdeutlicht⁶², welches mit seiner Einteilung die zentrale Bedeutung der zellulären Kontrolle der plasmatischen Gerinnungsreaktion herausstellt (Abbildung 7).

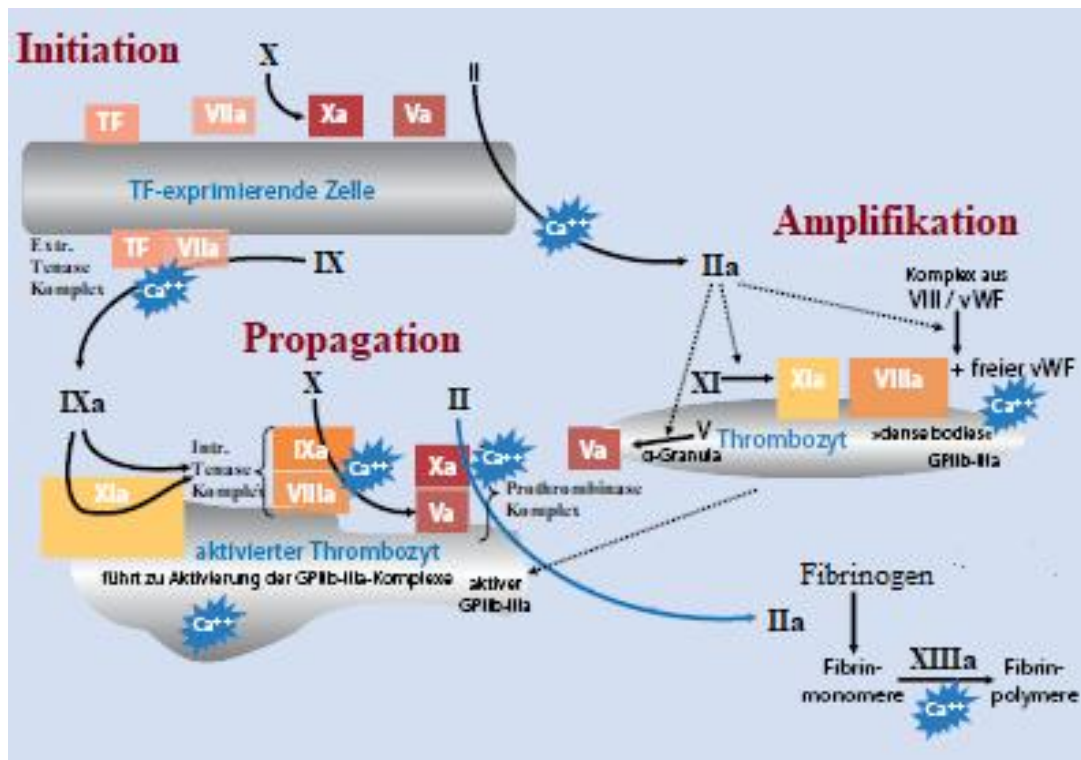


Abbildung 7: Model der zellbasierten Gerinnung. TF Tissue Factor, Gewebefaktor; Ca⁺⁺ ionisiertes Kalzium (= Faktor IV); GP Glykoprotein (Oberflächenrezeptor auf Thrombozyten). Abbildung übernommen und modifiziert nach Hoffmann⁶².

Die Initiation der Gerinnung findet auf der Oberfläche von Gewebefaktor- (engl. *Tissue Factor*; TF) exprimierenden Zellen durch den extrinsischen Tenase/TF-VIIa-Komplex statt. Dazu spaltet er die Serinprotease (FIX) zu FIXa, die im weiteren Verlauf gebraucht wird. Ebenso katalysiert es die Aktivierung von FX zu FXa (Tenase), was zum einen zur initialen Bildung von geringen Mengen an Thrombin (FIIa) führt, zum anderen die Ausbildung des Prothrombinase-Komplexes (FXa-FVa-FII Komplexes) auf der Zelloberfläche ermöglicht.

Dass aus der Initiationsphase in geringen Mengen gebildete Thrombin fördert während der Amplifikationsphase die Aktivierung der Thrombozyten und aktiviert zusätzlich die weiteren Faktoren FV, FVIII und FXI. In der letzten Phase, der Propagationsphase kommt es durch die Thrombin-vermittelte Aktivierung des Faktors VIII zusammen mit dem initial gebildeten aktivierten Faktor IX zur Ausbildung eines intrinsischen Tenasekomplexes, der wiederum FX aktiviert, so dass sich eine selbst verstärkende Schleife bildet. Folglich kommt es in großem Maße zur Ausbildung von Tenase- und Prothrombinase-Komplexen auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten, was zum sog. *thrombin burst*, also einer massiven Generierung von Thrombin führt⁶².

1.4.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten werden im Knochenmark aus ihren Vorläuferzellen den Megakaryozyten durch Abschnürung aus dem Zytoplasma gebildet und besitzen im Gegensatz zu verschiedenen anderen Blutzellen keinen Zellkern, weswegen die Thrombozyten nur aus den mRNA-Resten ihrer Vorläuferzellen eingeschränkt neue Proteine synthetisieren können. Auf Grund dessen entstehen spezifische Proteine, Zellorganelle sowie das Membransystem bereits während des Reifungsprozesses der Megakaryozyten und werden nicht in den Thrombozyten gebildet^{60;61}.

Bei einem gesunden Menschen besitzen die Thrombozyten einen Durchmesser von 2-4 µm, was einem mittleren Thrombozytenvolumen (engl. *mean platelet volume*, MPV) von 9 – 15 fl entspricht und liegen mit einer Anzahl zwischen 150000 bis 400000 pro µl Vollblut vor^{60;61}. Murine Thrombozyten haben im Gegensatz zu humanen ein kleineres mittleres Thrombozytenvolumen von 4,7 fl, dafür liegen sie mit einer erhöhten Anzahl an Thrombozyten von durchschnittlich 1100000 pro µl Vollblut im Kreislaufsystem vor⁶³. Die durchschnittliche Lebensdauer von Thrombozyten beträgt 7-12 Tage mit einer täglichen Erneuerungsrate von 20 % der Gesamtthrombozytenanzahl, bevor sie vom System als gealtert erkannt und im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut werden^{60;61}.

Im nichtaktivierten, ruhenden Zustand weisen Thrombozyten eine typische flache, scheibenartige (diskoide) Form auf, die sich bei Aktivierung mit Thrombozytenagonisten oder durch Adhäsion der Thrombozyten an die Zellwand zu einem kugelförmigen Zustand mit Ausbildung von Pseudopodien verändert⁶⁰.

Die Ultrastruktur ist bei Thrombozyten komplex und wird in vier morphologische Bereiche unterteilt, die im nachfolgenden Abschnitt einzeln näher erläutert werden:

➤ Die periphere Zone

Diese wird von der Zytoplasmamembran gebildet, die extrazellulär mit einer dünnen Schicht belegt ist und aus einer polarisierten Phospholipiddoppelschicht besteht, in der die verschiedensten Glykoproteine, Proteine und Mukopolysachharide eingelagert sind, welche die sog. Glykokalyx bilden. Außerdem befinden sich Bereiche in der peripheren Zone, die eine hohe Konzentration an Sphingolipiden und Cholesterin aufweisen und unter *lipid rafts* zusammengefasst werden. In diesen Bereichen befinden sich vermehrt in die Membran integrierte Proteine, die Rezeptoren für lösliche Agonisten oder Adhäsionsproteine sind⁶⁰.

➤ Die strukturelle Zone

Direkt unter der Zytoplasmamembran befindet sich die strukturelle Zone, die aus submembranös gelegenen Mikrotubuli, Aktinfilamenten und anderen Strukturproteinen zusammengesetzt ist. Diese Komponenten sind für das Zytoskelett und damit für die Aufrechterhaltung der typischen diskoiden Form der Thrombozyten zuständig, sie beteiligen sich aber auch aktiv am Gestaltwandel und der Ausbildung der Pseudopodien⁶⁴.

➤ Die Zone der Organellen

Dieser morphologische Bereich der Thrombozyten befindet sich im Zytoplasma und setzt sich vor allem aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und den drei verschiedenen Formen von Speichergranula (dichte Granula, α -Granula und Lysosomen) zusammen. Dabei sind die Speichergranula charakteristisch für Thrombozyten und dienen als Speicherorte für Proteine und andere Substanzen, die essentielle Aufgaben in den Thrombozytenfunktionen besitzen⁶⁰.

➤ Membransystem

Thrombozyten besitzen zusätzlich zur Zytoplasmamembran ein aus zwei Komponenten zusammengesetztes Membransystem: Zum einen das offene, kanalikuläre System, welches mit der Zytoplasmamembran verbunden und an der Sekretion und Endozytose beteiligt ist⁶⁵, zum anderen das dichte tubuläre System in dem sich der Hauptspeicherort für Ca^{2+} -Ionen befindet⁶⁰.

Schematisch zusammenfassend zeigt dies die nachfolgende Abbildung 8.

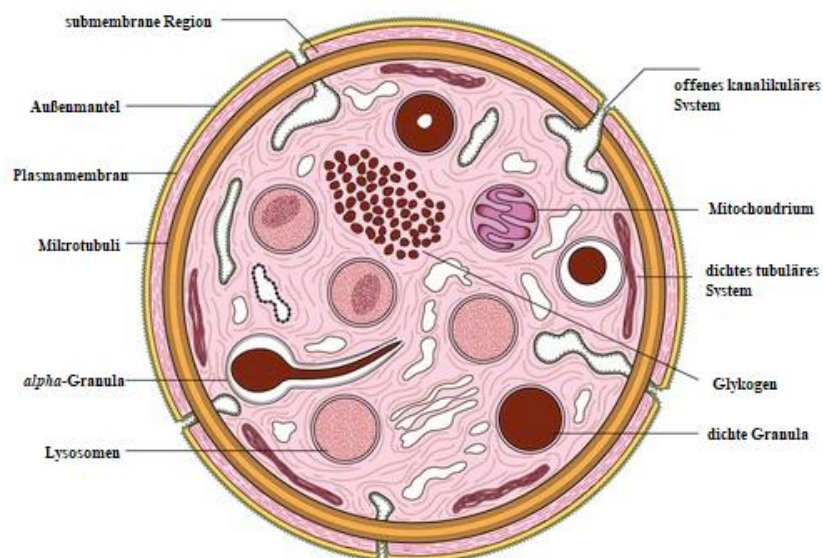


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines ruhenden Thrombozyten. Abbildung übernommen und modifiziert aus Clinicalgate⁶⁶.

Dies führt zu einer festeren Bindung der Thrombozyten an die subendothelialen Matrixproteine, sowie einer Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten durch die Bindung von plasmatischem Fibrinogen (Aggregation). Zusätzlich kommt es bedingt durch die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Formveränderung mit der Bildung von Pseudopodien. Dies ermöglicht eine Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten, wodurch die Läsion besser abgedeckt werden kann^{60;68;69;70}.

Die Aktivierung der Thrombozyten führt des Weiteren durch Exozytose bedingt zur Freisetzung verschiedener autokriner und parakriner Faktoren und Agonisten aus der α -Granula der Thrombozyten, während die Membranrezeptoren der α -Granula durch Verschmelzung der Plasmamembran und der Granulamembran auf die Thrombozytenoberfläche transloziert werden^{68;69}. Außer den α -Granula enthalten auch die Elektronendichten Granula (δ -Granula) weitere prothrombotische Agonisten und Faktoren, wie Ca^{2+} oder ADP, die bei der Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt und zur Aktivierung weiterer Thrombozyten beitragen⁶⁰.

Bedingt durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zudem zur Ausbildung der sog. prokoagulanten, negativ geladenen Oberfläche der Thrombozyten, die sich durch die Präsentation der anionischen Phospholipide, wie z. B. Phosphatidylserin (PS) auf der Thrombozytenoberfläche auszeichnet.

Diese stammen von der Zytoplasmaseite der Thrombozyten und werden durch Thrombin- und Kollagen vermittelte Aktivierung der Thrombozyten infolge eines Membran Flip-Flop in intakten Thrombozyten von innen nach außen transloziert^{68;69;71}.

Diese molekularen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation münden schließlich in der Ausbildung eines primären Thrombus.

1.4.3 Thrombozytenfunktion in der sekundären Hämostase

Der zweite, parallel zur Bildung eines primären Thrombus ablaufende Prozess, aktiviert die Gerinnungskaskade, sowie die Produktion von Thrombin und Fibrin in der Umgebung des Thrombozytenaggregates zur Absicherung des primären Thrombus und zur effizienten Blutstillung. Diese sekundäre Hämostase wird nochmals in zwei voneinander unabhängige Signalkaskaden unterteilt, den extrinsischen (exogenen) und dem intrinsischen (endogenen) Weg, die gemeinsam in einer Endphase münden⁶¹.

➤ Extrinsisches System

Die Aktivierung des extrinsischen Systems erfolgt primär durch die Freisetzung des transmembranen Gewebefaktor (engl. *Tissue Factor*; TF) in Folge einer Verletzung des Gewebes. Daraufhin kommt es unter Mitwirkung von Ca^{2+} -Ionen zur Aktivierung der Gerinnungsfaktoren VII, X und V, wobei Faktor V und X an der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin beteiligt sind. Dieser kurze und dadurch schnelle Signalweg spielt hauptsächlich zu Beginn der Hämostase sowie bei akuten thrombotischen Mechanismen im Bereich atherosklerotisch veränderter Gefäße eine Rolle^{60;61}.

➤ Intrinsisches System

Im Gegensatz zum extrinsischen System, als primärer Initiator des Gerinnungsprozesses, dient das intrinsische System maßgeblich zur Amplifikation der Thrombinbildung. Dafür benötigt es mehr Zeit, indem es durch die Vielzahl der dabei aktivierten Faktoren das Signal amplifiziert und über eine positive Feedbackschleife kontrolliert. Eingeleitet wird das intrinsische System über die Kontaktbindung von Faktor XII und der plasmatischen Serinprotease Präkallikrein an negativ geladene Oberflächen des Subendothels und aktivierter Thrombozyten. In Folge der Aktivierung des Faktor XII werden weitere Faktoren wie z.B. Faktor XI und Faktor IX kaskadenartig aktiviert. Dies endet ebenfalls in der Aktivierung vom gemeinsamen Faktor X und somit in der Spaltung von Prothrombin zu Thrombin^{60;61}.

1.4.4 Thrombozytenaktivierung und ROS

Die zirkulierenden Thrombozyten des Blutes befinden sich in einem ruhenden Zustand, deren notwendige Energie über die Glykolyse oder die oxidative Phosphorylierung erfolgt, die beide in Thrombozyten hoch aktiv sind⁷². Dabei nutzen Thrombozyten zur Gewinnung von ATP hauptsächlich den weniger effektiven Prozess der Glykolyse und sorgen damit für eine Limitierung der dabei unerwünschten ROS⁷³. In Folge dessen ist der Gehalt an ROS in Thrombozyten niedrig, was die Thrombozyten sensitiv auf Veränderungen des ROS-Gehaltes reagieren lässt.

Während der Aktivierung erzeugen die Thrombozyten ROS durch mehrere enzymatische Quellen wie z.B. die NOX2, die Xanthin-Oxidase oder die entkoppelte eNOS⁷⁴. Spezifisch die aus NOX2 erzeugten ROS sind dabei teilweise an der wichtigen Aktivierung des Fibrinogenrezeptors α IIb β 3 Integrin beteiligt⁷⁵, während ansonsten die von den Thrombozyten selbst gebildeten ROS als Sekundärsignale wirken und zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten durch Ca^{2+} -Mobilisierung, durch Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) und durch Interaktion mit der Arachidonsäure zur Bildung von Isoprostanen beitragen⁷⁶. Insbesondere die erhöhte Konzentration von Isoprostanen sind mit systemischer und lokaler Thrombozytenaktivierung assoziiert^{77;78}. Im Zusammenhang gesehen nimmt die Bildung von ROS in den Thrombozyten somit eine regulierenden Rolle bei der Entstehung eines Thrombus ein⁷⁹.

1.4.5 Rolle der Thrombozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen

Bereits im Abschnitt 1.4.2 wurde die zentrale Rolle der Thrombozyten in der Hämostase erläutert, die im Normalfall ein Schutzmechanismus des Körpers darstellt. Gerät dieses System zugunsten von pro-koagulatorischen Prozessen aus dem Gleichgewicht, kommt es zur erhöhten Ausbildung intravasaler Thromben, die in arteriellen und venösen Blutgefäßen auftreten können.

Die Entstehung der venösen Thrombose folgt dabei der Virchow'schen Trias, die als Ursache eine Veränderung der Endothelzellschicht, eine Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, sowie eine Veränderung der Viskosität des Blutes nennt⁸⁰. Im Gegensatz dazu werden arterielle Thromben meistens von atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand hervorgerufen⁸¹.

Der dabei gebildete Thrombus kann in Abhängigkeit seiner Lage in Gefäßverschlüssen oder in Form von Embolie in peripheren Gefäßregionen lebensgefährlich werden. Während Thromben in venösen Gefäßen meistens eine Lungenembolie verursachen, kann eine arterielle Thrombose zum Myokardinfarkt oder Apoplex führen.

In vorherigen Abschnitten dieser Dissertation wurden sowohl für PON2 (s. 1.1.1) als auch für NOX2 (s. 1.2.1) die Rolle in der Atherothrombose beschrieben, was den Zusammenhang zwischen Atherothrombose und Hämostase im Rahmen dieser Arbeit relevant macht. Neuere Daten zeigen, dass die Hämostase nicht nur für die Atherothrombose durch die Form einer Ruptur von arteriosklerotischen Plaques wichtig ist, sondern dass sie ebenfalls die Entstehung und Progression der Atherosklerose fördert. Dabei wies man in der frühen Phase und in der fortgeschrittenen, stabilen Phase der Atherosklerose eine Vielzahl an Gerinnungsproteinen in der veränderten Gefäßwand nach, die eine veränderte Aktivität in Abhängigkeit der Entwicklung der arteriosklerotischen Läsion aufzeigten^{82;83}. Das Thrombin nimmt dabei eine wichtige Rolle in der Atherogenese ein, indem es über PAR's (engl. *protease-activated receptor*) auf den Endothelzellen, den Thrombozyten und vaskulären, glatten Muskelzellen pro-atherogene Prozesse und pro-inflammatorische Signale induziert^{84;85}. Ebenso löst TF im Gefäß, der gemeinsam im Komplex mit FVIIa und FXa für die Thrombingenerierung verantwortlich ist und pro-inflammatorische Signalfunktionen ausübt, ähnliche pro-atherogene Prozesse aus⁸⁶. In Bezug zu PON2 wurde dazu kürzlich nachgewiesen, dass es durch einen Redox-abhängigen Mechanismus die endotheliale TF-Aktivität reguliert und dabei die systemische Aktivierung der Koagulation sowie Inflammation verhindert⁸⁷.

2 Zielsetzung

Das Schlüsselereignis der Hämostase ist die Aktivierung und Rekrutierung der Thrombozyten an das geschädigte bzw. aktivierte Gefäßendothel. Dabei führt oxidativer Stress der Zelle durch Überproduktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen zu einem pro-thrombotischen Zustand und begünstigt damit die Atherothrombose. Verschiedene Studien zeigten auf, dass PON2 als auch NOX2 durch ihren anti-oxidativen bzw. pro-oxidativen Charakter maßgeblich zu einem verringerten bzw. erhöhten Risiko für Arteriosklerose beitragen. Gleichsam konnte in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden, dass die Defizienz von PON2 zu einer beschleunigten sekundären Hämostase führt, die auf der TF-abhängigen endothelialen Dysfunktion beruht. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die bisher unbekannte Rolle der PON2 sowie die bislang wenig untersuchte Rolle der NOX2 in der Thrombozyten-vermittelten Hämostase zu untersuchen. Dazu sollte in einem ersten Ansatz die bislang unbekannte Lokalisation von PON2 in Thrombozyten durch Anwendung von mikroskopischen Methoden aufgeklärt werden. Da aus vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe hervorging, dass PON2 in verschiedenen Geweben anti-oxidativ und NOX2 pro-oxidativ wirkt, sollte dies *ex vivo* basal und *in vitro* nach Aktivierung durch Fluoreszenz-basierte Methoden im Vergleich zum WT überprüft werden. Weil ROS mit einem Einfluss auf die Thrombozytenaktivität assoziiert sind, sollte außerdem die Defizienz von PON2 und NOX2 auf das thrombozytäre Rezeptor-Expressionsprofil, auf Aktivierungsmarker der Thrombozytenoberfläche, die Aggregation der Thrombozyten sowie der Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Ca^{2+} -Mobilisation untersucht werden. Darüber hinaus galt es die Endothelzell-Thrombozyten-Interaktion auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse auf die physiologische Situation durch zwei experimentelle Ansätze zu übertragen. Dazu sollte zum einen ein *in vitro* Modell in der Flusskammer für die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen sowie an eine Kollagen-beschichtete Oberfläche entwickelt werden, um im weiteren Verlauf experimentelle Untersuchungen für PON2 und NOX2 im Vergleich zum WT reziprok und nicht-reziprok durchführen zu können. Ebenso sollte zum anderen mit Hilfe von zwei *in vivo*, murinen Thrombosemodellen (arterielles FeCl_3 -Modell und venöses Ligaturmodell) der Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Bildung eines Thrombus beschrieben werden.

Perspektivisch sollten die aus dieser Arbeit hervorgehenden Erkenntnisse dabei helfen die Rolle der PON2 und NOX2 in kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen weiter aufzuklären und die Thrombozyten als zukünftiges Ziel möglicher neuer Therapieansätze aufzuzeigen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acridin Orange MW 302	Merck
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma Aldrich
Agarose	Eurogentec
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma Aldrich
Ampuwa RNase freies Wasser	Fresenius Kabo
Antibiotikum/Antimykotikum, 100x, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Fungizone® Antimykotikum (AA)	Gibco
Augen und Nasensalbe	La Roche
Bothroctin aus <i>Bothrops jararaca</i>	Sigma Aldrich
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA, Albumin Fraktion V)	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Calcein-AM	Invitrogen
Calcium Ionophore	Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
CM-H ₂ DCFDA	Molecular Probes
<i>Collagen I Rat Protein, Tail</i>	Gibco
Convulxin aus <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Enzo Life Sciences
Dihydrorhodamine123	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
D-Phenylalanyl-prolyl-arginyl-chloromethyl-keton (PPACK)	Merck
DRAQ5™	Biostatus
Eisen-III-Chlorid, FeCl ₃ #F7134	Sigma Aldrich
Ethanol Rotipuran®	Roth
Ethanol, vergällt	Roth
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Fentanyl	Janssen-Cilag
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma Aldrich
Fragmin® P Forte 5.000	Pfizer
Glycerin, 99%	Roth
Glycin	Roth
H-GLY-PRO-ARG-PRO-OH (GPRP)	Bachem
Humanes Fibronectin 5 mg	BD
Ilomedin® 20 µg/ml (Iloprost)	Bayer Vital
Isofluran	Abbvie
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun
JC-1 Mitochondrien Membran Potenzial Farbstoff	eBiosciences
Lectin (<i>Bandeiraea simplicifolia</i>)-FITC	Sigma Aldrich

Material

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Medetomidin	Zoetis
Mepacrine dihydrochloride	Sigma Aldrich
Methanol	Roth
Midazolam	Hameln
Milchpulver	Roth
MitoTracker®Orange CM-H ₂ TMRos	Molecular Probes
Natriumcitratlösung (3,13 %)	Eifelfango
Penicillin/Streptomycin, 100x, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/mL Streptomycin (PenStrep, PS)	Gibco
Pentobarbital	Serva
R3 aus PTL VASP/P ₂ Y ₁₂ -Kit	Biocytex
R4a aus PTL VASP/P ₂ Y ₁₂ -Kit	Biocytex
Rhodamine B Isothiocyanat #R1755	Sigma Aldrich
Roti®-GelStain	Roth
Rotiphorese®Gel 30	Roth
Sepharose™ CL-2B	VWR
SNARF™-4	Molecular Probes
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Thrombin aus <i>bovine plasma</i>	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Trypanblau	Merck
Tween® 20	Roth

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
<i>Adhesive Clear PCR Seal, Sheet</i>	Biozym
Bioflux™ 1000 48-well Plate, High Shear, 200 Dyn/cm ²	Fluxion Biosciences
Bioflux™ 1000 48-well Plate, low shear, 20 Dyn/cm ²	Fluxion Biosciences
Cellstar® 6 well Platten;	Greiner Bio-One
Deckgläser, 24x 50 mm	Menzel-Gläser
Discardit® Einmalspritzen 10 ml; 20 ml	BD
EASYstrainer™ Zellsieb 100 µm	Greiner Bio-One
FACS-Röhrchen	Hartenstein/BD
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Injekt® Feindosierungsspritzen 2 ml	Braun
Klebeband, Leukofix, transparent	BSN medical
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit
MACS® LS Columns	Miltenyi Biotec
Microlance™ Kanülen G 26 x 1/2" (ø 0,45 x 13 mm)	BD
Microvette® 500 K3E	Sarstedt
Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Filter	Thermo Fisher
Omnifix®-F Feindosierungsspritzen 1ml	Braun
Pasteurpipetten	Roth
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfer Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One
Sapphire Microplatte, 96 well,	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml), steril	Greiner Bio-One
Sterican® Standardkanülen Gr. 18 G 26 x 1" (ø 0,45 x 25 mm)	Braun
Superfrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser
Vasofix® Safety Sicherheitsvenenverweilkatheter 2 " (ø 2,2 x 50 mm)	Braun
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturschale ø35 x 10 mm (LSM-Kammer)	Greiner Bio-One

3.3 Laborgeräte

Tabelle 4: Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
BioFlux™ 1000 System mit Zeiss AxioObserver Z1 Inverses Mikroskop	Fluxion Biosciences/Zeiss
BioRad CFX <i>Connect Real-Time System</i>	BioRad
CFX <i>Connect™ Real-Time PCR Detection System</i>	BioRad
ChemiDoc XRS Imaging System	BioRad
CO ₂ -Inkubator CO-150	New Brunswick Scientific
FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences
FluoStar Optima	BMG Labtech
Folienschweißgerät	Severin
Gelelektrophorese System Owl™ B2	Thermo Fisher
MACS™ <i>MultiStand</i>	Miltenyi Biotec
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
MyCycler™ <i>Thermal Cycler</i>	BioRad
ND-2000 <i>Spectrophotometer Nano Drop</i>	Thermo Fisher
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
Olympus BX51WI Intravitalmikroskop	Olympus
Olympus IX 70 Lichtmikroskop	Olympus
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L	Peglab
Präparierbesteck	FST
PT 1200 Präzisionswaage	Sartorius
Semidry-Blotsystem	BioRad
Sysmex KX-21N™ <i>Automated Hematology Analyzer</i>	Sysmex
Sysmex KX-21N™ <i>Automated Hematology Analyzer</i>	Sysmex
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GSL
Zeiss LSM-710	Zeiss
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

3.4 Software

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller
Bioflux™ Montage Software Version 7.7.4	Fluxion Biosciences
Bio-Rad CFX Manager 3.1	BioRad
Cell ^F	Olympus
FACSDiva Software Version 6.1.3	BD Biosciences
GraphPad Prism 5.02	GraphPad
Quantity One 4.6.7	BioRad
Xcellence Real-Time Imaging	Olympus
ZEN 2009	Zeiss
ZEN 2011	Zeiss

3.5 Enzyme, Standards und Kits

Tabelle 6: Enzyme, Standards und Kits

Enzym/Protein/Peptid/Standard/Kit	Hersteller
Accutase-Lösung	Sigma Aldrich
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Blue Protein Standard Broad Range	BioLabs
Collagenase I	Gibco
Dispase®	Gibco
dNTP-Mix	Peqlab
EDTA Solution, 100x	Thermo Scientific
GoTaq Polymerase Puffer (5x)	Promega
Halt™ Protease <i>Inhibitor Cocktail</i> , 100x	Thermo Scientific
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Precision™ 2x qPCR Mastermix mit SYBR Green	Primerdesign
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer
Apyrase aus <i>potatoes</i>	Sigma Aldrich

3.6 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 7: Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösungen/Medien	Zusammensetzung/Hersteller
Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% Methanol
D-Glucose Lösung	45% D-Glucose in H ₂ O /Sigma
DNA-Ladepuffer, 6x	30 % Glycerin in H ₂ O, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> + GlutaMax™ (DMEM)	Gibco
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS), 1x, steril, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Sigma Aldrich
<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> (EC-Medium)	PromoCell
<i>Endothelial Cell Growth Medium Supplement Pack</i>	PromoCell
<i>Erythrocyte Lysis Buffer</i> (Erylyse-Puffer)	Qiagen
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40mM DL-Norleucin, 0,05% SDS
MACS-Puffer	PBS (pH 7,2) 0,5% BSA 2 mM EDTA
Natrium-Pyruvat Lösung	100 mM Natrium-Pyruvat in Wasser /Sigma
SDS-Ladepuffer, 5x	250 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5 M Dithiothreitol, 40% Glycerin, 10% SDS, 0,2 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer, 5x	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
<i>Staining-Puffer</i>	Tyrode (pH 7,4) 10 mM CaCl ₂ 10 U/ml Fragmin®
TAE, 20x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0,18
TAE-Puffer, pH 8,0	40 mM TRIS 2 mM Na ₂ EDTA · 2H ₂ O 1,142 % Essigsäure
TBS, 20x	200 mM Tris pH 7,6, 2 M NaCl
TBS/Tween	1x TBS, 0,18 % Tween
Tyrode, pH 7,4	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ 12 mM NaHCO ₃ 5,5 mM Glucose 5 mM HEPES

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

Tabelle 8: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Bovine milk</i> Lactadherin-FITC	Haematologic Technologies
<i>E.coli</i> anti-human Annexin-V-FITC	Thermo Fisher
<i>Hamster</i> anti-rat CD49b-FITC	BD Biosciences
<i>Rabbit</i> anti-mouse GAPDH	SantaCruz
<i>Rabbit</i> anti-mouse PON2	GenScript
<i>Rabbit</i> anti-vWF	emfret
<i>Rat</i> anti-mouse CD326 (EpCAM) MicroBeads	Miltenyi Biotec
<i>Rat</i> anti-mouse CD41-FITC	BD Biosciences
<i>Rat</i> anti-mouse CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec
<i>Rat</i> anti-mouse CD49f	Miltenyi Biotec
<i>Rat</i> anti-mouse CD62E-APC	Novus Biologicals
<i>Rat</i> anti-mouse CD90.2 MicroBeads	Miltenyi Biotec
<i>Rat</i> anti-mouse GPIba	emfret
<i>Rat</i> anti-mouse GPIba-DyLight488	emfret
<i>Rat</i> anti-mouse GPVI-FITC	emfret
<i>Rat</i> anti-mouse Integrin α IIb β ₃ -PE	emfret
<i>Rat</i> anti-mouse P-selectin-FITC	emfret

3.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Goat</i> anti-rabbit HRP	Sigma Aldrich
<i>Goat</i> anti-rabbit-Cy3	Abcam
<i>Goat</i> anti-rat HRP	SantaCruz
<i>Rabbit</i> anti-mouse HRP	Sigma Aldrich

3.8 Oligonukleotide

Tabelle 10: Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Hersteller
Mu_18s_for	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	Sigma Aldrich
Mu_18s_rev	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	Sigma Aldrich
Mu_ICAM2_5P1	GAC GGT CTC AAC TTT TCC TGC C	Sigma Aldrich
Mu_ICAM2_3P1	CCA TTT GGT TGT CCT GCA TCG G	Sigma Aldrich
Mu_EPCAM 5P1	GAG TCC GAA GAA CCG ACA AGG A	Sigma Aldrich
Mu_EPCAM 3P1	GAT GTG AAC GCC TCT TGA AGC G	Sigma Aldrich
Mu_CD45_5P1	CTT CAG TGG TCC CAT TGT GGT G	Sigma Aldrich
Mu_CD45_3P1	TCA GAC ACC TCT GTC GCC TTA G	Sigma Aldrich
Mu_CD90_5P1	CCT TAC CCT AGC CAA CTT CAC C	Sigma Aldrich
Mu_CD90_3P1	TTA TGC CGC CAC ACT TGA CCA G	Sigma Aldrich
Mu_PON2_5P1	GCA GCC TCCT GAA TCA AAT C	Eurofins Genomics
Mu_PON2_3P1	TCG TGT ATG ACC CGA ACA ATC C	Eurofins Genomics
Mu_LacZ_5P1	GCA GCC TCC TGA ATC AAA TC	Eurofins Genomics
Mu_LacZ_3P1	ACT GGC AGA TGC ACG GTT ACG	Eurofins Genomics
oIMR0517	AAG AGA AAC TCC TCT GCT GTG AA	Sigma Aldrich
oIMR0518	CGC ACT GGA ACC CCT GAG AAA GG	Sigma Aldrich
oIMR0519	GTT CTA ATT CCA TCA GAA GCT TAT CG	Sigma Aldrich

3.9 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden gemäß §4 Abs. 1 und §7 Abs. 2 Nr. 2 oder §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes eingesetzt. Sofern nicht anders in dieser Dissertation angegeben, waren die Versuchstiere männlich und zwischen 11-13 Wochen alt. Die in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle sind in der nachfolgenden Tabelle 11 zusammenfassend aufgelistet und beschrieben.

Tabelle 11: Versuchstiere

Mausmodell	Beschreibung	Quelle
C57BL/6J	Inzuchtstamm	<i>Translational Animal Research Center (TARC)</i> der Johannes Gutenberg-Universität
B6;129P2- PON2 ^{Gt(XE661)Ucla} PON2 ^{-/-}	Inzuchtstamm; PON2- <i>knockout</i> durch Insertion einer floxP-flankierten β -geo Expressionskassette im zweiten Intron des murinen PON2-Gens	Von Prof. Dr. S. T. Reddy, Department of Medicine / Department of Molecular and Medical Pharmacology, University of California, Los Angeles, USA. In TARC importiert durch Prof. Dr. B. Fuhrmann, Technion Faculty of Medicine / Rambam Medical Center, Haifa, Israel.
B6;129P2- PON2 ^{Gt(XE661)Ucla} PON2 ^{-/-} +NAC	Inzuchtstamm; PON2- <i>knockout</i> durch Insertion einer floxP-flankierten β -geo Expressionskassette im zweiten Intron des murinen PON2-Gens Dauerhafte Behandlung mit 10 mg/ml N-Acetyl-Cystein oral Genehmigung: 23 177-07/G13-1-055	Von Prof. Dr. S. T. Reddy, Department of Medicine / Department of Molecular and Medical Pharmacology, University of California, Los Angeles, USA. In TARC importiert durch Prof. Dr. B. Fuhrmann, Technion Faculty of Medicine / Rambam Medical Center, Haifa, Israel.
B6.129S- Cybb ^{tm1Din/J} NOX2 ^{-/-}	Inzuchtstamm; NOX2- <i>knockout</i> durch Ersatz des Exon 3 des gp91-Gens durch eine Neomycin-Resistenzkassette	Stammnummer: 002365; Jackson Laboratory, USA. Bereitgestellt durch Prof. Wenzel und Prof. Münzel, CTH Mainz

Die Wildtyp (WT) C57BL/6J Mäuse wurden durch das *Translational Animal Research Center (TARC)* der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von den Züchtern Charles River oder Envigo (früher Harlan) erhalten.

Zur Generierung des PON2^{-/-}-Mausmodells wurde eine β -Galaktosidase/Neomycin Fusionskassette (β -geo) im zweiten Intron des murinen PON2-Gens nach 9995 Basenpaaren nach dem Translationsstartpunkt durch einen *gene-trap* Vector integriert⁸⁸. Dieser Vector bewirkt eine Fusion der β -geo Kassette mit dem Transkript der ersten zwei PON2 Exone (Abbildung 10), sodass ein mutiertes funktionsloses PON2 Protein entsteht.

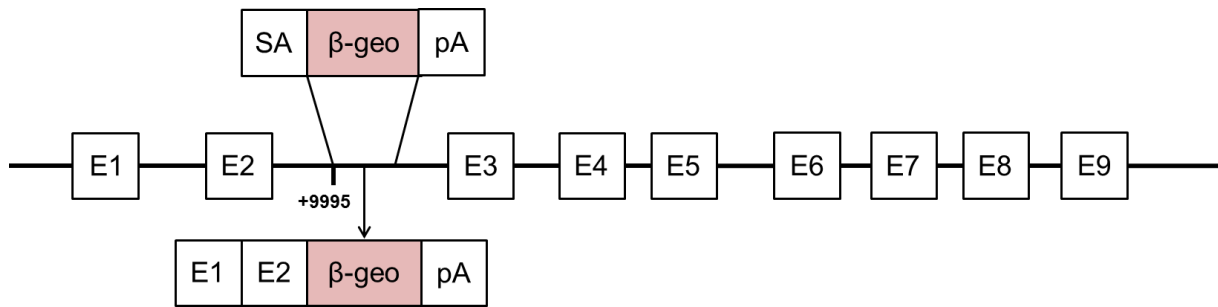


Abbildung 10: Schematische Darstellung des β -geo gene-trap Vectors im PON2-Lokus des PON2^{-/-}-Modells. Nach 9995 Basenpaaren hinter dem zweiten Intron wurde ein gene-trap Vector eingebracht, der eine Splice-Akzeptor-Stelle (SA), gefolgt von einer β -Galaktosidase/Neomycin Genkassette (β -geo) und eine poly-Adenin-Nukleotid-Sequenz (pA) trägt. SA vermittelt die Fusion der transkribierten Vektorsequenz mit der Splice-Donor-Stelle des gespleißten Transkripts von Exon 1 (E1) und Exon 2 (E2), so dass ein verkürztes Genprodukt entsteht.

Für die Generierung des NOX2^{-/-}-Mausmodells wurde durch eine Target Mutation ein Neomycingresistenzgen in das Exon 3 des gp91phox-gens inseriert. Dieses bewirkt einen vollständigen Knockout (s. Abbildung 11). Der Nachweis erfolgte über eine Western-Blot-Analyse an Extrakten von neutrophilenreichen, peritonealen Exsudatzellen von hemizygoten männlichen Mäusen, bei denen kein nachweisbares Protein exprimiert wurde⁸⁹.

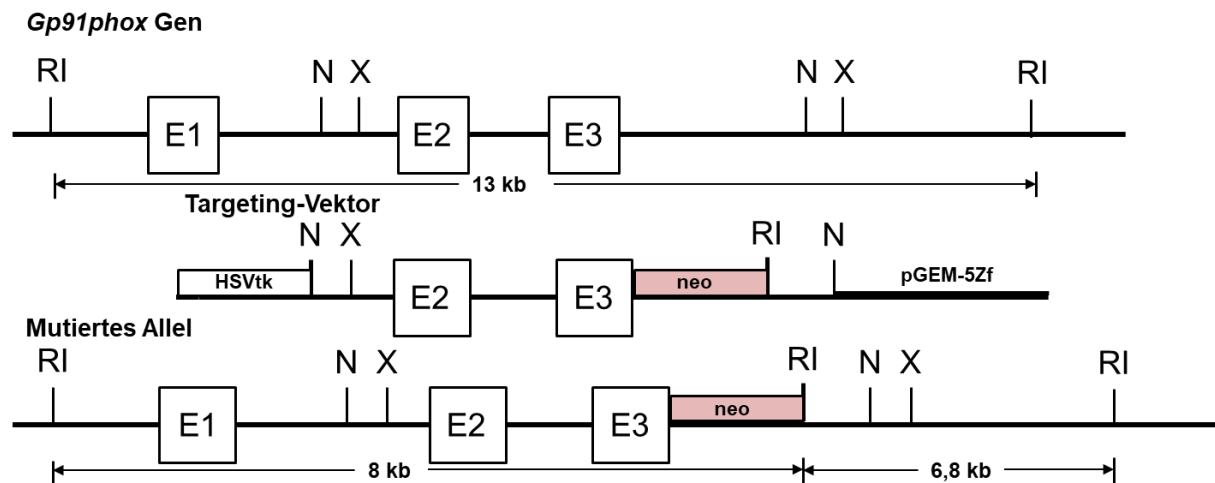


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Gene Targeting des murinen gp91phox Gens. Struktur des murinen gp91phox Gens, Targeting-Vektors und des mutierten Allels generiert durch die homologe Rekombination. Die Exone sind nummeriert und eine partielle Restriktionskarte wird angezeigt (RI, EcoRI; X, XbaI; N, NcoI). Der Targeting-Vektor enthält ein neo-Gen unter der Kontrolle des PGK Promotors, inseriert in das dritte Exon (E3) von gp91phox und flankiert von einem herpes simplex virus thymidin kinase Gen (HSVtk). Abbildung übernommen und modifiziert von Pollock 1995⁸⁹.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.1.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

Zur Kontrolle des Genotyps der verwendeten Versuchstiere, wurden diesen durch Stanzmarkierungen am Ohr (*ear clipping*) Gewebeproben entnommen. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte gemäß dem publizierten Protokoll⁹⁰. Dazu wurde das Gewebe in 75 µl alkalische Lyse-Reagenz für 30 min bei 95°C inkubiert und im Anschluss für 10 min auf Eis heruntergekühlt. Danach wurden 75 µl des neutralisierenden Lyse-Reagenzes hinzugegeben und die Mischung für 15 sec auf dem Schüttler gut durchmischt. Die dabei erhaltene genomische DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Gensequenzen genomischer DNA

Um den Nachweis des Genotyps der Mäuse zu erbringen, wurde aus der erhaltenen genomischen DNA (s. 4.1.1) von Frau Monika Göllner oder mir eine PCR im *Thermal Cycler* durchgeführt. Das Reaktionsprofil und der Reaktionsansatz der PCR befindet sich in der nachfolgenden Tabelle 12.

Tabelle 12: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR.

Substanz	Volumen [µl]	Schritt	Wiederholungen	Temperatur [°C]	Dauer [min]
5x GoTaq Reaktions Puffer	5	Initiale Denaturierung	1x	94	3
dNTPs (0,2 mM)	0,75	Denaturierung	35x	94	0,5
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	1,5	Hybridisierung	35x	62	0,5
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	1,5	Elongation	35x	72	1
H ₂ O	12,75	Terminale Elongation	1x	72	5
GoTaq Polymerase (5 U/µl)	0,5	Kühlung bis zur Verwendung	1x	4	∞
genomische DNA	3				

Die daraus entstandenen PCR-Produkte wurden direkt im Anschluss mittels einer Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.3) analysiert. Die Unterscheidung des PON2-Genotyps und des NOX2-Genotyps vom Wildtyp ist in der folgenden Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Tabellarische Auflistung der verwendete Primer des PCR-Ansatzes zur Bestimmung des Genotyps.

Genotyp	Primer			
	PON2	LacZ	NOX2(Mutant)	NOX2(Wildtyp)
Wildtyp	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv
PON2 ^{-/-}	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
NOX2 ^{-/-}	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit 1,5-2%igem Agaroseanteil eingesetzt, um eine Analyse der Fragmente entsprechend ihrer Größe zu erreichen. Dazu wurde Agarose zusammen mit 1x TAE-Puffer vermischt und erhitzt, um die Agarose im Puffer zu lösen. Zu der erwärmten Lösung wurde vor dem Gießen des Gels in die horizontale Kammer des Gelelektrophorese Systems *OwlTM* B2, 3 µl Roti®-GelStain pro 100 ml Agaroselösung hinzugegeben. Der im Roti®-GelStain enthaltene Farbstoff bindet an die DNA und kann durch UV-Licht visualisiert werden. Die Proben aus 4.1.2 wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Taschen des Agarosegels gegeben und bei einer Spannung von 100V für 30 min aufgetrennt. Zusätzlich wurde in eine Tasche des Gels 2-Log DNA Ladder aufgetragen, um eine spätere Größenordnung der Fragmente durchführen zu können.

4.1.4 RNA-Extraktion aus primären Zellen

Zur Ermittlung der Reinheit der negativ selektierten, murinen Endothelzellen aus der Lunge (s. 4.4.1) wurden vor Beginn und am Ende der negativen Selektion Proben entnommen. Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Gewebe erfolgte im Anschluss aus den entnommenen Proben und wurde von Frau Kerstin Masch nach ihrem etablierten Protokoll⁹¹ durchgeführt.

4.1.5 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA aus den entnommenen Proben, erfolgte eine Messung der optischen Dichte (OD) am *Nanodrop Spectrophotometer* bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Ablauf der Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Leerprobe wurde dabei RNase-freies Wasser verwendet und im Anschluss die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 50 ng/μl eingestellt. Die Reinheit der gemessenen Proben wurde durch das Verhältnis der Extinktion der Proben bei 260 nm zu 280 nm überprüft.

Dabei weist das Verhältnis (OD₂₆₀/OD₂₈₀) auf Verunreinigungen durch Proteinrückstände aus der Präparation hin und sollte nicht unter dem Wert von 1,8 liegen.

4.1.6 cDNA-Synthese durch reverse Transkriptase

Zur Durchführung der quantitativen real-time PCR ist es notwendig, die extrahierte RNA aus 4.1.4 in *complementary* Desoxynucleinsäure (cDNA) umzuschreiben. Dies erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Dazu wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* in einem *Thermal Cycler* nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Reaktionsprofil und der Reaktionsansatz der PCR befindet sich in der nachfolgenden Tabelle 14. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA eingesetzt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der PCR

Substanz	Volumen [μl]	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
10x RT-Puffer	2	Primer-Bindung	25	10
25x dNTP Mix	0,8	Reverse Transkription	37	120
10x RT <i>Random Primers</i>	2	Inaktivierung	85	5
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1	Kühlung bis zur Verwendung	4	∞
Wasser	4,2			
RNA (50ng/μl)	10			

4.1.7 Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Mit der nun erhaltenen cDNA (s.4.1.6) wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Diese zeigt das Expressionsprofil von Zellen für ein spezifisches Gen an. Dazu wurde SYBRTMGreen neben den *forward* und *reverse* Primern eingesetzt. SYBRTMGreen bindet sequenzunspezifisch an die doppelsträngige DNA und fluoresziert bei 521 nm und der entsprechenden Exzitation von 488 nm. Die Quantifizierung erfolgt durch die Verschiebung des Emissionsmaximums des Farbstoffes bei Bindung im Vergleich zum freien Farbstoff. Dadurch ergibt sich eine Proportionalität zwischen Fluoreszenzsignal und Menge amplifizierter DNA. Das Reaktionsprofil und der Reaktionsansatz der qRT-PCR befinden sich in Tabelle 15. Da der Farbstoff auch an unspezifische PCR Produkte bindet, wird im Anschluss immer eine Schmelzkurve gemessen. Die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur bewirkt dabei eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Dadurch kommt es zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes und einhergehend zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals. Weil die DNA-Schmelztemperatur spezifisch für das amplifizierte Fragment ist, kann somit überprüft werden, ob während der PCR unspezifische Fragmente generiert wurden und unerwartet mehrere PCR Produkte entstanden sind⁹².

Tabelle 15: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der qRT-PCR

Substanz	Volumen [µl]	Schritt	Wiederholungen	Temperatur [°C]	Dauer [s]
<i>Precision</i> 2x qPCR Mastermix	10	Initiale Denaturierung	1	95	300
Primer <i>forward</i>	1	Denaturierung	45x	94	15
Primer <i>reverse</i>	1	Hybridisierung/Elongation	45x	60	60
Wasser	6	Terminale Denaturierung	1	95	30
cDNA- Lösung	2	Schmelzkurve	1	60 bis 95	10
		Kühlung		8	∞

Die Berechnung des mRNA-Expressionslevels für alle qRT-PCR-basierten Analysen erfolgte durch die $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode⁹³. Dabei wurde die Expressionsrate des analysierten Gens gegen die Expressionsrate eines konstitutiv exprimierten *house keeping genes* (Hier: 18S) aus der gleichen Probe normalisiert.

4.2 Proteinbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 Herstellung von Zellysaten aus primären Zellen

Zur Untersuchung der Expression von Proteinen müssen die vorhandenen Proben zu Lysaten hergestellt werden. Dazu wurden nach dem Erhalt des Plättchen-reichen-Plasmas (s. 4.4.4.1) die Proben von jeweils 3 Mäusen des gleichen Genotyps zusammengeführt. Diese wurden im Anschluss vorsichtig über eine mit Tyrode-Puffer pH 7,4 gespülte Sepharose™-CL-2B-Säule geführt und nach dem Prinzip der Gelfiltration eluiert. Die daraus erhaltene Fraktion mit Thrombozyten wurde danach bei Raumtemperatur für 500 xg und 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das dabei entstandene Thrombozyten-Pellet in 300 µl 1xPBS aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lysiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

4.2.2 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der hergestellten Thrombozyten-Lysate (s. 4.2.1) wurde der BCA-Test angewendet. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . BCA bildet spezifisch mit Cu^+ einen Farbkomplex (Abbildung 12). Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes⁹⁴.

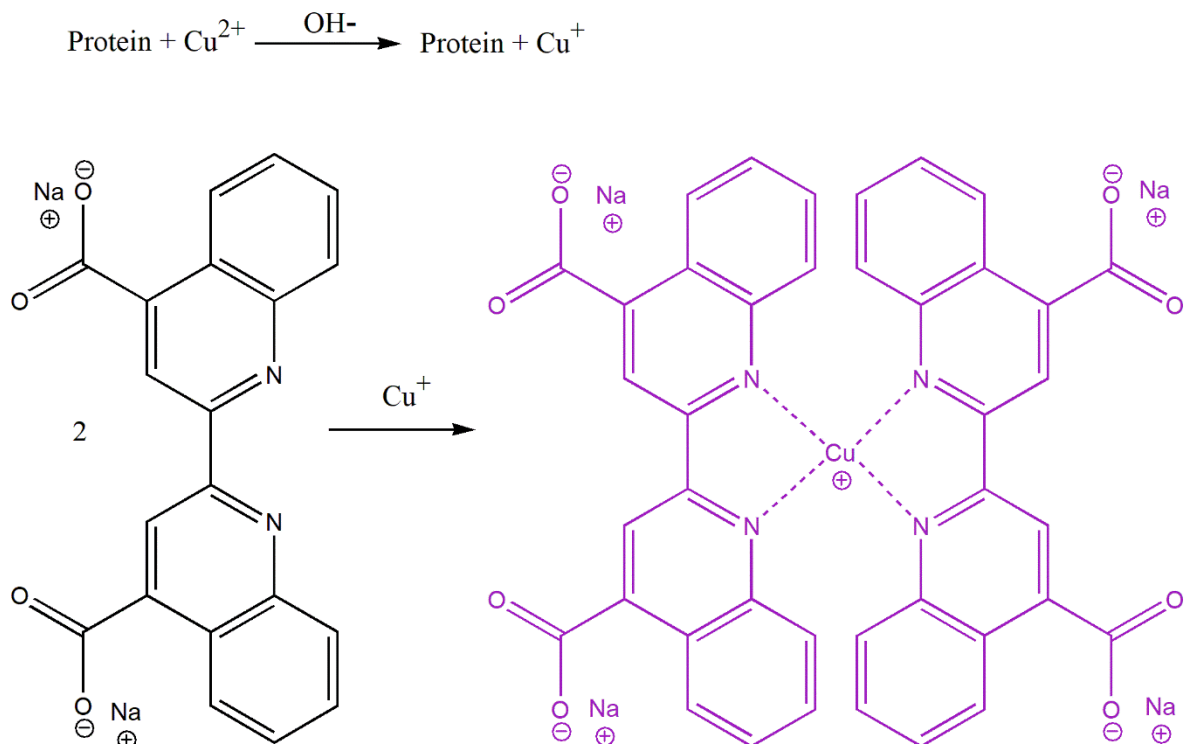


Abbildung 12: Übersicht des Reaktionsschemas für den BCA-Assay. Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäurekomplexierung von Cu^+ . Abbildung modifiziert aus Bioanalytik 2012⁹⁴.

Die Anwendung des Pierce® BCA Protein Assay Kit erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Ermittlung der Konzentration wurde Rinderserumalbumin als Standardprotein in verschiedenen Konzentrationen mitgemessen und daraus eine Eichgerade erstellt.

4.2.3 *Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Thrombozytenlysate (s. 4.2.1) erfolgte nach der eindimensionalen, diskontinuierlichen *Sodium docecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli⁹⁵. Die Zugabe von SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine effektiv und lässt Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit mit ca. 1,4 g SDS pro g Protein⁹⁴ entstehen. Folglich ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld proportional zur molaren Masse der Proteine. Das Polyacrylamidgel fungiert als Molekularsieb und trennt die Proteine nach ihrem Stokes-Radius auf.

Die SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer. Dazu wurde am Tag vor dem Versuch zuerst das 12 %ige Trenngel gegossen und sofort, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern bzw. eine klare, gerade Trennlinie zu schaffen, mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngel wurde der Alkohol entfernt und ein 5 %iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesteckt. Die vollständige Polymerisation erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Die Zusammensetzung beider Gele wird in der nachfolgenden Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE.

	12% Trenngel	5% Sammelgel
H ₂ O	8,25 ml	4,40 ml
Bisacrylamid (30 %)	10,00 ml	1,34 ml
Tris 1,5 M; pH 8,8	6,25 ml	-
Tris 0,5 M; pH 6,8	-	2,00 ml
SDS (10%)	0,25 ml	0,08 ml
0,5 % Bromphenolblau in 0,5 M Tris; pH 6,8	-	0,08 ml
APS (10%)	0,25 ml	0,08 ml
TEMED	0,025 ml	0,01 ml

Zur Auftragung am nächsten Tag wurden die Lysat-Proben mit 1xSDS-Ladepuffer für 5 min auf 95°C denaturiert, um die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufzulösen. Das im Ladepuffer enthaltene Dithiothreiol (DTT) spaltet zusätzlich die Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen auf. Im Anschluss wurden die Proben zusammen mit *Blue Protein Broad Range* als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Pro Ansatz betrug die eingesetzte Menge an Protein aus den Lysaten 40 µg. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Kühlung der Gelapparatur für 150 min bei konstanter Stromstärke von 100 mA und 1x SDS-Laufpuffer.

4.2.4 Western Blot

Mittels Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix (s. 4.2.3) durch ein elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert und immobilisiert. Der Nachweis erfolgt direkt auf der Membran durch spezifische Bindungseigenschaften über Antikörper, Lektine oder Enzymsubstrate⁹⁴.

Für die Durchführung des Western Blot wurde das Polyacrylamidgel für 15 min im Kathodenpuffer äquilibriert. Während dieser Zeit wurde die PVDF-Membran mit Methanol kurz aktiviert, mit Wasser gewaschen und anschließend in Anodenpuffer II ebenfalls für 15 min äquilibriert.

Der Western Blot wurde im *Semidry*-Verfahren durchgeführt, dessen Aufbau in nachfolgender Abbildung 13 zu finden ist. Der Transfer erfolgte bei 3 mA/cm^2 für 24 min.

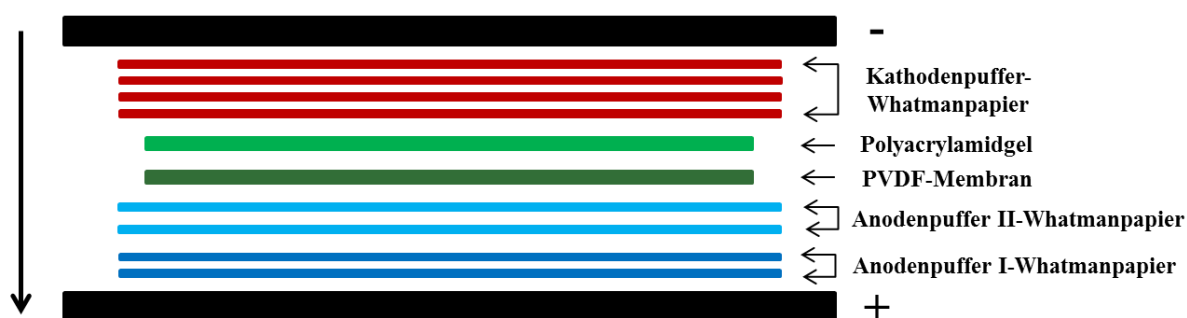


Abbildung 13: Aufbau des Semidry-Verfahren im Western Blot. Das Gel und die Membran werden zwischen Filterpapiere gelegt, die mit Puffer getränkt sind.

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran für mindestens 30 min in 5%igem Milchpulver-TBST-Puffer abgesättigt, damit unspezifische Antikörper-Bindungen nicht entstehen konnten. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C in *end-over-end* Rotation jeweils mit einer Primäantikörperlösung inkubiert.

Am Folgetag wurde die Membran jeweils dreimal mit TBST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und dann für 1 h mit einer zum jeweiligen Primäantikörper passenden Sekundäantikörper-Lösung inkubiert. Alle Sekundäantikörper waren für die spätere Detektion mit einer Meerrettich-Peroxidase (*engl. Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder zweimal für jeweils 10 min mit TBST-Puffer und einmal für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch die Zugabe und Inkubation mit *Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus* nach den Angaben des Herstellers.

Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert dabei die Umsetzung von Luminol unter Zugabe von Wasserstoffperoxid zum entsprechenden Oxidationsprodukt. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines elektronisch angeregten Übergangszustandes, der unter Abgabe eines Photons wieder in den Grundzustand übergeht.

Die Visualisierung der Lichtemission erfolgte durch das digitale *ChemiDoc XRS Imaging System*. Die Qualifizierung der Banden erfolgte durch den mitgelaufenen Proteinmarker. Für die quantitative Auswertung der Protein-Banden wurde die Software *QuantityOne 4.6.7* verwendet und zur Normalisierung des zu analysierenden Gens wurde GAPDH als *house keeping* Gen benutzt.

4.3 Mikroskopische Arbeitsmethoden

4.3.1 Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops ist es möglich, dass von einem Präparat emittierte Licht aus der Fokusebene zu sammeln. Dazu wird das helle Licht eines Lasers über ein Objektiv auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene des Präparates fokussiert. Die Anregung erfolgt dabei rasterartig. Das von dort emittierte Licht wird auf eine variable Lochblende (*engl. pinhole*) fokussiert und von einem dahinterliegenden Photomultiplierdetektor erfasst. Der Fokuspunkt und die Lochblende sind dabei zueinander konfokal, was dazu führt, dass nur Licht aus dem Fokuspunkt die Lochblende passieren kann und Streulicht wirksam unterdrückt wird⁹⁴ (Abbildung 14).

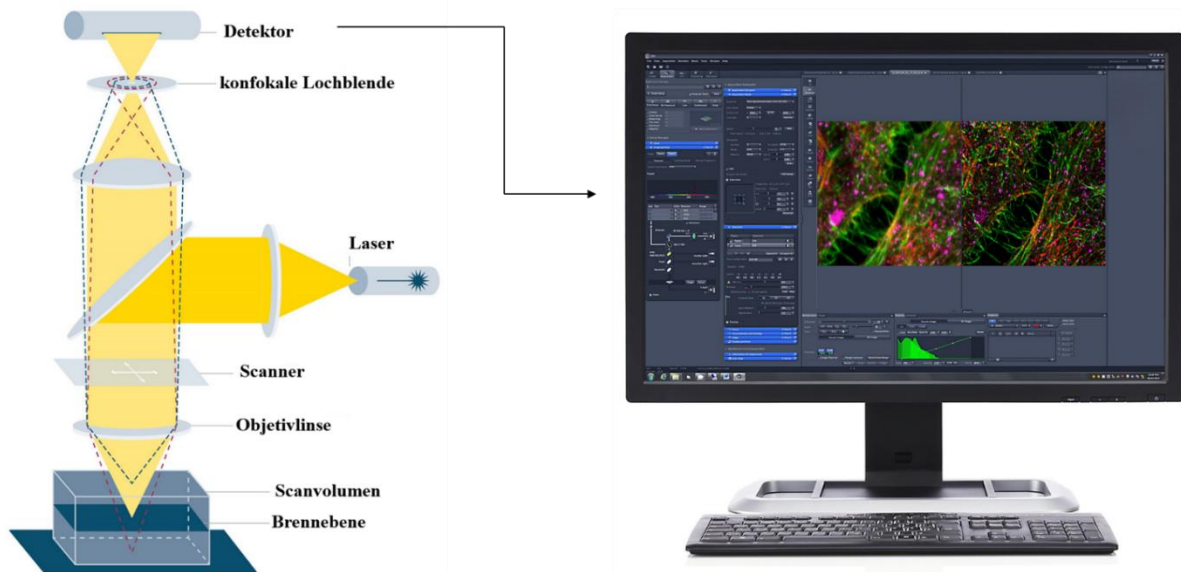


Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM). Im Fokus befindliche Information (gelb). Außerhalb des Fokus befindliche Information (rot und blau gestrichelte Linien). Abbildung übernommen und modifiziert von Zeiss LSM 800⁹⁶.

4.3.1.1 Reinheitsanalyse der pulmonalen, murinen Endothelzellen

Zur Kontrolle der Reinheit der negativ selektierten, murinen Endothelzellen aus der Lunge (s. 4.4.1), wurden 1×10^5 Zellen nach einer Woche Kultivierung in eine *Lab Tec Chamber Slide* überführt und dort weitere 4 Tage kultiviert. Für die fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der Zellen wurde das alte Endothelzell-Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt, dass mit *rat anti-mouse* CD62E-APC (1:100) und Lectin-FITC (1:100) versetzt war. Lectin-FITC bindet unspezifisch an Glykoproteine auf der Zelloberfläche, wodurch die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen in der Probe markiert wurde. *Rat anti-mouse* CD62E-APC ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch Selektin auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen bindet. Nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde das EC-Medium wieder entfernt und durch frisches Medium versetzt mit DRAQ5 (1:1000), einem Zellkernmarker, ersetzt. Die Analyse erfolgte am Zeiss LSM-710 mit einem Plan Apochromat 20x/0.8 M27 Objektiv und folgenden Exzitation-/ Emissionswellenlängen für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: Lectin-FITC: 488/560 nm; *rat anti-mouse* CD62E-APC: 633/649 nm und DRAQ5: 633/723 nm. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sichergestellt. Die Auswertung erfolgte durch die Software *ZEISS2011*.

4.3.1.2 Enzymlokalisation in murinen Thrombozyten

Die Lokalisation des Enzyms Paraoxonase-2 erfolgte durch das LSM aus Thrombozyten, die aus isoliertem Plättchen-reichen-Plasma (PRP) gewonnen (s. 4.4.4.1) und damit weitergearbeitet wurden. Als Kontrolle wurden zwei weitere unabhängige Gruppen (Gruppe B und C) herangezogen, in denen das nachfolgende Protokoll für Gruppe A durch Weglassen des spezifischen Antikörpers *rabbit* anti-PON2 (Gruppe B) oder des Permeabilisationsmittels (Gruppe C) verändert wurde:

10 μ l PRP wurden mit 10 μ l Fixanzmittel (R3 aus VASP/P2Y12-KIT) und 10 μ l Permeabilisationsmittel (R4a aus VASP/P2Y12-KIT) versetzt und zwischen den Schritten jeweils 5 min bei RT inkubiert. Die verdünnte Thrombozytenlösung wurde danach mit 1 μ l des primären, polyklonalen Antikörpers *rabbit* anti-PON2 (1:500) beladen, der spezifisch an Paraoxonase-2 bindet und mit Tyrode-Puffer pH 7,4 auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l gebracht. Im Anschluss wurden die Thrombozyten 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Lösung für 5 min bei 800 xg zentrifugiert.

Dann wurden 400 μ l des Überstandes abgenommen und die übriggebliebene Suspension resuspendiert und mit 3,5 μ l des primären Antikörpers *rat* anti-*mouse* CD41-FITC (1:150) und mit 1,5 μ l des sekundären Antikörpers *goat* anti-*rabbit*-Cy3 beladen und mit Tyrode-Puffer pH 7,4 auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l gebracht. Der primäre, monoklonale Antikörper *rat* anti-*mouse* CD41-FITC bindet spezifisch an den auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimierten Integrin α IIb Rezeptor, wodurch die Gesamtzahl aller vorhandenen Thrombozyten markiert wurde. Der sekundäre Antikörper *goat* anti-*rabbit*-Cy3 bindet spezifisch an den sich bereits in Lösung befindlichen primären Antikörper *rabbit* anti-PON2, wodurch dieser durch das Fluorophor Cyanin 3 detektiert werden kann. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Lösung erneut für 5 min bei 800 xg zentrifugiert und im Anschluss 400 μ l des Überstandes entfernt. Die Lösung wurde danach erneut resuspendiert und stand nun für die Analyse durch das LSM bereit.

Für die Analyse am LSM wurden 7 μ l der Lösung auf einen Objektträger aufgetragen. Die Thrombozyten wurden unter einem Plan / Apochromat 63x / 1.4 *oil DIC*-Objektiv betrachtet. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sichergestellt. Folgende Exzitation-/ Emissionswellenlängen für die bei der Analyse verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden eingesetzt: *rat* anti-*mouse* CD41-FITC: 488/520 nm und *goat* anti-*rabbit* Cy3: 543/570 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Software ZEISS2011.

4.3.2 Elektronenmikroskopie (EM)

Zur Aufklärung der Raumstruktur von Makromolekülen eignet sich neben der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie die Elektronenmikroskopie als dritte Methode. Die Elektronen durchstrahlen das Objekt, das ausreichend dünn sein muss. Dabei wechselwirken die Elektronen mit dem Objekt besonders stark und ermöglichen, im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden der Strukturaufklärung, auch die Abbildung von Einzelmolekülen⁹⁴ (Abbildung 15). Zur Ablenkung der Elektronen kommen bei dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) elektromagnetische Linsen zum Einsatz, die ein elektrisches oder magnetisches Feld erzeugen und grundsätzlich wie Sammellinsen wirken. Dadurch ergibt sich eine Analogie zu den klassischen Durchlichtmikroskopen bis hin zum Strahlengang.

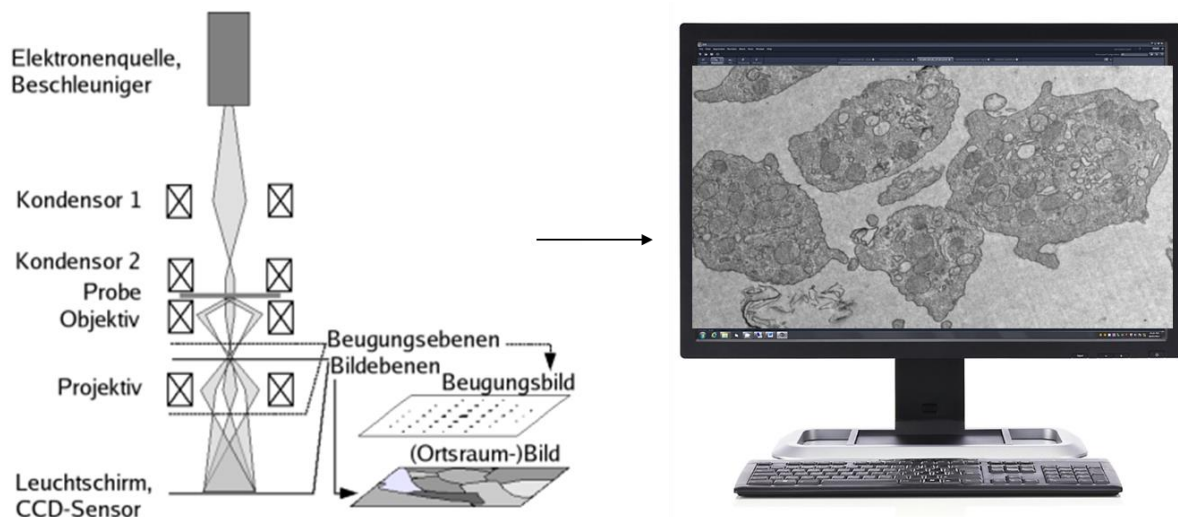


Abbildung 15: Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs im TEM. Das Abbildungssystem ist zweistufig (Objektiv und ein Projektiv) und erzeugt daher im Abbildungsmodus zwei Beugungs- und zwei Ortsraumbilder. Wird die Projektivlinse geringer angeregt (Erhöhung der Brennweite), verschiebt sich das zweite Beugungsbild nach unten und kann am Detektor registriert werden (Beugungsmodus). Abbildung übernommen und modifiziert von Lernhelfer⁹⁷.

4.3.2.1 Probenvorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von murinen Thrombozyten

Zur Aufklärung der Struktur von Thrombozyten am TEM, die einen unterschiedlichen Genotyp besitzen, wurde das aus Citrat-Vollblut isolierte PRP (s. 4.4.4.1) von mehreren Mäusen gleichen Genotyps vermischt und das 2-fache an Tyrode-Puffer pH 7,4, sowie 10 nM Iloprost und 0,2 U/ml Apyrase hinzugegeben. Iloprost (stabiles Prostacyclin-Analogon) und Apyrase wirken dabei hemmend auf die Thrombozytenaggregation, durch Bindung an den IP-Rezeptor der Thrombozyten (Iloprost) und durch Hydrolyse von extrazellulärem ATP (Apyrase). Die verdünnte Thrombozytenlösung wurde im Anschluss bei Raumtemperatur für 10 min und 500 xg zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Tyrode-Puffer pH 7,4 vermischt mit 10 nM Iloprost und 0,2 U/ml Apyrase aufgenommen und resuspendiert. Dieser letzte Schritt wurde wiederholt und das neu entstandene Pellet in 200 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 aufgenommen.

Die Hälfte der gewaschenen Thrombozyten wurde vorsichtig im 1,5 ml Reagiergefäß mit fertiger Karnovsky-Fixierlösung resuspendiert und bei 4°C zu Frau Birgit Fehrenbacher an die Universitätsklinik Tübingen zur weiteren Untersuchung am TEM geschickt.

4.3.2.2 Probenvorbereitung für die Immunogoldfärbung von murinen Thrombozyten

Zum Nachweis der Lokalisierung von PON2 in den murinen Thrombozyten eignet sich die Immunogoldmarkierung. Dabei werden sekundäre Antikörper mit Goldclustern (Durchmesser: 5-20 nm), die gegen den primären, spezifischen Antikörper gerichtet sind und seine Lage markieren, verwendet. So lassen sich Antigene gezielt nachweisen und in Zellschnitten mit einer Ortsgenauigkeit von 20-30 nm lokalisieren⁹⁴. Diese Arbeit wurde von Frau Birgit Fehrenbach am Universitätsklinikum Tübingen nach ihrem Protokoll durchgeführt und ausgewertet. Im Folgenden wird die Vorbereitung der Thrombozyten für die Immunogoldmarkierung dargestellt.

100 µl aus den gewaschenen Thrombozyten von 4.3.2.1 wurden für eine Lowicryleinbettung vorsichtig mit 1,5 ml einer fertigen Fixierlösung, bestehend aus Glutaraldehyd und Paraformaldehyd, im 1,5 ml Reagiergefäß resuspendiert. Nach 4 h wurde die Lösung bei RT für 500 xg und 10 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet vorsichtig in 1,5 ml 1x PBS aufgenommen. Die gewaschenen und fixierten Thrombozyten wurden bei 4°C zu Frau Birgit Fehrenbacher an die Universitätsklinik Tübingen zur weiteren Untersuchung am TEM geschickt.

4.4 Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.4.1 Isolierung pulmonaler, muriner Endothelzellen

Die folgenden zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder steril erworbene Materialien verwendet.

Für die Kultivierung eines *Monolayers* in den *in vitro* Durchflussanalysen (s. 4.6.1) wurden die primären, murinen, pulmonalen Endothelzellen (EC) zunächst isoliert und sowohl mittels molekularbiologischer (qRT-PCR, s. 4.1.7) – als auch bildgebender (LSM, s. 4.3.1.1) Methoden analysiert.

Zur Isolierung und Selektion nicht an magnetischer *Beads* gebundener muriner EC aus der Lunge, wurde im Rahmen der Masterthesis von Jennifer Oberländer unter meiner Anleitung ein Protokoll etabliert⁹⁸, das auf veröffentlichten Literaturdaten^{99;100} basiert und mit der MACS®-Separation kombiniert wurde. Da die Entnahme des Gewebes unter Narkose mit anschließender Tötung stattfand, handelte es sich hierbei nicht um einen Tierversuch, sondern lediglich um ein anzeigepflichtiges Verfahren gemäß §4 Abs. 1 und §7 Abs. 2 S.2 TierSchG. Alle hierbei verwendeten Mäuse waren männlich und 6 Wochen alt. Es wurden dabei für eine Endothelzellisolation jeweils 3 Mäuse benutzt, um genügend Zellmaterial zu erhalten.

Zur Isolierung der Endothelzellen wurde die Maus zunächst kurzzeitig mit Isofluran betäubt und unter der Narkose eine tief narkotisierende und annähernd letale Dosis Pentobarbital (0,4 ml 2 %iges Pentobarbital in 0,9 %iger NaCl-Lösung) *i.p.* injiziert. Sobald mit einem negativen Test der Zwischenzehen sichergestellt werden konnte, dass die Tiefe der Narkose ausreichend war, wurde der Thorax der Maus mit sterilem Präparationsbesteck geöffnet. Die Eröffnung des Zwerchfells führte dabei zu einem Pneumothorax, der letztlich den Tod des Tieres verursachte. Anschließend wurde die Lunge, das Herz, sowie die *vena cava inferior* des Tieres frei präpariert. Letztere wurde mit einer spitzen Schere aufgeschnitten, so dass der Blutkreislauf an dieser Stelle unterbrochen wurde und das Blut nach unten abfließen konnte. Durch Einführen einer mit eisgekühlten DMEM + 1xPS gefüllten Spritze mit 18 G Kanüle in die rechte Kammer des Herzens, wurde die Lunge über das Herzkreislaufsystem hinsichtlich Blutresten ausgespült. Die Lunge wurde danach dem Tier entnommen und in eine 6-well Platte mit 5 ml eisgekühlten DMEM + 1xPS überführt, um ein Absterben der darin enthaltenen Zellen aufzuhalten.

Das aus dem Versuchstier entnommene Gewebe wurde nach Abzug des Mediums, mechanisch mit einer scharfen, feinen Schere zerkleinert und anschließend mit 3 ml einer enzymatischen Lösung (DMEM + 1xPS + 250U/ml Collagenase I + 1U/ml Dispase) für 45 min bei 37°C verdaut. Dabei werden Collagenase und Dispase für einen schonenden Abbau der intrazellulären Matrix verwendet. Während Collagenase unspezifisch wirkt, hydrolysiert die Dispase N-terminale Peptidbanden nicht-polarer Aminosäuren, welche häufig in Kollagen auftreten¹⁰¹.

Somit kann im weiteren Verlauf eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Nach dem Abstoppen des enzymatischen Verdau mit 3 ml serumhaltigen Medium (DMEM + 1xPS + 20% FCS), wurden die Zellen durch Aufziehen durch eine 14 G Kanüle aus dem Gewebeverbund gelöst und mit Hilfe eines Zellsiebes (100 µm) von Gewebestücken getrennt. Im Anschluss wurde die Suspension bei 600 xg für 5 min zentrifugiert, der erhaltene Überstand verworfen und das Pellet im ersten Schritt der negativen Selektion (Abbildung 16) zur Abtrennung der unerwünschten Erythrozyten in 1 ml *Erythrocyte Lysis Buffer* resuspendiert. Bei diesem Verfahren, der sog. hypotonen Erylyse, nutzt man die osmotischen Eigenschaften der Erythrozyten. Durch Zugabe eines hypotonen Puffers strömt Wasser in die Erythrozyten ein, wodurch sie zum Platzen gebracht werden. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurde die Suspension bei 300 xg für 5 min zentrifugiert und dieser Schritt mit frischem *Erythrocyte Lysis Buffer* wiederholt, bis ein weißes Pellet verblieb. Die Resuspension erfolgte dann in 85 µl MACS[®]-Puffer, dass mit 15 µl *rat anti-mouse-CD45-MicroBeads* versetzt wurde, die spezifisch die unerwünschten Leukozyten binden.

Danach wurde die Suspension für 15 min bei 4°C inkubiert, mit 500 µl MACS[®]-Puffer aufgefüllt und auf eine magnetische Säule überführt. Die CD45-positiven, an die Micro-Beads gebundenen Leukozyten verblieben auf der Säule und der Durchfluss wurde bei 300 xg für 10 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet erneut in 70 µl MACS[®]-Puffer aufgenommen. Die CD45-freie Suspension wurde nun mit jeweils 15 µl *rat anti-mouse-CD90.2-MicroBeads* und *rat anti-mouse-CD326-Micro-Beads* versetzt und erneut bei 4°C für 15 min inkubiert. Dies wurde zur Entfernung der CD90-positiven Fibroblasten, sowie zur Entfernung der CD326-positiven Epithelzellen durchgeführt. Nach der Zugabe von 500 µl MACS[®]-Puffer wurde die Suspension auf eine neue Säule überführt und der Durchfluss nochmal bei 300 xg für 10 min zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in 500 µl Endothelzell-Medium (EC-Medium) resuspendiert und damit weitergearbeitet.

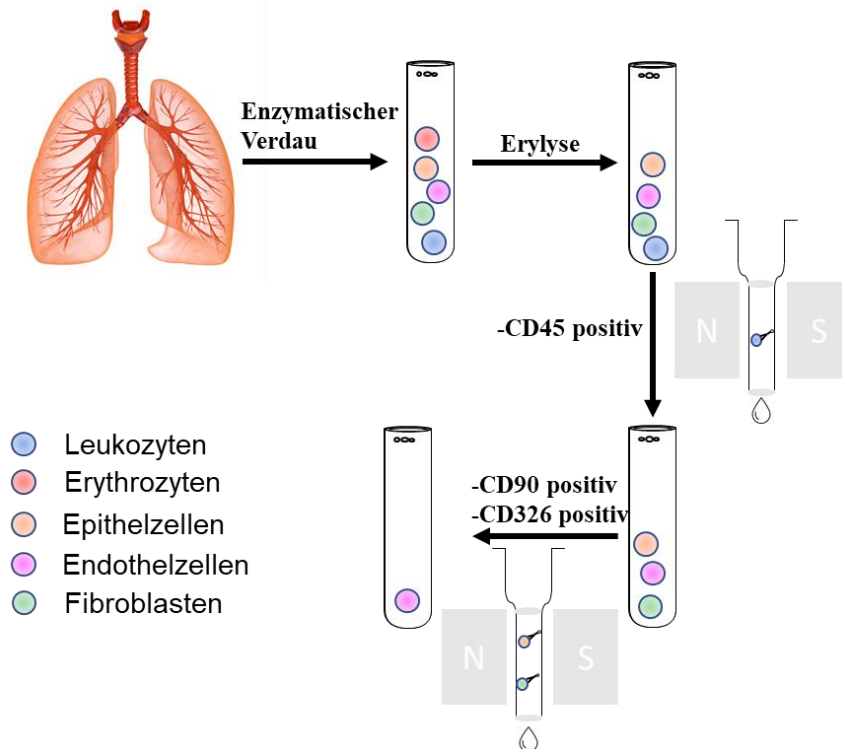


Abbildung 16: Negative Selektion der murinen Endothelzellen aus der Lunge. Aufarbeiten der murinen Lunge durch enzymatischen Verdau mit anschließender Erylyse und negativer Selektion. Bei den verwendeten Antikörpergekoppelten MicroBeads handelt es sich jeweils um *rat anti-mouse* Antikörper.

4.4.2 Bestimmung der Zellzahl, der Zellviabilität und Kultivierung von pulmonalen, murinen Endothelzellen

Von den erhaltenen Zellen aus der negativen Selektion aus 4.4.1 wurden für die Kontrolle der Zellviabilität 10 µl aus der Gesamtlösung von 500 µl entnommen und mit 90 µl 0,5 %Trypanblau-Lösung (1:10) versetzt. Im Anschluss wurden davon 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau wird dabei nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt diese dunkelblau ein. Die Berechnung der Zellzahl, sowie die Berechnung der lebenden Zellen sind in den nachfolgenden Formeln 4 und 5 dargestellt.

$$\text{Anzahl lebender Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{Mittelwert der Summe der 4 Großquadrate}}{4} * 10^4 \quad (4)$$

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} * 100 \quad (5)$$

Die Kultivierung der primären, murinen, pulmonalen Endothelzellen erfolgte im EC-Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 100% Luftfeuchtigkeit in 6-well Platten. Die dabei erhaltene Zellsuspension eines Tages wurde auf 2 wells aufgeteilt und mit Endothelzell-Medium auf jew. 3 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Einen Tag nach der Isolierung wurde das Endothelzellmedium zur Hälfte ausgetauscht.

Danach erfolgte ein kompletter Austausch im 2-Tages Rhythmus mit Sichtkontrolle und lichtmikroskopischer Aufnahme der Zellen.

Für das Passagieren der Zellen wurde das Medium nach 7 Tagen vollständig abgenommen und die Endothelzellen einmal mit jeweils 2 ml 1xPBS pro 6-well gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Accutase-Lösung enzymatisch vom Boden und voneinander gelöst. Der Abbruch des enzymatischen Verdauens erfolgte durch Zugabe von 2 ml DMEM versetzt mit 1xPS und 20%FCS. Die Suspension wurde 5 min bei 300 xg zentrifugiert, das Pellet in Endothelzellmedium aufgenommen und erneut die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt.

4.4.3 Blutbildanalysen im EDTA-antikoagulierten Vollblut bei Mäusen

Bei einem Blutbild wird die Beschaffenheit und Anzahl der Zellen analysiert. Somit lassen sich die direkten Änderungen der Genmanipulation und ein möglicher Phänotyp erkennen. Die Blutentnahme zur Analyse des Blutbildes erfolgte wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben. Das erhaltene Vollblut wurde jedoch nicht mit Na-Citrat versetzt, sondern in ein Reaktionsgefäß (Microvette® 500 K3E) überführt, das mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) beschichtet war. Die Untersuchung des Vollblutes erfolgte direkt im Anschluss am *Sysmex XP Haematology Analyzer* nach den Angaben des Herstellers.

4.4.4 Isolierung muriner Thrombozyten

Alle Entnahmen des Blutes erfolgten unter Narkose mit anschließender Tötung des Tieres, daher handelte es sich hierbei nicht um einen Tierversuch, sondern lediglich um ein anzeigepflichtiges Verfahren gemäß §4 Abs. 1 und §7 Abs. 2 S.2 TierSchG. Die verwendeten Mäuse waren alle männlich und hatten ein Alter von 11-13 Wochen.

Für die Gewinnung des Vollblutes wurde die Maus zunächst mit Isofluran betäubt und in tiefer Narkose aus dem retrobulbären Venenplexus mit einer silanisierten Pasteurpipette das Blut entnommen. Die Tötung des Tieres erfolgte unmittelbar nach Entnahme in Narkose durch zervikale Dislokation. Das gewonnene Vollblut wurde sofort mit 3,13 % Natrium-Citrat als Ca^{2+} -Chelatbinder im Verhältnis 1:10 versetzt. Die Weiterverarbeitung erfolgte in Abhängigkeit des Versuches.

4.4.4.1 Präparation von Plättchen-reichem-Plasma

Das mit 3,13% Natrium-Citrat versetzte Vollblut (s.4.4.4) wurde im Verhältnis 1:1 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 verdünnt und anschließend bei Raumtemperatur für 4 min bei 100 xg zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde auf 2 gestellt, um ein sanftes Abbremsen und damit einhergehend keine Thrombozytenaktivierung durch Scherkräfte zu gewährleisten. Das sich von den anderen Bestandteilen abgetrennte hellgelbe Plättchen-reiche Plasma (PRP) wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein anderes Gefäß überführt und damit weitergearbeitet.

4.4.4.2 Präparation von gewaschenen Thrombozyten

Das mit 3,13 % Natrium-Citrat versetzte Vollblut (s. 4.4.4) wurde im Verhältnis 1:1 mit Tyrode-Puffer pH 6,5 verdünnt und anschließend bei Raumtemperatur für 4 min bei 100 xg zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde auf 2 gestellt, um ein sanftes Abbremsen und damit einhergehend keine Thrombozytenaktivierung durch Scherkräfte auszulösen. Das sich von den anderen Bestandteilen abgetrennte hellgelbe PRP wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein anderes Gefäß überführt und mit dem Vierfachen Volumen an Tyrode-Puffer pH 6,5 vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Suspension bei 500 xg für 10 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene weiße Pellet in 500 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 aufgenommen und vorsichtig resuspendiert und damit weitergearbeitet.

4.4.5 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies in murinen Thrombozyten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind im biologischen Kontext für den Organismus wichtige Signalmoleküle,^{102;103} haben aber in hoher Konzentration schädliche Auswirkungen, indem sie zu oxidativem Stress führen können. Um den Einfluss des anti-oxidativen Enzyms PON2 bzw. des pro-oxidativen Enzyms NOX2 in Thrombozyten zu analysieren, wurden 2 verschiedene, auf FACS basierende Nachweise für Reaktive Sauerstoffspezies angewendet.

4.4.5.1 Durchflusszytometrische Detektion der Produktion von ROS mit CM-H₂DCFDA

Zur Messung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies in Thrombozyten eignet sich Chlormethyl-H₂DCFDA. Die reduzierte membran-permeable Form CM-H₂DCFDA diffundiert passiv in die Zelle. Dort kommt es zur Abspaltung von ihren zwei Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen und einer Reaktion von Chlormethyl mit in der Zelle anwesendem Glutathion und Thiolen. Dies führt zur Einschließung des nun Membran-impermeablen Farbstoffes H₂DCF, der durch die anwesenden ROS zum stark fluoreszierenden DCF oxidiert wird (Abbildung 17).

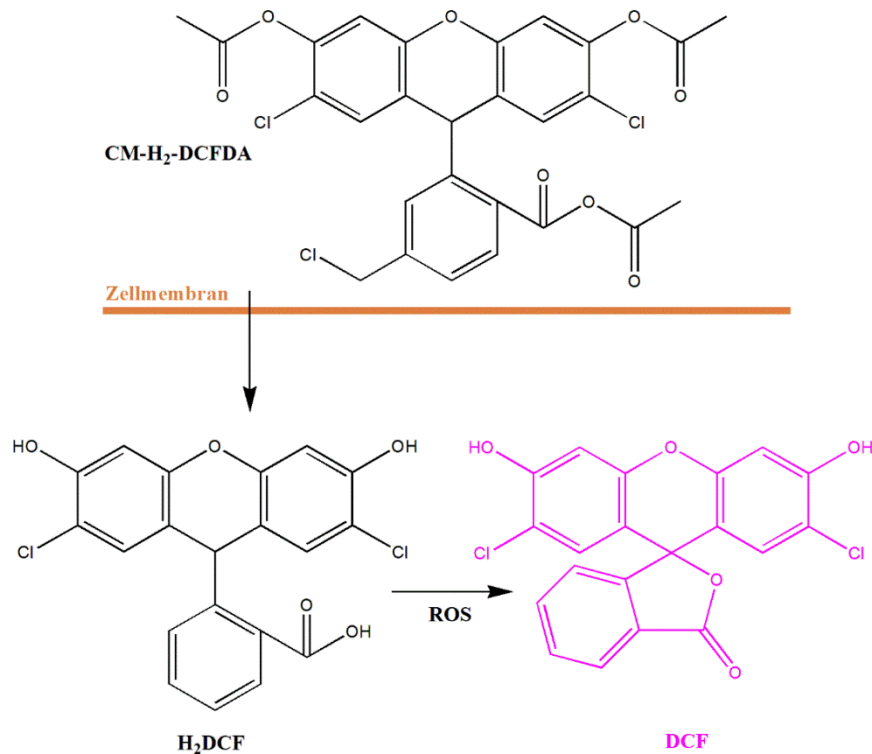


Abbildung 17: Ablauf der chemischen Reaktion des CM-H₂DCFDA mit ROS. CM-H₂DCFDA wird innerhalb der Zelle hydrolysiert, im Zytoplasma zurückgehalten und durch die anwesenden ROS zum fluoreszierenden DCF oxidiert. Dies führt zur Emission von grüner Fluoreszenz.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1. wurde im Verhältnis 1:8 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 versetzt. 125 µl aus dem daraus erhaltenen PRP wurden nochmals mit dem 3-fachen an Tyrode-Puffer pH 7,4 sowie 0,5 µl einer 1 mM CM-H₂DCFDA-Lösung (1:1000) versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min. Die verdünnte Plättchen-reiche-Plasma-Lösung wurde danach entweder nicht weiter behandelt oder jew. 100 µl mit Thrombin (Endkonzentration 0,075 U/ml), Convulxin (Endkonzentration (60 ng/ml) oder Calcymicin (Endkonzentration 5 µM) versetzt und für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 2,5fachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer wurde bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: CM-H₂DCFDA: 488/520 nm. Für die Analyse wurde die Zellzahl gegen die CM-H₂DCFDA-Signalintensität aufgetragen und ausgewertet.

4.4.5.2 Durchflusszytometrische Detektion der Produktion von ROS mit DHR123

Zur Messung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies in Thrombozyten eignet sich Dihydrorhodamin 123 (DHR123). Die reduzierte, lipophile, Membran-permeable Form DHR123 diffundiert passiv in die Zelle, wo es durch die anwesenden ROS (hauptsächlich H_2O_2)¹⁰⁴ zum stark fluoreszierenden Rhodamin 123 (R123) oxidiert wird (Abbildung 18).

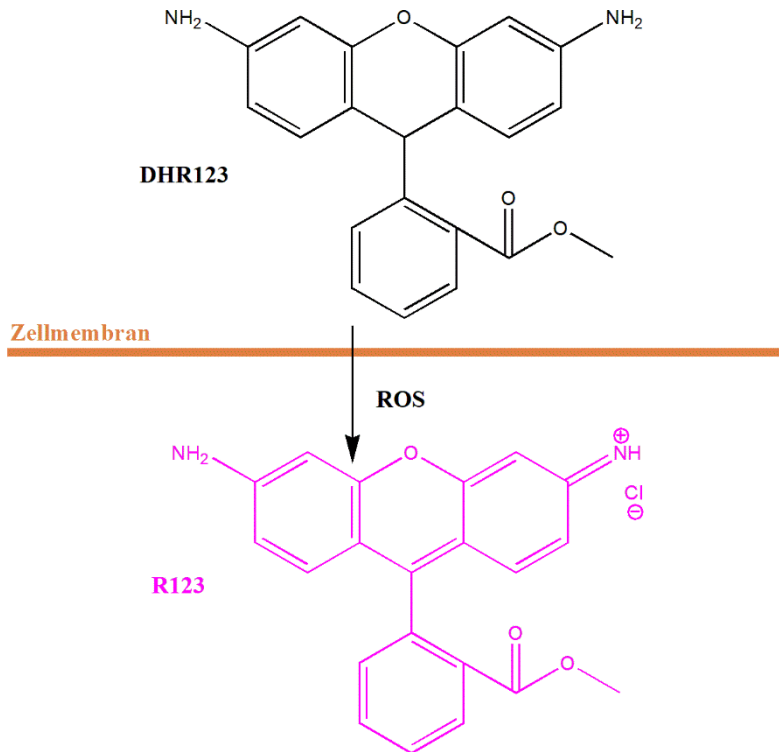


Abbildung 18: Ablauf der chemischen Reaktion von DHR123 mit ROS. Dihydrorhodamin123 (DHR123) diffundiert passiv in die Zelle und wird von den anwesenden ROS zum fluoreszierenden Rhodamin 123 (R123) oxidiert.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1. wurde im Verhältnis 1:8 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 versetzt. Aus dem verdünnten PRP wurden 125 µl entnommen und mit 375 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 (1:4) sowie 1 µl einer 0,5 mM DHR123-Lösung (1:500) versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min.

Die verdünnte Plättchen-reiche-Plasma-Lösung wurde danach entweder nicht weiter behandelt oder jew. 100 µl mit Thrombin (Endkonzentration 0,075 U/ml) oder Convulxin (Endkonzentration (60 ng/ml) versetzt und für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 2,5fachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto*TM II Durchflusszytometer wurde bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: DHR123: 488/520 nm. Für die Analyse wurde die Zellzahl gegen die DHR123-Signalintensität aufgetragen und ausgewertet.

4.4.5.3 Behandlung mit N-Acetyl-Cystein

Damit ROS-abhängige Effekte von anderen PON2 induzierten Effekten abgegrenzt werden konnten, wurden PON2^{-/-}-Mäuse mit dem Antioxidant N-Acetyl-Cystein (NAC) behandelt. Dieses wird nach oraler Aufnahme in L-Cystein deacetyliert und für die Bildung von Glutathion gebraucht, einem Tripeptid das für die Biotransformation schädlicher Substanzen eine wichtige Rolle spielt. Die Behandlung erfolgte fortlaufend in einer Konzentration von 10mg/ml im Trinkwasser der Tiere, seit dem Zusammensetzen des Zuchtpaares bis zur Verwendung der Nachkommen im Experiment. Dieser Tierversuch wurde durch den genehmigten Antrag mit dem Aktenzeichen 23177-07/G13-1-055 vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz gestattet.

4.4.6 Durchflusszytometrische Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von murinen Thrombozyten

Der pH-Wert im humanen Blutsystem liegt bei einem gesunden Menschen in der geringen Referenzbreite von 7,37 -7,45 und wird hauptsächlich durch das Bikarbonat System gepuffert¹⁰⁵. Kommt es zu einer Störung, unabhängig ob der pH dadurch saurer oder alkalischer wird, kann dies lebensbedrohlich werden.

Zur Messung des intrazellulären pH-Wertes von murinen Thrombozyten eignet sich der zellpermeable pH-Indikator SNARFTM-4F 5-(and-6) -Carboxylic Acid (SNARF-4). Dieser zeigt in Abhängigkeit des intrazellulären pH-Werts eine Emissionsverschiebung bei 580 nm im sauren und bei 660 nm im basischen Milieu an.

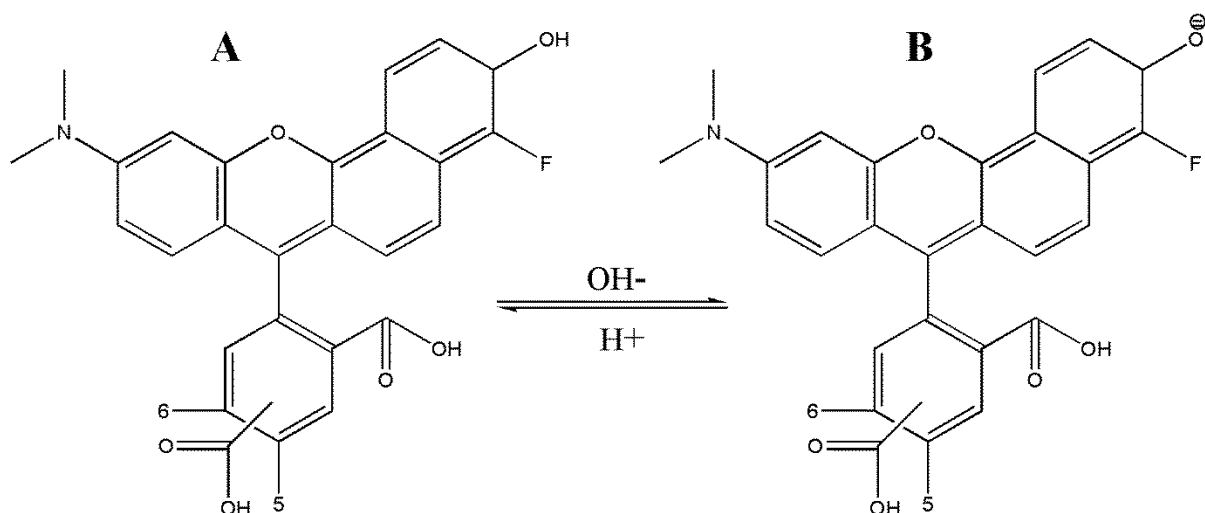


Abbildung 19: Struktur der Phenol (A) und der Phenolatgruppe (B) von SNARFTM-4F. Die Zahlen 5 und 6 stehen für Carbonsäuren unbekannter Größe.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1. wurde im Verhältnis 1:8 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 versetzt. Aus dem daraus erhaltenen verdünnten PRP wurden 125 µl nochmals mit dem dreifachen an Tyrode-Puffer pH 7,4 sowie 2,5 µl einer 1 mM SNARFTM-4F-Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die verdünnte Plättchen-reiche-Plasma-Lösung wurde danach entweder nicht weiter behandelt oder 100 µl mit Calcymycin (Endkonzentration 5 µM) versetzt und für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 2,5fachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Bei der darauffolgenden Messung am *FACSCanto*TM II Durchflusszytometer wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 660 nm und bei 580 nm bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Eine Erhöhung der Fluoreszenzratio (660/580 nm) zeigte dabei eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes an.

4.4.7 Durchflusszytometrische Oberflächenrezeptoranalyse von murinen Thrombozyten

Eine Schlüsselrolle in Thrombozyten besitzen Glykoproteine, die auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert sind. Bei einer Beschädigung der Blutgefäßwand aktivieren sie durch Interaktion mit der extrazellulären Matrix die Thrombozyten oder wirken als Adhäsionsmoleküle, die mit dem beschädigten Endothel, anderen Thrombozyten oder den Leukozyten interagieren.

Für die Analyse der Expression der wichtigsten Membran-Glykoproteine/Rezeptoren wurde das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 im Verhältnis 1:20 verdünnt. Auf 100 µl des verdünnten PRP wurden jeweils

- 2 µl *Rat anti-mouse* CD41-FITC (1:50)
- 5 µl *Rat anti-mouse* GPIb α -DyLight488 (1:20)
- 5 µl *Rat anti-mouse* GPVI-FITC (1:20)
- 2 µl *Hamster anti-rat* CD49b-FITC (1:50)
- 1 µl *Rat anti-mouse* CD49f (1:100)

gegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto*TM II Durchflusszytometer wurde bei allen eingesetzten Antikörpern bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: 488/520 nm. Für die Analyse wurde die mittlere lineare Fluoreszenzintensität von FITC quantifiziert.

4.4.8 Durchflusszytometrische Untersuchung von aktivierungsabhängigen Thrombozytenfunktionen bei Mäusen

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der primären Hämostase und regulieren dominant die Thrombose. In den folgenden Unterabschnitten werden daher unterschiedliche Versuchsansätze beschrieben, um eine Gesamtanalyse der thrombozytären Funktionszustände zu erhalten.

4.4.8.1 Analyse des aktivierten Fibrinogenrezeptors α I **β 3 Integrin (GPIIb/IIIa)**

Der Fibrinogenrezeptor gehört zu den β_3 -Integrinen und ist mengenmäßig das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Thrombozyten⁶⁰. Seine zentrale Aufgabe ist die Bindung von plasmatischem Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche. Unter physiologischen Bedingungen tragen die zirkulierenden Thrombozyten einen „ruhenden“ Fibrinogenrezeptor auf ihrer Oberfläche.

Dieser weist eine niedrige Affinität für Fibrinogen auf, d.h. er kann nur immobilisiertes Fibrinogen, nicht aber gelöstes Fibrinogen im Blutplasma binden. Die Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten führt zu einer Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors und damit zu einer Freilegung der hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen.

Für das Experiment wurden insgesamt vier unterschiedliche Versuchsgruppen untersucht. Dafür wurden die Thrombozyten entweder aus PRP (s. 4.4.4.1) oder aus gewaschenen Thrombozyten (s. 4.4.4.2) genommen. Neben diesen beiden Gruppen sollte ebenfalls der Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Änderung des Fibrinogenrezeptors untersucht werden. Ca^{2+} -Ionen besitzen eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Thrombozyten. Zum Beispiel ist die Bindung von Fibrinogen an den Fibrinogenrezeptor streng abhängig von Calcium und findet in Abwesenheit von divalenten Kationen nicht statt⁶⁰.

Eine Zusammenstellung der vier verschiedenen Versuchsgruppen mit den jeweiligen Agonisten befindet sich in der nachfolgenden Tabelle 17. Für das PRP wurde im Vorfeld eine 1:10 Verdünnung in Tyrode-Puffer pH 7,4 erstellt und die gewaschenen Thrombozyten auf eine einheitliche Konzentration von 25.000 Thrombozyten / μl eingestellt. Für die Aktivierung mit Thrombin wurde vorab zu jeder verdünnten Thrombozytenlösung 5 mM Gly-Pro-Arg-Pro-Lösung (GPRP) im Verhältnis 1:100 hinzugegeben, um die Fibrinpolymerisation und damit eine Thrombozytenverklumpung durch Fibrin zu inhibieren^{106;107}.

Tabelle 17: Ansätze der Agonisten mit den vier Versuchsgruppen für die Untersuchung des Fibrinogenrezeptors.

Versuchsgruppe	Agonist		
	Thrombin [U/ml]	Convulxin [ng/ml]	ADP [μM]
PRP	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90	0,5; 1; 2,5
PRP + 0,5 mM CaCl ₂	-	25; 60	0,5; 1
gew. TZ. + 1 mM MgCl ₂	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90	-
gew. TZ + 1 mM MgCl ₂ + 0,5 mM CaCl ₂	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90	-

Je 100 μl der verdünnten Thrombozytenlösung wurden mit den jeweiligen eingesetzten Agonisten zu den angegebenen Endkonzentrationen vermischt und für 6 min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde bei allen Versuchsgruppen eine Kontrolle durchgeführt, in der keine Zugabe eines Agonisten erfolgte, sondern nur die Inkubationszeit eingehalten wurde, um ein Ergebnis im Ruhezustand der Thrombozyten zu erhalten. Danach wurden zu jedem Ansatz 2 μl des monoklonalen Antikörpers *rat anti-mouse JON/A-PE* hinzugegeben, welcher spezifisch an aktiviertes GPIIb/IIIa bindet und die Mischung für weitere 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 500 μl Tyrode-Puffer pH 7,4 wurde die Reaktion gestoppt und die Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer sofort im Anschluss bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: *rat anti-mouse JON/A-PE*: 488/575 nm und quantitativ analysiert. Es wurden für jede Analyse 10.000 *events* erfasst und die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der mittleren linearen Fluoreszenzintensität von *JON/A-PE*^{108;109}.

4.4.8.2 Analyse des auf der Thrombozyten-Oberfläche exprimierten P-Selektins

P-Selektin, ein vaskulärer Adhäsionsrezeptor ist in der Membran thrombozytärer α-Granula lokalisiert. Sind die Thrombozyten im Ruhezustand, kommt es zu keiner Expressierung des P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. Erst durch eine Thrombozytenaktivierung, kommt es zur Degranulation und damit zur Verschmelzung der Granulamembran mit der Plasmamembran (Exozytose). P-Selektin wird dadurch auf der Plasmamembran nach außen exponiert, induziert inflammatorische Reaktionen in Leukozyten und fördert die Anlagerung von Leukozyten an die Endothelläsion⁶⁰.

Das Experiment setzt sich aus den gleichen Versuchsgruppen wie in Abschnitt 4.4.8.1 beschrieben für die Analyse des aktivierten Fibrinogenrezeptors zusammen. Eine Zusammenstellung der vier verschiedenen Versuchsgruppen mit den jeweiligen Agonisten befindet sich in der nachfolgenden Tabelle 18.

Tabelle 18: Ansätze der Agonisten mit den vier Versuchsgruppen für die Untersuchung des P-Selektin.

Versuchsgruppen	Agonisten	
	Thrombin [U/ml]	Convulxin [ng/ml]
PRP	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90
PRP + 0,5 mM CaCl ₂	-	25; 60
Gew. TZ + 1 mM MgCl ₂	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90
Gew. TZ. + 1 mM MgCl ₂ + 0,5 mM CaCl ₂	0,03; 0,075; 0,3	25; 60; 90

Je 100 µl der Thrombozytenlösung wurden mit den jeweiligen eingesetzten Agonisten zu den angegebenen Endkonzentrationen vermischt und für 6 min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde bei allen Versuchsgruppen eine Kontrolle durchgeführt, in der keine Zugabe eines Agonisten erfolgte, sondern nur die Inkubationszeit eingehalten wurde, um ein Ergebnis im Ruhezustand der Thrombozyten zu erhalten. Danach wurden zu jedem Ansatz 2 µl des monoklonalen Antikörpers *rat anti-mouse* P-Selektin-FITC hinzugegeben, der an das P-Selektin nur an der Thrombozytenoberfläche bindet und die Mischung für weitere 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Durch Zugabe von 500 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 wurde die Reaktion gestoppt und die Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer sofort im Anschluss bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: *rat anti-mouse* P-Selektin-FITC: 488/520 nm und quantitativ analysiert. Es wurden für jede Analyse 10.000 *events* erfasst und die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der mittleren, linearen Fluoreszenzintensität von FITC^{108;109}.

4.4.8.3 Analyse der δ-Granula und deren Freisetzung mit Hilfe des Mepacrin-Assays

Die δ-Granula sind Abkömmlinge des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Namensgebend ist ihre charakteristische optische Dichte. Sie befinden sich in den Thrombozyten in der Zone der Organellen zusammen mit den α-Granula und den Lysosomen. Wie für alle Speichergranula charakteristisch, dienen die δ-Granula als einer der Hauptspeicherorte für freie Ca²⁺-Ionen⁶⁰, aber auch für die an der Aggregation der Thrombozyten beteiligten Faktoren ADP und Serotonin. Kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten leitet die Sekretion der Granula die sekundäre irreversible Phase der Aggregation ein. Dabei werden die δ-Granula zuerst degranuliert.

Zur Analyse der δ -Granula und deren Freisetzung in murinen Thrombozyten eignet sich Mepacrin. Es handelt sich um ein Acridin Derivat, das mit einer hohen Affinität an Adenninukleotide (ATP; ADP) bindet. Da letztere sich in den δ -Granulen befinden, wird Mepacrin schnell und selektiv von diesen aufgenommen und bei Aktivierung der Thrombozyten wieder freigesetzt^{104;105;110;111;112;113}.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1. wurde im Verhältnis 1:10 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 verdünnt und zu jedem Ansatz von 1 ml wurden 20 μ l einer 0,25 mM Mepacrine-Lösung (1:50) gegeben. Jeweils 100 μ l der verdünnten mit Mepacrine beladenen PRP-Lösung wurden danach entweder nicht weiter behandelt oder mit Convulxin in den Endkonzentrationen 25 /60 /90 ng/ml versetzt und für weitere 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines neunfachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto*TM II Durchflusszytometer wurde bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: Mepacrine: 488/520 nm. Es wurden für jede Analyse 10.000 events erfasst und die Auswertung der Daten erfolgte durch die Bestimmung der mittleren, linearen Fluoreszenzintensität von FITC¹¹².

4.4.8.4 Analyse der von-Willebrand-Faktor-Bindung

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein wichtiges Adhäsionssubstrat für zirkulierende Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Durch Interaktion des thrombozytären vWF Rezeptors (Glykoprotein GPIb-V-IX) mit kollagenimmobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Zellwandläsion hergestellt. Die Interaktion von vWF mit GPIb-V-IX ist charakteristisch durch eine sehr hohe Affinität, welche besonders in Gefäßbereichen mit hoher Scherkraft die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand ermöglicht¹¹⁴.

Zur Analyse der Bindung von plasmatischem vWF mit dem vWF-Rezeptor an Thrombozyten wurde Botrocetin verwendet. Botrocetin ist ein Protein aus einem Gift der Jararaca-Lanzenotter, das spezifisch an die A1 Domäne des plasmatischen vWF bindet und dadurch die Affinität von plasmatischen vWF an GPIb α signifikant erhöht¹¹⁵.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 wurde im Verhältnis 1:10 mit Tyrode-Puffer; pH 7,4 versetzt. Jeweils 100 μ l des daraus erhaltenen verdünnten PRP wurden sowohl ohne Botrocetin als auch mit 4 verschiedenen Endkonzentrationen (0,125 μ g/ml; 0,25 μ g/ml; 0,5 μ g/ml; 1 μ g/ml) an Botrocetin versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde zu jeder der angesetzten Lösungen 5 μ l polyklonaler *rabbit* anti-vWF-FITC (1:20) dazugegeben und weitere 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Fünffache an Tyrode-Puffer pH 7,4 dazu gegeben.

Die Messung erfolgte im Anschluss am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge *rabbit anti-vWF-FITC*: 488/520 nm.

Es wurden für jede Analyse 10.000 *events* erfasst und die quantitative Analyse des auf der Thrombozytenoberfläche aktivierten vWF erfolgte durch die mittlere Fluoreszenzintensität von FITC¹⁰⁹.

4.4.8.5 Analyse der Exposition von anionischen Phospholipiden

Phosphatidylserin (PS), ein anionisches Phospholipid welches im Normalfall in der inneren Membranschicht der Thrombozyten lokalisiert ist, besitzt eine wichtige Funktion in der Blutgerinnung. Treffen zirkulierende Thrombozyten auf eine Endothelzellläsion, bewirkt die Kollagen- und Thrombin-vermittelte Aktivierung eine Translokation von PS durch einen Membran Flip-Flop in intakten Thrombozyten von innen nach außen. Damit wird der Thrombozyt pro-koagulant und weist eine erhöhte Bindungsaktivität für plasmatische Gerinnungsfaktoren wie Faktor V, VIIIa, IXa und Xa auf⁶⁰.

In den folgenden Unterabschnitten werden zwei verschiedene Ansätze für die Detektion von PS bzw. der anionischen Phospholipide beschrieben, die sich in ihrer Abhängigkeit zu Calcium unterscheiden.

4.4.8.5.1 Annexin-Assay

Annexin-V ist ein Calcium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS¹¹⁶. Daher eignet es sich für die Analyse der anionischen Phospholipide und speziell für die Phosphatidylserinexposition auf der Thrombozytenmembran.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 wurde nach einer Analyse der Thrombozytenkonzentration durch den *Sysmex XP Haematology Analyzer* nach den Angaben des Herstellers auf eine einheitliche Konzentration von 100.000 Thrombozyten / μ l eingestellt. Aus dieser verdünnten Thrombozytenlösung wurden jeweils 80 μ l mit 20 μ l Tyrode-Puffer pH 7,4, 20 μ l Convulxin (25 ng/ml oder 50 ng/ml Endkonzentration) oder mit 20 μ l Calcymicin (2 μ M Endkonzentration) versetzt. Zu jeder Lösung kamen 2,4 μ l GPRP (1:50) hinzu, um die Fibrinpolymerisation durch direkte Bindung an die Fibrinpolymerisationsstellen zu inhibieren^{106;107} sowie 20 μ l Ca²⁺ (10 mM Endkonzentration), da Annexin-V nur Calcium-abhängig an negativ geladene Phospholipide bindet. Die gesamte Lösung wurde vorsichtig durch pipettieren durchmischt und im Anschluss im Wasserbad für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 12 μ l Annexin-V-FITC hinzugegeben (1:10) und die Lösung erneut für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Durch Zugabe des fünffachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4 wurde die Reaktion gestoppt und im Anschluss am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge Annexin-V-FITC: 488/520 nm gemessen. Für die Analyse wurde die Zellzahl gegen die Annexin-V-FITC Signalintensität aufgetragen und ausgewertet¹⁰⁹.

4.4.8.5.2 Lactadherin-Assay

Lactadherin, ein Milchprotein, bindet stereospezifisch, aber Calcium-unabhängig, an Phosphatidylserin (PS). Dies geschieht durch seine Discoidin-Typ Lectin Domäne, die eine Homologie zu der PS-Bindungsdomäne von Blutgerinnungskofaktor V und VIII aufzeigt¹¹⁷.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 wurde nach einer Analyse der Thrombozytenkonzentration durch den *Sysmex XP Haematology Analyzer* nach den Angaben des Herstellers auf eine einheitliche Konzentration von 100.000 Thrombozyten / μ l eingestellt. Aus dieser verdünnten Thrombozytenlösung wurden jeweils 80 μ l mit 20 μ l Tyrode-Puffer pH 7,4 oder mit 20 μ l Convulxin (25 ng/ml oder 50 ng/ml Endkonzentration) versetzt. Die gesamte Lösung wurde vorsichtig durchmischt und danach im Wasserbad bei 37 °C für 25 min inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 3 μ l (2,5 μ g/ml Endkonzentration) des Antikörpers *Bovine Lactadherine-FITC* hinzugegeben und die Mischung im Dunkeln bei RT für 15 min inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Im Anschluss wurde sofort am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge *Bovine Lactadherine-FITC*: 488/520 nm gemessen. Für die Analyse wurde die Zellzahl gegen die *Bovine Lactadherine-FITC* Signalintensität aufgetragen und ausgewertet¹¹⁸.

4.4.9 Durchflusszytometrische Analyse der Ca²⁺-Ionenfreisetzung in murinen Thrombozyten

Calcium spielt die zentrale Rolle in der Regulation des Thrombozytenmetabolismus und der Aktivierung. Überschreitet die zytoplasmatische freie Ca²⁺-Konzentration eine bestimmte Schwelle, erfährt der Thrombozyt eine Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien und degranuliert⁶⁰. Dabei wird Calcium, dessen Hauptspeicherort im dichten tubulären System (DTS) liegt⁶⁰, nach außen transportiert, wo es an unterschiedlichen Stellen gebraucht wird.

Für die Durchflusszytometrische Analyse der Ca^{2+} -Freisetzung in murinen Thrombozyten wurde Fluo-3-AM verwendet. Dieser unpolare Fluoreszenzfarbstoff diffundiert passiv in die Zelle und wird von den anwesenden intrazellulären Esterasen hydrolysiert. Dies führt zur Einschließung des nun membran-impermeablen Farbstoffes Fluo-3, der mit den anwesenden freien Ca^{2+} -Ionen reagiert. Dabei steigt die Emissionsintensität des Indikators bei der Bindung von Ca^{2+} , ohne dass sich das Emissionsspektrum stark verschiebt (Abbildung 20).

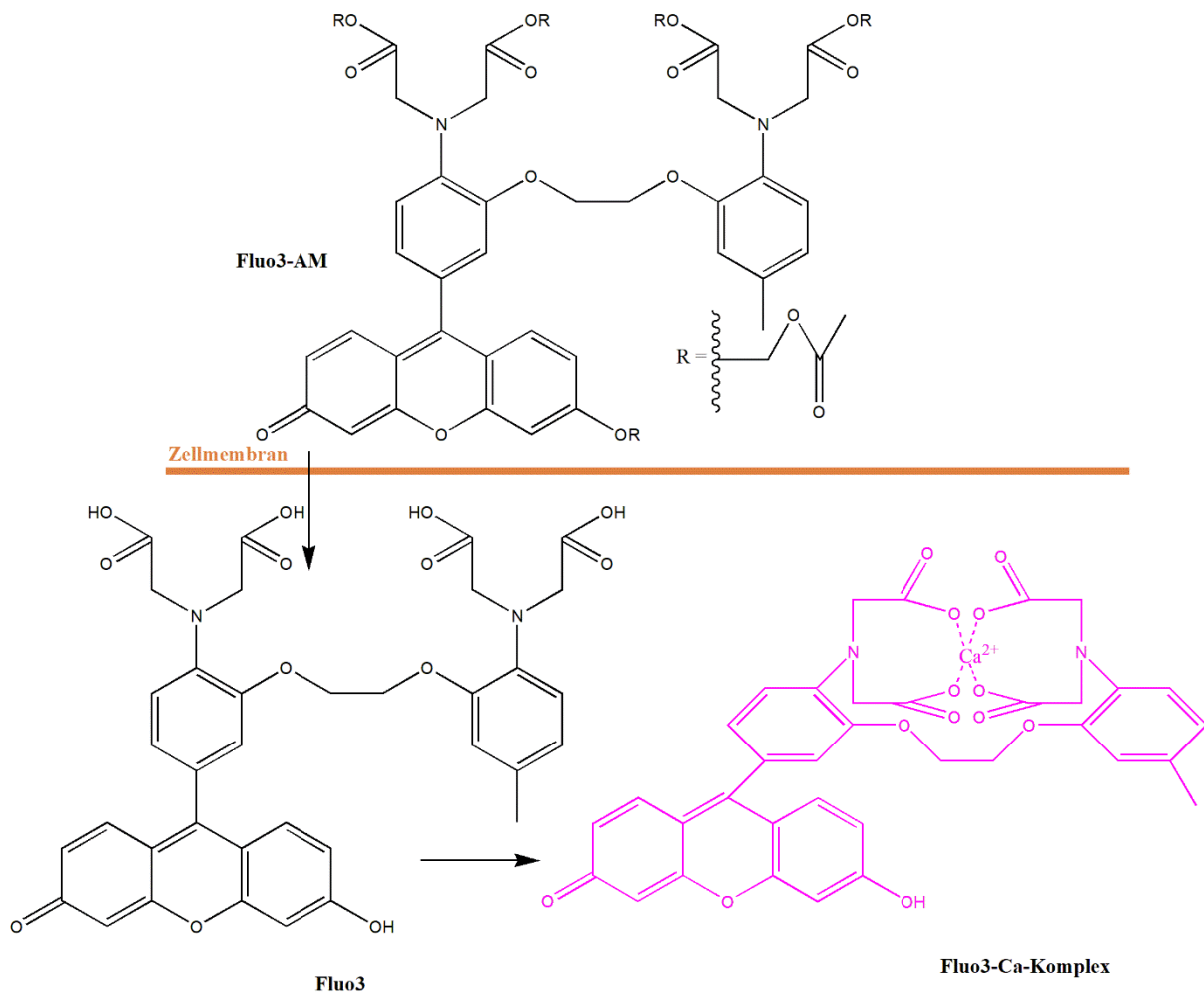


Abbildung 20: Chemische Reaktion von Fluo3-AM mit Ca^{2+} zum fluoreszierenden Fluo3-Ca-Komplex.

Der Versuch wurde von PD Dr. Kerstin Jurk nach ihrem etabliertem und einem veröffentlichten Protokoll der AG von A. Braun in Würzburg durchgeführt^{119;120}. Dabei wurde auch der Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Ca^{2+} -Ionenfreisetzung in murinen Thrombozyten analysiert.

4.4.10 Analyse der Mitochondrien von murinen Thrombozyten

Die nötige Energie zur Aktivierung erhalten die Thrombozyten aus den Mitochondrien. Diese stellen als Hauptfunktion Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung bereit. ATP entsteht, wenn Elektronen über eine Reihe von Elektronen-Carriern von NADH oder FADH₂ auf O₂ übertragen werden. Dieser Fluss von Elektronen führt dazu, dass Protonen aus der mitochondrialen Matrix herausgepumpt werden. Durch eine ungleiche Verteilung der Protonen entsteht ein pH Gradient und ein elektrisches Transmembranpotenzial. Dies erzeugt eine protonenmotorische Kraft, die beim Zurückfließen der Protonen durch die ATP-Synthase ATP bildet⁹⁴.

Zusätzlich dienen die Mitochondrien auch als Ca²⁺-Ionen Speicher und greifen dadurch in die Calcium-Homöostase der Thrombozyten ein. Allerdings entstehen als unerwünschtes Nebenprodukt der Oxidativen Phosphorylierung auch die Reaktiven Sauerstoffspezies. Daher ist es wichtig den Einfluss der Enzyme PON2 und NOX2 auf die Mitochondrien von Thrombozyten im Hinblick auf die mitochondriale Masse und das Mitochondriale Membranpotenzial zu analysieren. In den folgenden Unterabschnitten wird auf diese Punkte eingegangen und verschiedene Versuche aufgeführt.

4.4.10.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der mitochondrialen Masse mit Hilfe des Mito-Orange-Markers

Zur Bestimmung der vorhandenen Mitochondrien in den Thrombozyten wurde Mito Tracker™ Orange CMTMRos verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt selektiv aktive Mitochondrien, indem er, nach einem passiven Transport durch die Plasmamembran, mit Thiolverbindungen von Proteinen und Peptiden der Atmungskette in den Mitochondrien reagiert.

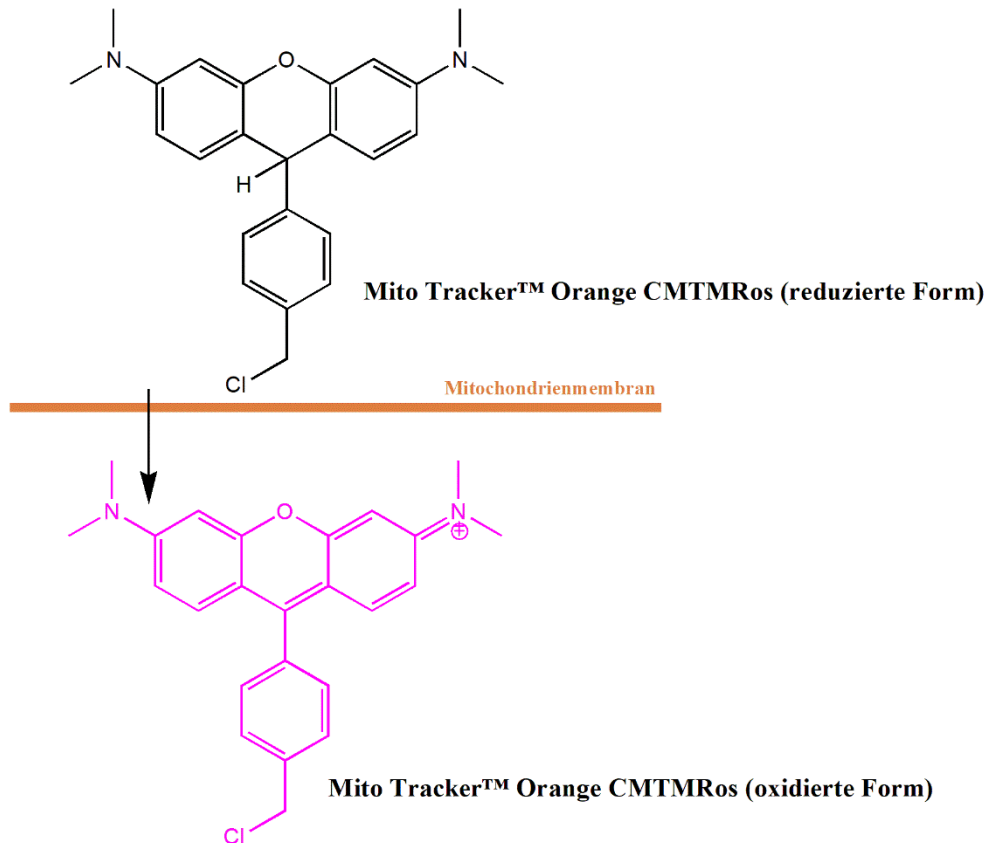


Abbildung 21: Darstellung der reduzierten und oxidierten Form des Mito Tracker™ Orange CMTMROS.

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 wurde im Verhältnis 1:8 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 versetzt. 125 µl aus dem daraus erhaltenen verdünnten PRP wurden nochmals mit Tyrode-Puffer pH 7,4 im Verhältnis 1: 4 verdünnt und mit 5 µl einer 10 µM Mito-Tracker™ Orange CMTMRos-Lösung (1:100) beladen. Danach erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min. Die verdünnte Plättchen-reiche-Plasma-Lösung wurde danach für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 2,5fachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer wurde bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: Mito-Tracker™ Orange CMTMRos: 488/575 nm. Es wurden 10.000 events erfasst und die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der mittleren, linearen Fluoreszenzintensität des PE-Kanals.

4.4.10.2 Durchflusszytometrische Analyse des Mitochondrialen Membranpotenzial mit Hilfe des JC-1-Markers

Die Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials erfolgte durch den kationischen, lipophilen Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1). Dieser Farbstoff wird von gesunden Mitochondrien, die ein stabiles Membranpotenzial besitzen, aufgenommen und liegt in der Mitochondrienmatrix als J-Aggregat vor. Nach Anregung von Licht mit $\lambda = 488$ nm emittieren die J-Aggregate Licht mit der Wellenlänge $\lambda = 570$ nm. Bei Depolarisation der Mitochondrienmembran zerfallen die nicht stabilen J-Aggregate in Monomere, welche wieder ins Zytosol zurück diffundieren. Dabei kommt es zur Abnahme der Emission von Licht mit $\lambda = 570$ nm und stattdessen zur Zunahme der Emission von Licht mit $\lambda = 520$ nm. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale beschreibt nach Formel 6 das mitochondriale Membranpotenzial (MMP).

$$MMP = \frac{\text{Median MFI } \lambda=570 \text{ nm}}{\text{Median MFI } \lambda=520 \text{ nm}} * 100\% \quad (6)$$

Das erhaltene PRP aus 4.4.4.1 wurde im Verhältnis 1:8 mit Tyrode-Puffer pH 7,4 versetzt. Aus diesem verdünnten PRP wurden 125 μ l mit dem dreifachen an Tyrode-Puffer pH 7,4 erneut verdünnt und mit 1 μ l einer 100 μ M JC-1-Lösung (1:500) versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min. Die verdünnte Plättchen-reiche-Plasma-Lösung wurde im Anschluss entweder nicht weiter behandelt oder mit Calcymycin (Endkonzentration 5 μ M) versetzt und für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 2,5fachen Überschusses an Tyrode-Puffer pH 7,4. Die Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer wurde bei den folgenden Einstellungen für Exzitation/Emissionswellenlänge durchgeführt: JC-1: 488/520 nm und 488/570 nm. Die Analyse erfolgte nach der angegebenen Formel 6.

4.5 Licht-Transmissionsaggregometrie von murinen Thrombozyten

Zur Bestimmung der Aggregabilität von murinen Thrombozyten gilt das turbidimetrische Verfahren nach Born¹²¹ bis heute als der Goldstandard in der Thrombozytendiagnostik¹²². Das Verfahren der Licht-Transmissionsaggregometrie (LTA) beruht auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelanzahl und nicht von der Partikelgröße ist.

Durch Zugabe eines Thrombozytenagonisten zum PRP kommt es zur Abnahme der Partikelanzahl und Zunahme der Lichttransmission (s. Abbildung 22). Aus diesen Änderungen der Lichttransmission leiten sich die Maße für die Aggregabilität der murinen Thrombozyten ab⁶⁰.

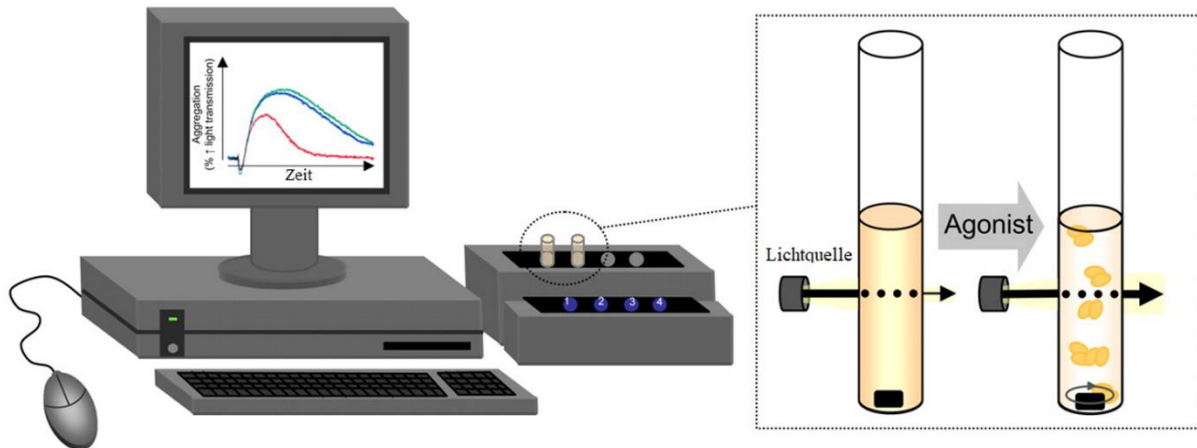


Abbildung 22: Funktionsprinzip der Licht-Transmissionsaggregometrie. Durch die Zugabe des Agonisten in das Plättchen-reiche-Plasma kommt es zu einer Abnahme der Partikelanzahl und damit zu einer Abnahme der optischen Dichte. Modifizierte Abbildung von Jackson 2007¹²³.

Der Versuch wurde von PD Dr. Kerstin Jurk nach ihrem etablierten Protokoll¹²⁴ mit dem aus 4.4.4.1 erhaltenen PRP durchgeführt.

4.6 Flusskammer-basierte Funktionsuntersuchungen von murinen Thrombozyten *in vitro*

Die Interaktionen zwischen Thrombozyten und der Gefäßwand spielen eine wichtige Rolle sowohl in physiologischen Prozessen wie der Hämostase, als auch in pathologischen Prozessen wie der Atherogenese, der Sepsis oder der Thrombose⁶⁰.

Das *in vitro* Modell der Flusskammer ermöglicht die Simulation der auftretenden Scherkräfte unter Blutstrombedingungen. Es dient dabei der Analyse von Adhäsionsvorgängen der Thrombozyten an einer stationären Phase und ermöglichen Einblicke in die bestehenden zellulären Interaktionen. Das Gefäß wird dabei durch einen feinen Glaskanal dargestellt, über den ein Blutstrom, erzeugt durch einen Perfusor, fließt. Die Beschichtung des Glaskanals mit unterschiedlichen subendothelialen oder extrazellulären Matrices kann ebenso wie der Scherstress sowie die Dauer der Perfusion im Glaskanal flexibel eingestellt werden¹²⁵.

Die Definition des Scherstresses ist dabei die Kraft [Dyn/cm^2], welche vom pneumatischen Interface auf den Kanal wirkt. Neben dieser Kraft gibt es noch die Scherrate. Diese beschreibt bei Flüssigkeiten die räumliche Veränderung der Flussgeschwindigkeit [$1/\text{s}$]. Da diese stark von der Viskosität und diese wiederum vom Hämatokrit und der Temperatur abhängig ist^{127;128}, kann sie nicht eingestellt werden, sondern müsste berechnet werden. Die mitgelieferte Software ermöglicht für einen Hämatokrit von 40 % und bei einer Temperatur von 37 °C die Berechnung der Scherrate, da hierfür die Viskosität des Blutes bereits bestimmt wurde.

Alle Experimente im *in vitro* Modell der Flusskammer erfolgten dabei mit Scherstress, der den arteriellen Blutstrombedingungen entspricht^{129;130}.

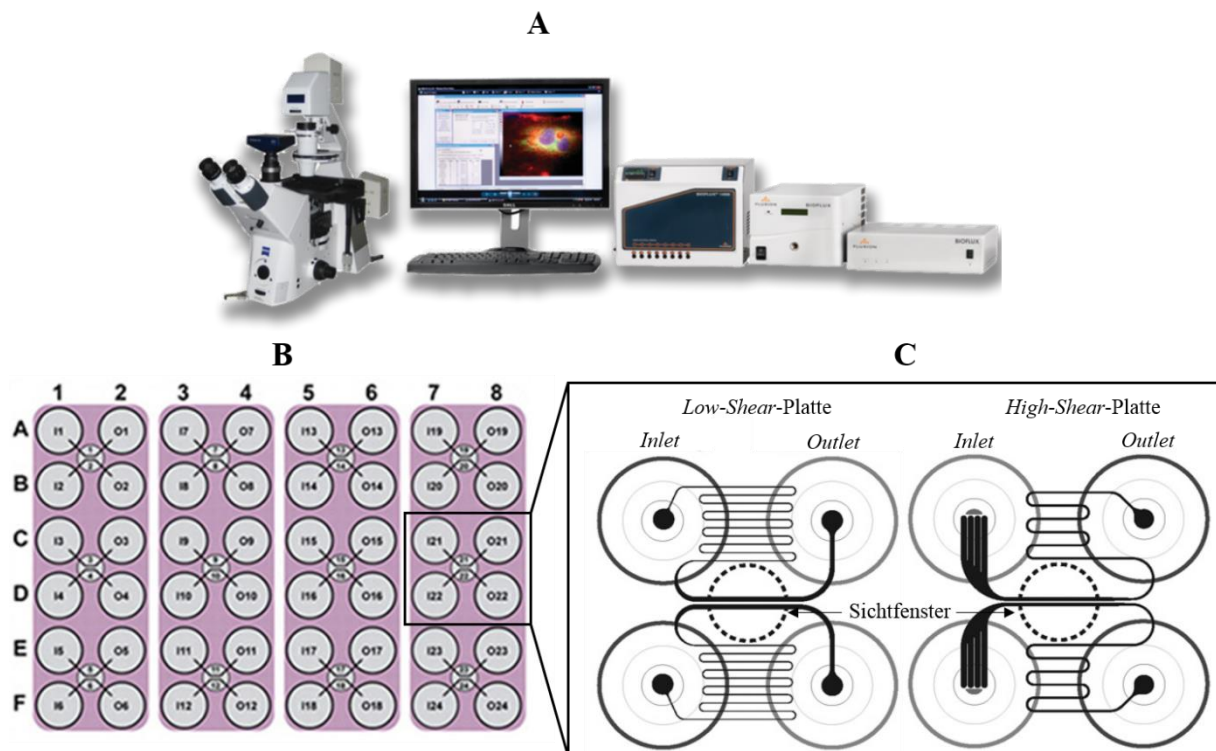


Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Flusskammersystems. (A) Flusskammersystem bestehend aus BioFlux Controller, BioFlux Montage Software und invertiertem Mikroskop. (B) Schematische Darstellung der 48-well-Flusskammerplatten mit 24 Kanälen. (C) Vergrößerung von je zwei Kanälen einer High-Shear- und einer Low-Shear-Platte mit jeweiligem Inlet und Outlet. Das Sichtfenster umfasst je zwei nebeneinanderliegende Kammern. Abbildung übernommen und modifiziert aus Conant et al.¹²⁵ sowie von BioFlux¹²⁶.

Die Kanäle einer Kammer bestehen aus einem Kanaleingang (*Inlet*), einem Kanalausgang (*Outlet*), dem Kanal selbst, sowie einem Sichtfenster (Abbildung 23). Für einen Scherstress von 0-20 Dyn/cm^2 wurden die *Low Shear*-Platten entwickelt, für einen Scherstress von 20-200 Dyn/cm^2 die *High Shear*-Platten. Die parallele Anordnung der Kammern macht es möglich zwei Kanäle gleichzeitig durch das Sichtfenster erfassen zu können.

Die Maße des Kanals innerhalb des Sichtfensters entsprechen $350\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$ für *Low Shear*- und $250\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$ für *High Shear*-Platten. Das Sichtfenster selbst besitzt einen Durchmesser von $5,9\ \text{mm}^{131}$. Die Erfassung der Adhäsion der Thrombozyten im Kanal erfolgt mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie. Alle Experimente in der Flusskammer erfolgten unter Scherraten.

4.6.1 Adhäsion muriner Thrombozyten an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen

Das Protokoll zur Adhäsion muriner Thrombozyten an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen wurde von der Master-Studentin Jennifer Oberländer im Rahmen ihrer Master-Thesis⁹⁸, zusammen mit mir und unter der Anleitung von PD Dr. Kerstin Jurk etabliert und durchgeführt. Alle bei diesem Versuch verwendeten Mäuse waren männlich und 11-13 Wochen alt.

4.6.1.1 Beschichtung der Glaskanäle mit Kollagen Typ I

Die Beschichtung der Glaskanäle mit Kollagen Typ I erfolgte jeweils am Vortag des Versuches. Dazu wurden $50\ \mu\text{l}$ einer Kollagen I-Lösung ($200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in $0,9\ \%$ NaCl-Lösung) in den inneren Ring des *Inlets* einer *High Shear*-Flusskammerplatte pipettiert und ein Druck von $4\ \text{Dyn}/\text{cm}^2$ in der Richtung von *Inlet* nach *Outlet* an der Flusskammer angelegt. Der Vorgang wurde gestoppt, sobald die Lauffront zwischen dem Sichtfenster und dem *Outlet* zu erkennen war. Das überschüssige Kollagen Typ I wurde im Anschluss abpipettiert und durch $50\ \mu\text{l}$ Tyrode-Puffer pH 7,4 ersetzt. Die Flusskammerplatte wurde danach bei 4°C über Nacht inkubiert.

4.6.1.2 Präparation von murinem Vollblut in Versuchsgruppen

Für die Adhäsion muriner Thrombozyten an Kollagen Typ I wurden in der Flusskammer vier verschiedene Versuchsgruppen erstellt.

Zum einen wurde die Antikoagulation des Vollblutes durch die Färbung der Thrombozyten mit Calcein-AM oder Annexin-V FITC untersucht. Calcein-AM ist ein zelldurchlässiger, nicht-fluoreszierender Farbstoff, der von den Thrombozyten aufgenommen wird. Intrazelluläre Esterasen spalten die Acetoxymetylesther-Gruppen (AM) ab, wodurch der Farbstoff zum zellmembranundurchlässigen, fluoreszierenden Calcein oxidiert wird. Somit können durch Calcein alle adhärenierten Zellen erfasst und quantifiziert werden.

Annexin-V ist ein Calcium abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin¹¹⁶. Im ruhenden Zustand befinden sich die anionischen Phospholipide auf der Innenseite der Plasmamembran, wo sie eine Translokation durch einen Membran „Flip Flop“ von innen nach außen bei einer Kollagen und Thrombin vermittelten Aktivierung erfahren. Somit ermöglicht die Bindung von Annexin-V FITC an die Phospholipide eine Markierung der pro-koagulanten Thrombozyten¹³².

Die Messung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt bei den folgenden Wellenlängen für Exzitation/Emission: Calcein-AM 492/513 nm; Annexin-V FITC 488/560 nm¹³⁰.

Neben der Untersuchung der Antikoagulation des Vollblutes wurde der Effekt von Thrombin durch den Einsatz der Inhibitoren Fragmin® und PPACK erforscht. Fragmin® ist ein niedermolekulares Heparin, welches die Generierung von Thrombin verhindert. PPACK hingegen ist ein synthetisches Peptid, welches direkt an die aktive katalytische Region des Thrombin bindet und somit die Thrombinaktivität inhibiert. Dadurch unterbinden diese Inhibitoren zum einen die Thrombin-vermittelte Thrombozyten-Aktivierung, sowie die Thrombin-vermittelte Fibrinbildung.

Für die Analysen wurde das gewonnene Vollblut aus 4.4.4 vorsichtig durchmischt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Abhängig von der Versuchsgruppe wurden die folgenden Pipettierschema nach Tabelle 19 erstellt und dem Vollblut zugeführt. Für das Fragmin® wurde vorab eine 1:10 Verdünnung in Tyrode-Puffer pH 7,4 mit 10 % Citrat hergestellt und für Calcein-AM eine 2 mM Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

Tabelle 19: Pipettierschema für die Flusskammerversuche mit Kollagen Typ I

Versuchsgruppe	Zusammensetzung des Pipettierschemas
Calcein-AM	250 µl Vollblut 1,25 µl Calcein-AM (Endkonzentration 10 µM)
Calcein-AM mit Fragmin®/PPACK	250 µl Vollblut 1,25 µl Calcein-AM (Endkonzentration 10 µM) 4 µl Fragmin® (Endkonzentration 40 U/ml) 1 µl PPACK (Endkonzentration 40 µM)
Annexin-V	250 µl Vollblut
Annexin-V mit Fragmin®/PPACK	250 µl Vollblut 4 µl Fragmin® (Endkonzentration 40 U/ml) 1 µl PPACK (Endkonzentration 40 µM)

Nach der Durchführung des jeweiligen Pipettierschemas wurden die Proben 20 min im Dunkeln inkubiert.

4.6.1.3 Durchführung der Adhäsion muriner Thrombozyten an die subendotheliale Struktur Kollagen I unter Flussbedingungen

Um das überschüssige Kollagen aus den Glaskanälen der Flusskammer zu entfernen, wurden 500 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 in das *Inlet* gegeben und die Kammer bei 8 Dyn/cm² für 10 min gewaschen. Der überschüssige Tyrode-Puffer pH 7,4 wurde entfernt und 250 µl frischer Tyrode-Puffer pH 7,4 in das *Outlet* vorgelegt.

Zu jeder frisch nach dem jeweiligen Pipettieransatz aus 4.6.1.2 vorbereiteten Probe wurden 2,5 µl einer 100 mM MgCl₂-Lösung hinzugegeben und die Probe in das *Inlet* des Glaskanals gegeben. Das extrazelluläre MgCl₂ wird dabei von den Thrombozyten für die Adhäsion und Koagulation benötigt, da die eigene Konzentration bei der Entnahme des Vollblutes durch das Citrat gebunden wurde. Im Anschluss wurde ein Scherstress von 40 Dyn/cm² ($\cong 1000 \text{ s}^{-1}$) für 3,5 min unter der Softwareeinstellung *whole Blood* angelegt. Nach Beendigung des Versuches wurde das überschüssige Blut aus dem *Inlet* entfernt und dieses mehrere Male mit 300 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 gewaschen. In die Kanäle der zwei Versuchsgruppen, in denen die Thrombozyten mit Calcein-AM angefärbt sind, wurden nach dem Waschen jeweils 500 µl Tyrode-Puffer pH 7,4 gegeben.

In die Kanäle der zwei Versuchsgruppen, in denen die Thrombozyten mit Annexin-V angefärbt werden sollen, wurden nach dem Waschen jeweils 500 µl Staining-Puffer, sowie 16,6 µl Annexin-V FITC gegeben. Das Waschen erfolgte bei einem konstanten Scherstress von 2 Dyn/cm² für 10 min, um das überschüssige Blut im Glaskanal zu entfernen und die adhärennten Thrombozyten freizulegen. Im Anschluss wurden sofort von jedem Kanal 3-5 Bilder in 10x Vergrößerung in der Fluoreszenz aufgenommen, um den gesamten Kanal auswerten zu können und die Flächenbedeckung der Thrombozyten mit Hilfe der Bioflux™ Montage Software Version 7.7.2 quantifiziert.

4.6.2 Kultivierung eines *Monolayers* von murinen, pulmonalen Endothelzellen in Kapillaren der Flusskammerplatte

Um eine Nachahmung eines pulmonalen Blutgefäßes im Glaskanal der Flusskammer zu ermöglichen, wird im nachfolgenden Abschnitt die Kultivierung der murinen, pulmonalen Endothelzellen aus Abschnitt 4.4.2 beschrieben, damit diese einen *Monolayer* bilden können. Die Beschichtung der Glaskanäle erfolgt mit Fibronectin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix, der dabei als Bindungsstelle der Endothelzellen dient. Dabei konnte Fibronectin in Studien zeigen, dass die Endothelzellen schnell und dauerhaft daran binden ohne dass dies das Wachstum der Zelle beeinflusst^{67;133;134}. Für die Durchführung der Beschichtung der Glaskanäle mit Fibronectin wurde dabei ein etabliertes Protokoll der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kerstin Jurk benutzt.

In einen Kanal einer *Low-Shear*-Platte wurden 50 µl Fibronectin-Lösung (200 µg/ml in 0,9 % NaCl-Lösung) in den inneren Ring des *Inlets* pipettiert und ein Druck von 2 Dyn/cm² in der Richtung von *Inlet* nach *Outlet* an der Flusskammer angelegt. Der Vorgang wurde gestoppt, sobald die Lauffront zwischen dem Sichtfenster und dem *Outlet* zu erkennen war.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde das überschüssige Fibronectin abgenommen und 250 µl einer 37°C warmen EC-Medium Lösung in das *Outlet* gegeben und bei 2 Dyn/cm² in der Richtung von *Outlet* nach *Inlet* für 10 min gewaschen.

Die aus Abschnitt 4.4.1 erhaltenen murinen, pulmonalen Endothelzellen wurden durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei RT und anschließender Aufnahme in 50 µl 37°C warmes EC-Medium eingengt. Parallel wurde nach dem Waschen des Glaskanals das vorhandene EC-Medium aus dem *Outlet* entfernt und im Anschluss 50 µl der Zelllösung vorsichtig in die Mitte des inneren Rings des *Outlets* pipettiert. Die Endothelzellen wurden durch Anlegen von 1 Dyn/cm² in der Richtung von *Outlet* nach *Inlet* in das Sichtfenster solange gespült bis genügend Zellen zu erkennen gewesen sind. Anschließend wurde die Zelllösung aus dem *Outlet* entfernt und 50 µl frisches 37°C warmes EC-Medium in das *Outlet* gegeben.

Danach wurden die Zellen für 30 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dieser Vorgang wurde 3 Mal wiederholt, um eine Anreicherung der murinen, pulmonalen Endothelzellen im Glaskanal der Flusskammer zu erhalten. Zum Schluss wurden 800 µl frisches 37°C warmes EC-Medium ins *Outlet* und 200 µl frisches 37°C warmes EC-Medium ins *Inlet* gegeben und der Kanal nochmals bei 0,2 Dyn/cm² für 5 min gespült, um tote, nicht-adhärierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung) für 7-11 Tage kultiviert.

Dabei wurde jeden zweiten Tag das Medium komplett abgenommen und 800 μl frisches 37°C warmes EC-Medium ins *Outlet* und 200 μl frisches 37°C warmes EC-Medium ins *Inlet* gegeben, sodass ein schwacher, ständiger Fluss in der Kammer aufrechterhalten wurde. Zur Kontrolle des Wachstums der Zellen wurden jeden zweiten Tag Bilder der Zellkultur unter dem Lichtmikroskop aufgenommen.

4.7 *In vivo* Durchflussanalyse

Das *in vivo* Modell der Intravitalmikroskopie untersucht die Vorgänge der Entstehung von Thromben im lebenden Objekt durch Visualisierung von Zell-zu-Zell- oder Zell-zu-Endothelzell-Interaktion in Echtzeit. Im Vergleich zur *in vitro* Durchflussanalyse hat die *in vivo* Methode den Vorteil, dass komplexe physiologische und anatomische Zusammenhänge wiedergegeben werden können. Dies ist gerade bei Studien von Thrombosen von großem Vorteil, da alle Bestandteile einer Thromboseentstehung (Virchow-Trias) im lebenden Organismus betrachtet werden können. Dadurch lassen sich die zusammenhängenden Mechanismen sehr viel besser darstellen.

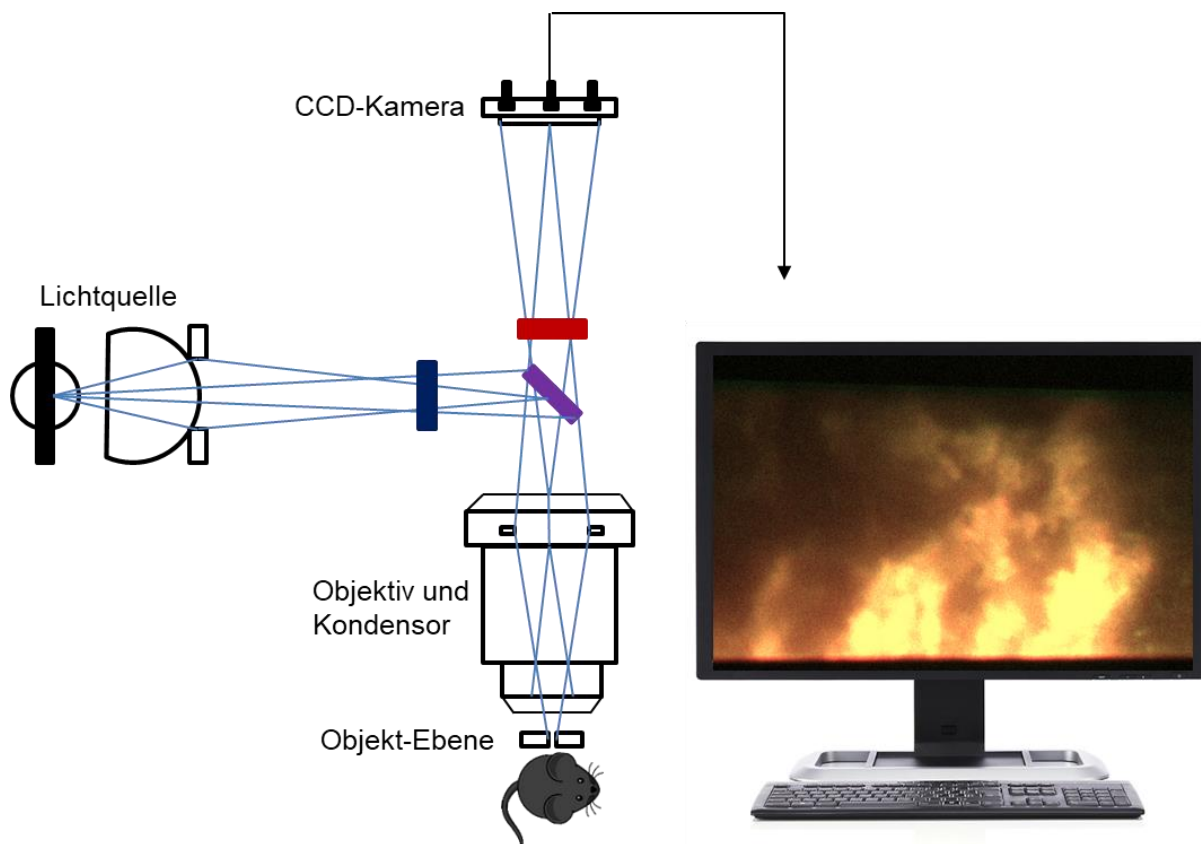


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Intravitalmikroskopie.

Basierend auf der Technik der Fluoreszenz, gekoppelt mit einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop, werden die Zellen und die zellulären Bestandteile *in* und *ex vivo* dargestellt. Fluoreszenz beschreibt dabei die spontane Emission von langwelligem Licht kurz nach der Absorption eines Materials durch elektronische Übergänge.

Die Intensität der vom Objekt ausgestrahlten Emission wird von einer CCD-Kamera (engl. *Charged Coupled Device*) aufgenommen und an ein Aufnahmegerät weitergegeben (s. Abbildung 24).

4.7.1 Arteriell Thrombosemodell mit FeCl₃

Die Hauptursachen für die Entstehung einer arteriellen Thrombose ist neben der Verletzung des Gefäßendothels die atherosklerotische Veränderung der Gefäße. Der dabei entstehende Thrombus kann im betroffenen Organ zu Durchblutungsstörungen und damit zu einem Sauerstoffmangel führen. Besonders gefährlich für den Menschen sind dabei Verschlüsse der Herzkranzgefäße, der Gehirnarterien, sowie der Beinschlagadern.

Zur Untersuchung der arteriellen Thrombose eignen sich arterielle Thrombosemodelle, die durch chemische, mechanische oder elektrische Einflüsse eine Endothelverletzung oder eine Aktivierung des Endothels bewirken.

Das hierbei verwendete FeCl₃-Modell, ist ein an Mäusen modifiziertes Modell¹³⁵, dass schnell einen okklusiven Thrombus an der *A. carotis communis* durch chemische Verletzung der Basalmembran des Endothels und der Erythrozytenmembran durch ein mit FeCl₃ getränktes Filterpapier bildet. Dabei können das Endothel und die Erythrozyten aktivierte Thrombozyten binden und die Thrombusbildung wird eingeleitet¹³⁶. Es eignet sich gut zur Ermittlung der Gefäßverschlusszeit (engl. *Occlusion time*), d.h. die Zeit die von Beginn der Applikation mit dem FeCl₃-getränktem Filterpapier an die *A. carotis communis* bis hin zum vollständigen Verschluss durch einen Thrombus verstreicht. Ebenso kann mit diesem Modell die Zeit bis zur vollständigen Wiederherstellung des Flusses im Gefäß (engl. *Recanalisation time*) gemessen werden.

Die Durchführung des arteriellen Thrombosemodells geschah durch Frau Dr. vet. Alexandra Grill von der AG Reinhardt, Centrum für Thrombose und Hämostase nach ihrem etablierten Protokoll¹³⁷. Es handelt sich hierbei um einen vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigten Tierversuch nach § 8 Abs. 1 mit dem Aktenzeichen 23 177-07/G18-1-053. Alle bei diesem Versuch verwendeten Mäuse waren männlich und zwischen 11-13 Wochen alt.

4.8 Statistik

Für die Erstellung der im Ergebnisteil aufgeführten Grafiken wurden die Programme Graph Pad Prism 5; Quantity One sowie ZEN2011 verwendet. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Dabei wurde, sofern nicht im Versuch explizit beschrieben, für den Vergleich zweier Gruppen der zweiseitige T-test (bei angenommener Normalverteilung mit einer Schiefe <1) angewendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der *I-way ANOVA* mit *Bonferroni's multiple comparison test* benutzt.

Der jeweilige durchgeführte Statistiktest wird in den Abbildungslegenden aufgeführt. Die Ergebnisse werden mit \pm SEM dargestellt und ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5 Ergebnisse

Die Aktivierung von Thrombozyten und deren Adhäsion an das endotheliale Gefäß sind Schlüsselereignisse in der Hämostase und stellen vielversprechende Angriffspunkte der anti-thrombotischen Therapie dar. Maßgeblich daran beteiligt ist die unkontrollierte zelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zu oxidativem Stress und einem entzündlichen Milieu führt.

Auf Grund dessen wurden in dieser Arbeit jene kritischen Faktoren bearbeitet, welche einen wesentlichen Beitrag zur Kontrolle dieser Redox-Prozesse in Thrombozyten beitragen. Es handelt sich dabei zum einen um das anti-oxidative Enzym Paraoxonase-2 (PON2), zu dessen Rolle in Thrombozyten lediglich der Einfluss auf die Thrombozyten-basierte Thrombingenerierung bekannt war und zum anderen um das pro-oxidative Enzym NADPH Oxidase-2 (NOX2), zudem es nur wenige und widersprüchliche Studien gab.

5.1 Lokalisation und Expression der PON2 in murinen Thrombozyten

5.1.1 Verifizierung der Proteinexpression

Studien verschiedener Forschergruppen haben gezeigt, dass PON2 ubiquitär in Geweben und Zelltypen exprimiert wird²². Im Vorfeld der Analysen von Thrombozyten sollte daher zunächst die thrombozytäre Proteinexpression von PON2 für alle drei vorhandenen Mausmodelle verifiziert werden. Dazu wurden die Thrombozyten von den Mausknockoutmodellen, PON2^{-/-} und NOX2^{-/-} und deren WT-Kontrolle unabhängig voneinander lysiert, die Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels eines Elektro-Blots auf eine Membran aufgetragen, die mit verschiedenen Antikörpern für die Detektion von PON2, dem Thrombozytenmarker Glykoprotein Iba (GPIb α), sowie der Ladekontrolle GAPDH beladen wurde.

Die Ergebnisse (Abbildung 25) zeigten in murinen Wildtyp (WT)-Thrombozytenlysaten eine deutliche PON2-Expression sowie eine sehr schwache Expression des PON2 Proteins in Thrombozytenlysaten von PON2^{-/-}-Mäusen. Diese schwache Expression entstammt durch den unvollständigen Knockout des Proteins in den Mäusen, der durch Analyse der mRNA von PON2^{-/-}-Mäusen bereits in anderen Gewebetypen mit unterschiedlicher Expression nachgewiesen werden konnte²². Dies entsprach den Ergebnissen aus einer vorherigen Arbeit der Arbeitsgruppe^{87;138}. Thrombozyten von NOX2^{-/-}-Mäusen wiesen ebenfalls eine sowohl qualitative (Abbildung 25-A) als auch quantitative Verringerung der PON2-Expression (Abbildung 25-B) auf, was auf eine Regulation der PON2 und damit auf Regulierungsprozesse der PON2-Genexpression in Abhängigkeit der Expression von NOX2 hindeutet.

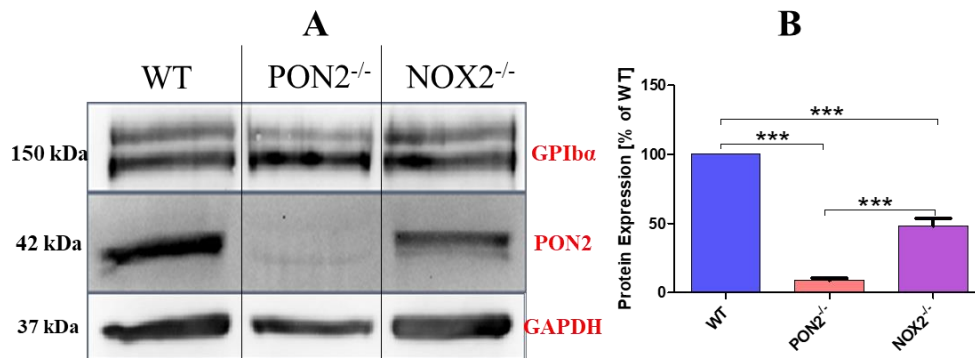


Abbildung 25: Das PON2-Protein ist in murinen Thrombozyten detektierbar. Aus murinen Vollblut isolierte Thrombozyten wurden lysiert und mittels eines Western Blots analysiert. (A) Repräsentatives Bild der qualitativen PON2-Expression in murinen Thrombozytenlysaten aus WT, PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen. GPIb α dient als Thrombozytenmarker und GAPDH als Ladekontrolle. Die anhand eines Proteingrößenstandards bestimmte Molekülmasse (kDa) ist für die entsprechende Auftrennungshöhe angegeben. (B) Quantitative Proteinexpression von PON2 in murinen Thrombozytenlysaten aus WT-, PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen (n=3). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. *** p<0,001; 1-way ANOVA mit Bonferroni-posttest.

5.1.2 PON2 ist intrazellulär in den Mitochondrien, im ER, in den Vesikeln und in den α -Granula von murinen Thrombozyten lokalisiert

Vorangegangene Arbeiten zeigten eine Lokalisation der PON2 im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Mitochondrien in anderen erforschten Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen. Eine Verknüpfung der Funktion mit der Lokalisation ergab, dass PON2 in Mitochondrien an den Komplexen I und III der Atmungskette die Bildung der ROS abschwächt^{14;138}.

5.1.2.1 PON2 ist intrazellulär in murinen Thrombozyten lokalisiert

Die Lokalisation der PON2 in Thrombozyten erfolgte zunächst durch das konfokale Laser-Scanning Mikroskop (LSM) zur Bestimmung der intrazellulären oder extrazellulären Lokalisation in Thrombozyten. Dazu wurden aus murinen Thrombozyten in zwei unabhängigen Gruppen mit PON2^{-/-}-Mäusen und deren WT-Kontrolle Versuche durchgeführt, in denen die Thrombozyten permeabilisiert bzw. nicht permeabilisiert wurden. Als Kontrolle des Antikörpers in dem im Versuch nur der sekundäre Antikörper zugesetzt wurde, diente eine dritte Gruppe, in der nur der WT Mausstamm getestet wurde.

Die Resultate (Abbildung 26) erfüllten die bereits durch publizierte Forschungsarbeiten gestellten Erwartungen, dass die PON2 ausschließlich intrazellulär in ruhenden Thrombozyten lokalisiert ist. Zusätzlich war zu erkennen, dass PON2 intrazellulär in Clustern vorliegt. Dies bedeutet, dass PON2 sich in einzelnen Regionen der Thrombozyten befindet.

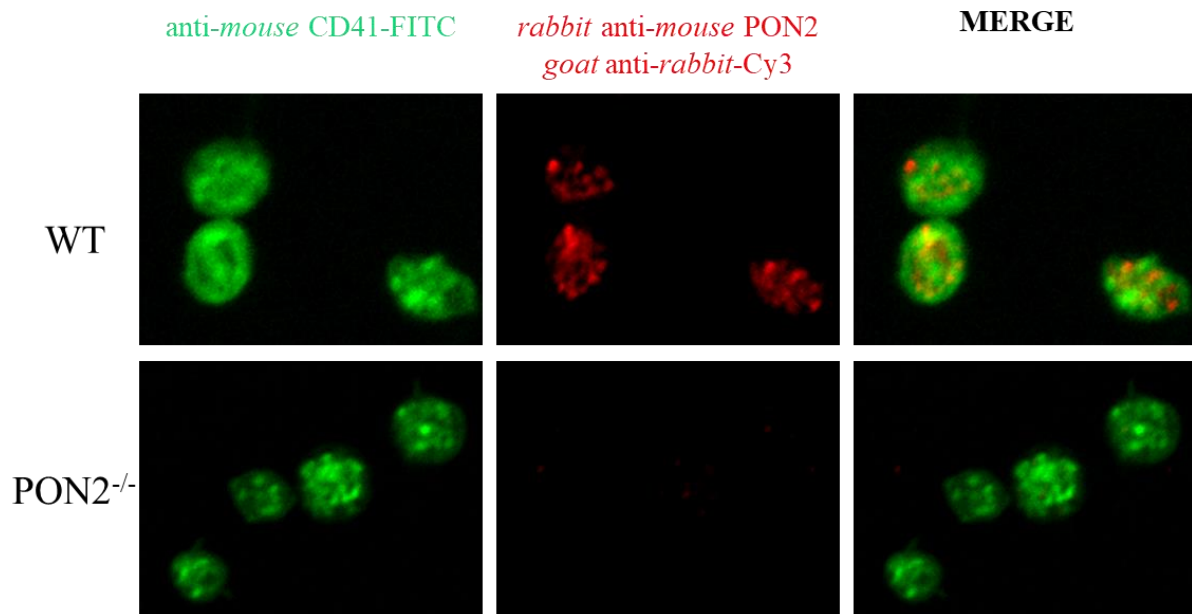


Abbildung 26: Intrazelluläre Lokalisation der PON2 in permeabilisierten murinen Thrombozyten. Repräsentative Bilder von murinen, fixierten und permeabilisierten Thrombozyten aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen, angefärbt mit dem primären Antikörper *rat anti-mouse* CD41-FITC (grün) und dem primären Antikörper *rabbit anti-mouse* PON2, der mit dem sekundären Antikörper *goat anti-rabbit-Cy3* (rot) gekoppelt ist (Aufgenommen mit einem LSM und 63x-Objektiv. **Linke Spalte:** Bilder der Emission von FITC bei 519 nm (grün). **Mittlere Spalte:** Bilder der Emission von Cy3 bei 593 nm (rot). **Rechte Spalte:** Kombination (MERGE) der Bilder aus linker und mittlerer Spalte.

Bei den Versuchen, zum einen für die extrazelluläre Lokalisation (Abbildung 27-A) als auch bei der Spezifitätskontrolle des *rabbit anti-mouse* PON2 Antikörpers (Abbildung 27-B) konnte kein Signal erfasst werden. Ebenso ließ sich kein Signal in den als Kontrolle untersuchten PON2^{-/-}-Thrombozyten messen. Diese Ergebnisse beweisen, dass PON2 in den Thrombozyten intrazellulär vorhanden ist.

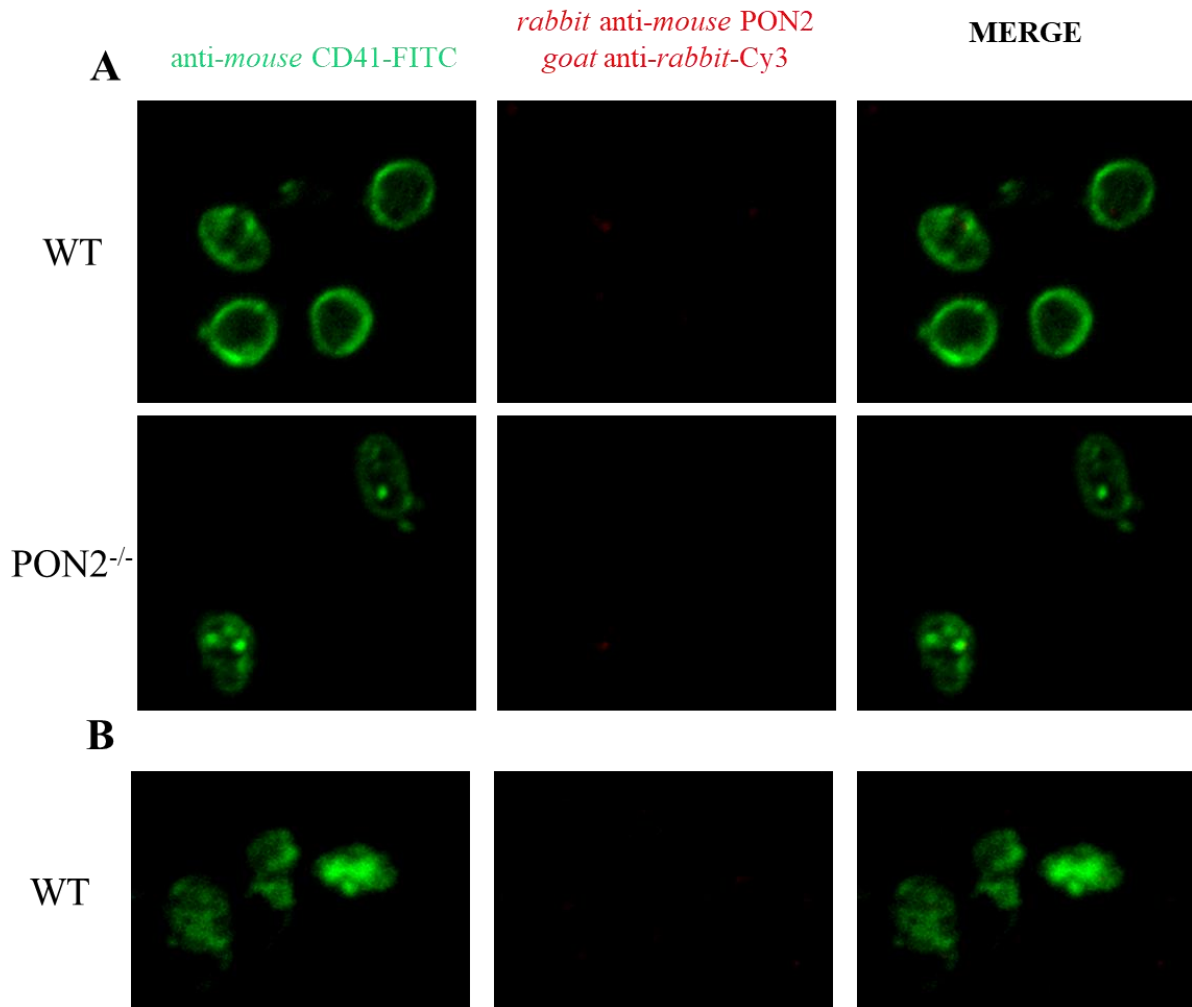


Abbildung 27: Kontrollgruppen zeigen kein PON2-Signal bei murinen Thrombozyten. Repräsentative Bilder von murinen, fixierten Thrombozyten aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen angefärbt mit dem primären Antikörper *rat anti-mouse CD41-FITC* und (A) dem primären Antikörper *rabbit anti-mouse PON2*, der mit dem sekundären Antikörper *goat anti-rabbit-Cy3* gekoppelt ist oder (B) permeabilisiert und mit dem sekundären Antikörper *goat anti-rabbit-Cy3* angefärbt sind. Aufgenommen mit einem LSM 63x Objektiv. **Linke Spalte:** Bilder der Emission von FITC bei 519 nm (grün). **Mittlere Spalte:** Bilder der Emission von Cy3 bei 593 nm (rot). **Rechte Spalte:** Kombination (MERGE) der Bilder aus linker und mittlerer Spalte.

5.1.2.2 PON2 ist in den Mitochondrien, im ER, in den Vesikeln und in den α -Granula von murinen Thrombozyten lokalisiert

Die Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Thrombozyten unterschiedlichen Genotyps sowie die Lokalisation der PON2 in spezifischen Regionen erfolgte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durch Frau Birgit Fehrenbacher am Universitätsklinikum Tübingen nach ihrem Protokoll aus gewaschenen und fixierten Thrombozyten. Zusätzlich wurde der primäre *goat anti-rabbit PON2* Antikörper bei der Lokalisation der PON2 in einer unabhängigen Versuchsgruppe kontrolliert und aus den erstellten Bildern die δ -Granula für einen Vergleich zwischen WT- und PON2^{-/-}-Thrombozyten ausgezählt (s. Abschnitt 5.2.3).

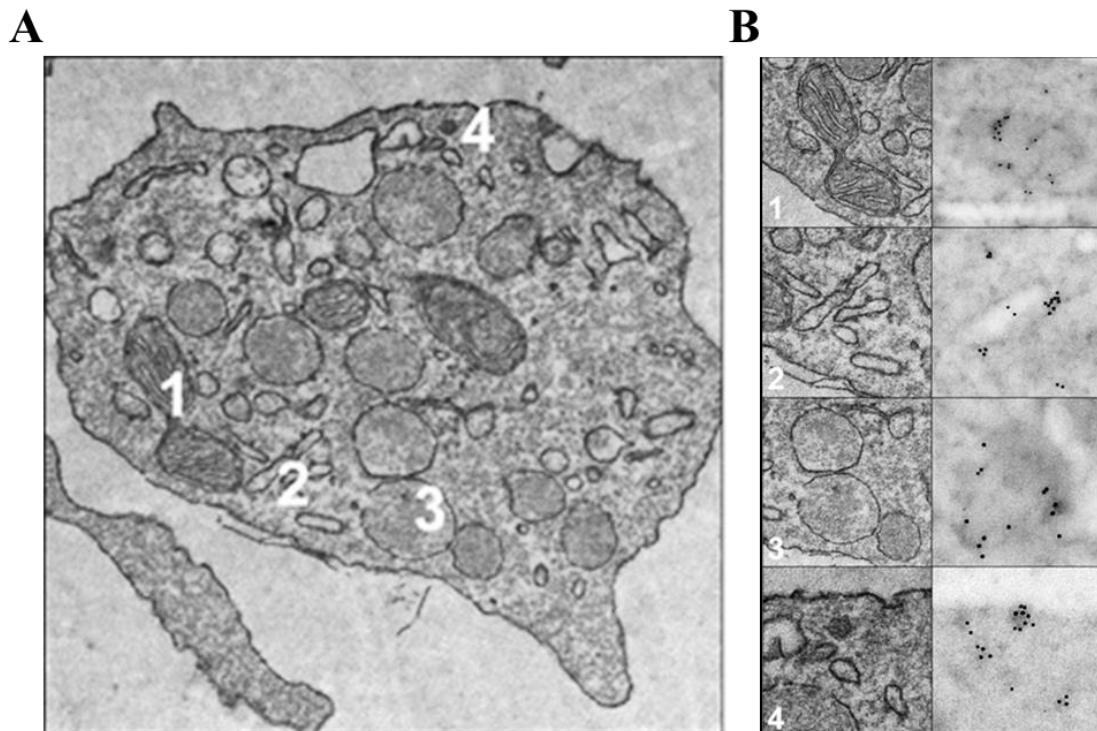


Abbildung 28: Intrazelluläre Lokalisation von PON2 in spezifischen Regionen. Repräsentative Bilder von (A) einem EM-Ultradünnschnitt eines WT-Thrombozyten und (B) einer positiven EM-Immunogoldmarkierung mit rabbit anti-mouse PON2 in den nummerierten Abschnitten. Dabei steht 1 für die Mitochondrien, 2 für das Endoplasmatische Retikulum, 3 für die α -Granula und 4 für die Vesikel.

Mit Hilfe einer Immunogoldmarkierung (Abbildung 28-B) konnte gezeigt werden, dass PON2 intrazellulär in Mitochondrien, ER sowie in Vesikeln und α -Granula lokalisiert ist. Dies bestätigt vorrangig publizierte Studien, welche die PON2 in anderen Zelltypen ebenso in den Mitochondrien und dem ER lokalisiert haben^{13;14}.

Die Kontrollgruppe mit PON2^{-/-}-Thrombozyten (Abbildung 29) zeigte die erwartete negative Immunogoldmarkierung mit dem primären Antikörper *rabbit anti-mouse* PON2 und beweist somit die spezifische Bindung des Antikörpers an PON2.

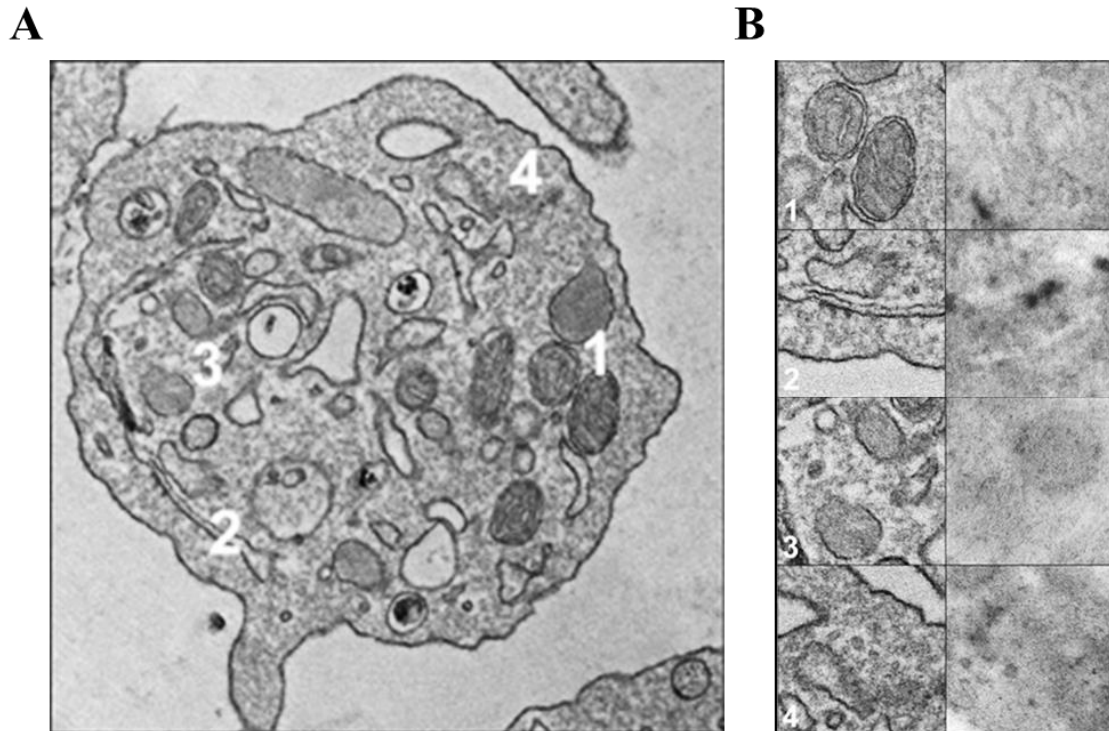


Abbildung 29: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen kein PON2-Signal. Repräsentative Bilder von (A) einem Ultradünnschnitt eines PON2^{-/-}-Thrombozyten (aufgenommen mit einem Elektronenmikroskop). (B) Negative Immunogoldmarkierung mit rabbit anti-mouse PON2 in den mit Zahlen markierten Abschnitten. Dabei steht 1 für die Mitochondrien, 2 für das Endoplasmatische Retikulum, 3 für die α -Granula und 4 für die Vesikel.

5.2 Phänotypisierung von PON2- und NOX2-defizienten Mäusen

5.2.1 PON2^{-/-} - Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Zellvolumen und eine verringerte Konzentration im Vollblut.

Die in der Arbeitsgruppe vorangegangenen Arbeiten konnten zeigen, dass sich die Ausschaltung des PON2-Genes in Mäusen in einem veränderten Blutbild äußert¹³⁹. Dagegen wurden in vorherigen Publikationen von keiner Veränderung des Blutbildes in NOX2-inaktivierten Mäusen berichtet¹⁴⁰. Daher wurden im Hinblick auf die Untersuchungen in dieser Promotionsarbeit die Konzentration der Thrombozyten (*PTL count*) und das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) ausgewertet. Diese Faktoren können bei Abweichung von der Normalität Auswirkungen auf die Hämostase haben. Ein erhöhter Wert des MPV wurde mit einer gesteigerten Aktivität der Thrombozyten in Zusammenhang gebracht¹⁴¹, damit einhergehend aber auch einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen und Thrombosen¹⁴².

Die Entnahme des Vollblutes erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus der Mäuse und Antikoagulation mittels EDTA. Im Anschluss erfolgte sofort die Analyse am *Sysmex XP Haematology Analyzer*.

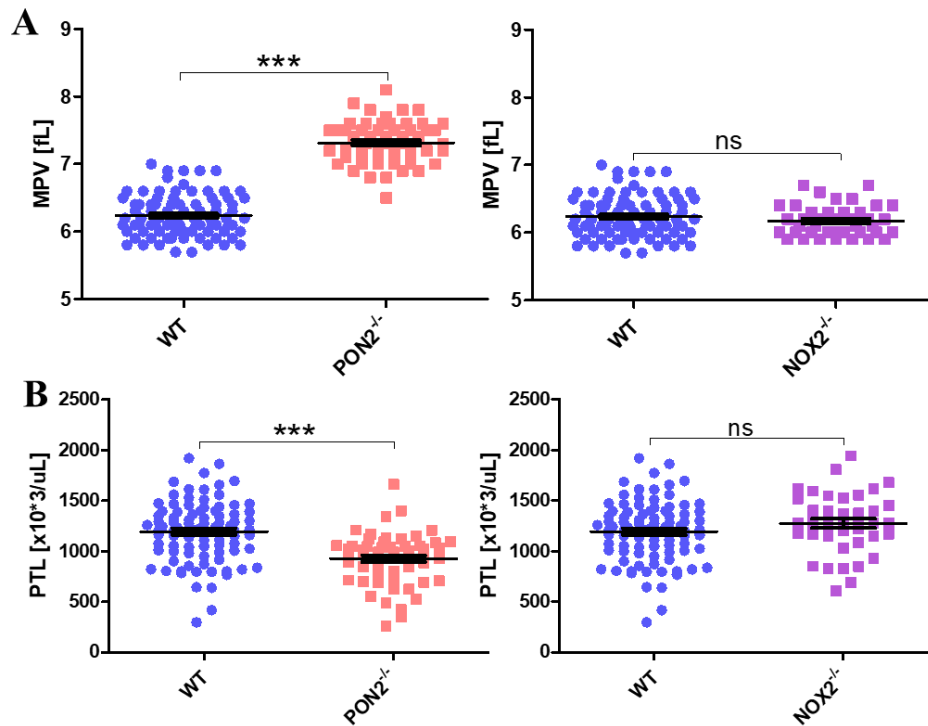


Abbildung 30: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine erhöhtes MPV und eine erniedrigte Konzentration an Thrombozyten im Vollblut. Durch hämatologische Untersuchung des Vollblutes von WT-, PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}- Mäusen wurde (A) das mittlere Thrombozytenvolumen (engl. mean platelet volume, MPV) und (B) die Anzahl der Thrombozyten pro µl (engl. platelet count, PTL) bestimmt (n= 41-90). **Linke Spalte** WT vs. PON2^{-/-}, **rechte Spalte** WT vs. NOX2^{-/-}. Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. *** p<0,001; ns. Nicht signifikant; zweiseitiger T-test.

Die Auswertung zeigte, dass die Defizienz von PON2, nicht aber die Defizienz von NOX2 zu einem signifikant erhöhten MPV (Abbildung 30-A) sowie einer erniedrigten Anzahl an Thrombozyten (Abbildung 30-B) gegenüber dem WT führt.

Ergänzend zu den drei verwendeten Mausmodellen, PON2^{-/-}, NOX2^{-/-} und deren WT-Kontrolle wurde hier zusätzlich das Blutbild von einer PON2^{-/-}-Linie analysiert, dessen Jungtiere bereits durch die Muttermilch und danach dauerhaft mit dem Antioxidant N-Acetyl-Cystein (NAC) in der Konzentration 10 mg/ml durch orale Aufnahme durch das Trinkwasser behandelt wurden. Damit sollte eruiert werden, ob es sich bei den im Blutbild beobachteten Effekten um „direkte“ Effekte des Enzyms PON2 oder auf dessen anti-oxidativer Eigenschaft beruhende Effekte handelt.

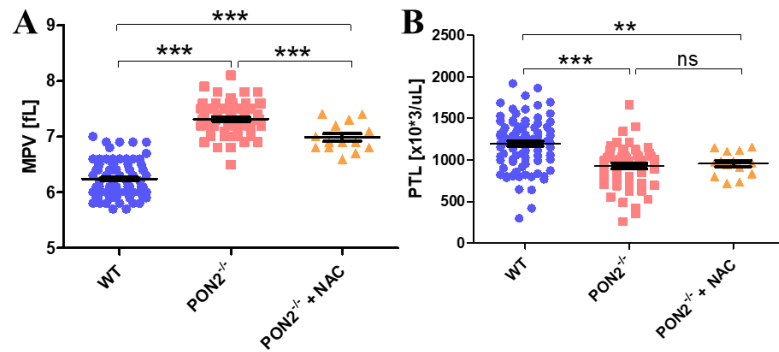


Abbildung 31: PON2^{-/-}-Mäuse behandelt mit NAC zeigen im Vergleich zum unbehandelten PON2^{-/-} ein erniedrigtes MPV. Durch hämatologische Untersuchung des Vollblutes von WT-, PON2^{-/-}- und PON2^{-/-}-Mäusen behandelt mit NAC wurde (A) das mittlere Thrombozytenvolumen (engl. mean platelet volume, MPV) und (B) die Anzahl der Thrombozyten pro µl (engl. platelet count, PTL) bestimmt (n= 14-90). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p<0,001; ** p< 0,01; ns. Nicht signifikant; 1way-ANOVA mit Bonferroni posttest

Die Blutbilder zeigten, dass die Behandlung der PON2^{-/-}-Mäuse mit NAC keine Änderung in der Anzahl der Thrombozyten (Abbildung 31-B) im Vergleich zu unbehandelten PON2^{-/-}-Mäusen bewirkte. Auffallend ist, dass das MPV von PON2^{-/-}-Mäusen mit NAC gegenüber den unbehandelten PON2^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt war (Abbildung 31-A) und sich dem MPV des WT wieder annäherte. Dies deutet darauf hin, dass die anti-oxidative Eigenschaft der PON2 einen Einfluss auf das MPV ausübt, während es bei der erniedrigten Anzahl an Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe um direkte Effekte von PON2 handelt. Diese Erkenntnisse führten zu Analysen des Levels der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Thrombozyten, dargestellt in dieser Arbeit in Abschnitt 5.3.1.

5.2.2 PON2-Defizienz bewirkt eine Veränderung der Oberflächen-Expression verschiedener Rezeptor-Glykoproteine von murinen Thrombozyten

Für die normale Funktion der Thrombozyten, d.h. für die Mechanismen der Hämostase und Thrombose sind membranständigen Glykoproteine erforderlich. Diese Rezeptoren werden gemäß ihrer charakteristischen Molekülstruktur in vier Gruppen unterteilt: Integrine, leucinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp⁶⁰.

Zur Charakterisierung der verwendeten Mausmodelle (PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}) wurden die Expressionen der 5 wichtigsten Rezeptoren bzw. Teile des Rezeptorkomplexes von murinen Thrombozyten mittels Durchflussanalyse von Thrombozyten aus Plättchen-reichem Plasma (PRP) mit den entsprechenden spezifischen murinen Antikörpern bestimmt und gegen die WT-Kontrolle aufgetragen.

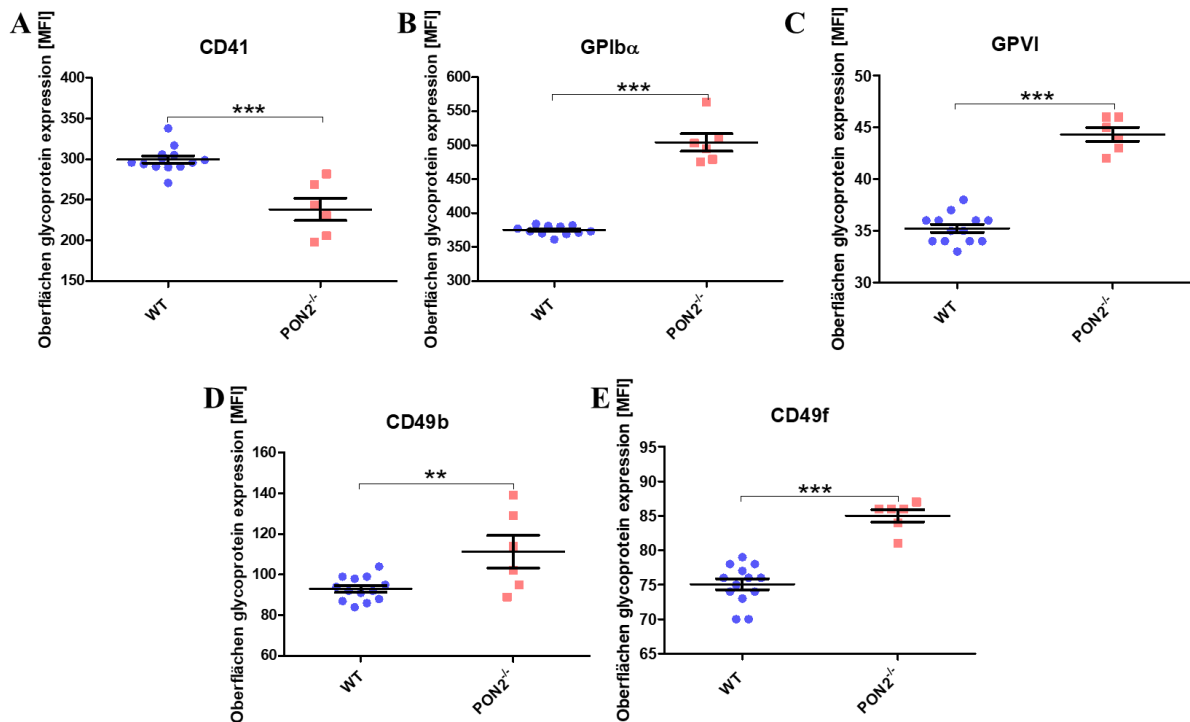


Abbildung 32: Rezeptoranalyse von PON2^{-/-}-Thrombozyten. Thrombozyten aus PRP wurden mit (A) *rat anti-mouse* CD41-FITC für den Fibrinogenrezeptor, (B) *rat anti-mouse* GPIb α -DyLight488 für die Untereinheit des vWF-Rezeptorkomplexes GPIb/V/IX, (C) *rat anti-mouse* GPVI-FITC für einen Kollagen bevorzugten Rezeptor (D) *hamster anti-rat* CD49b-FITC für den Kollagenrezeptor (CD49b/CD29) und (E) *rat anti-mouse* CD49f für den Lamininrezeptor (CD49f/CD29) gefärbt (n= 6-13). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. *** p<0,001; ** p<0,01, zweiseitiger T-Test.

Die Auswertung der Rezeptoranalyse von PON2^{-/-}-Mäusen zeigte, dass der Mangel an PON2 bei allen untersuchten murinen Rezeptoren zu signifikanten Veränderungen führt. Als einziger Rezeptor in dieser Analyse war die Oberflächenexpression von CD41 als Teil des Fibrinogenrezeptors im Vergleich zum WT erniedrigt (Abbildung 32-A). Im Gegensatz dazu wiesen alle anderen getesteten Rezeptoren (Abbildung 32-B-E) eine signifikante Erhöhung ihrer Expression auf den Oberflächen von PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zum WT auf. Auffallend ist die große Streuung der Werte für den Kollagenrezeptor CD49b/CD29 (Abbildung 32-D) von PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zu allen anderen untersuchten Rezeptoren.

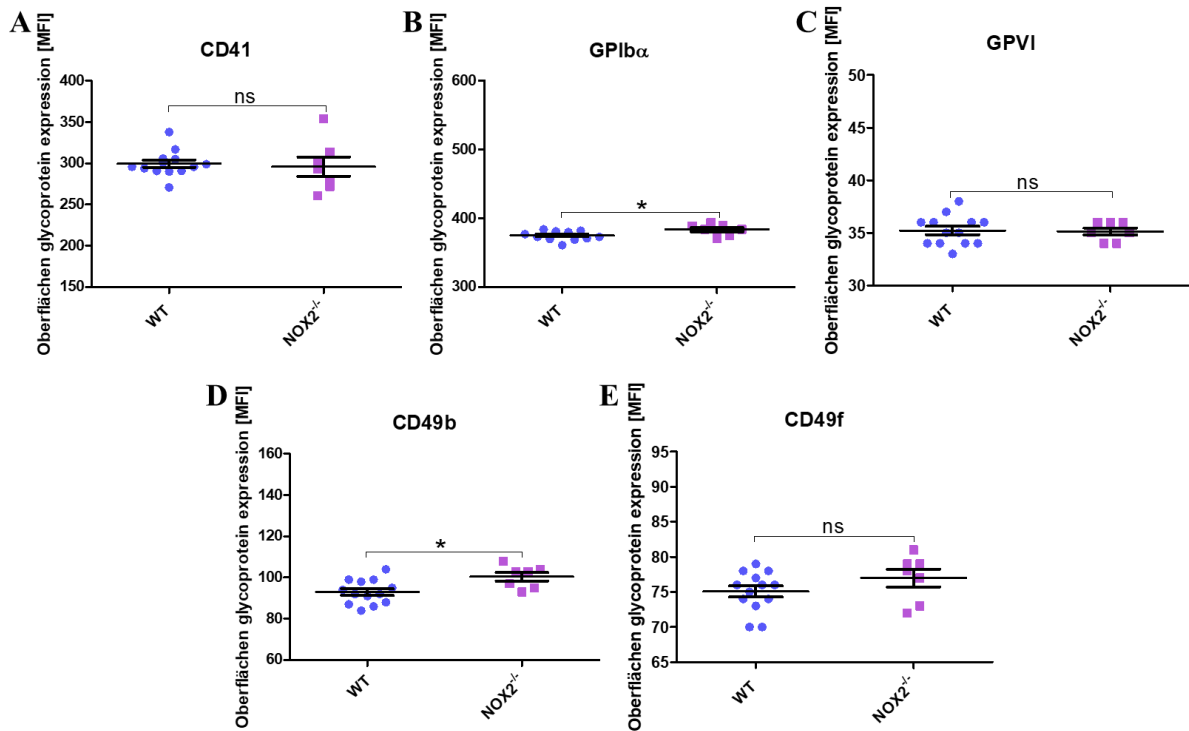


Abbildung 33: Rezeptoranalyse von NOX2^{-/-}-Thrombozyten. Thrombozyten aus PRP wurden mit (A) *rat anti-mouse* CD41-FITC für den Fibrinogenrezeptor, (B) *rat anti-mouse* GPIbα-DyLight488 für die Untereinheit des vWF-Rezeptorkomplexes GPIb/V/IX, (C) *rat anti-mouse* GPVI-FITC für einen Kollagen bevorzugten Rezeptor (D) *hamster anti-rat* CD49b-FITC für den Kollagenrezeptor (CD49b/CD29) und (E) *rat anti-mouse* CD49f für den Lamininrezeptor (CD49f/CD29) gefärbt (n= 7-13). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. * p< 0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die Deaktivierung des NOX2-Genes führte in der Rezeptoranalyse der wichtigsten Vertreter der murinen Rezeptoren für Thrombozyten zu keinen signifikanten Ergebnissen. Obgleich bei den Rezeptoren GPIbα (Abbildung 33-B) und CD49b (Abbildung 33-D) in der Oberflächenexpression eine einfache Signifikanz der Unterschiede von NOX2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zu den WT-Thrombozyten gefunden wurde, so sind diese Unterschiede so gering, dass eine biologische Bedeutung fraglich ist.

5.2.3 PON2 beeinflusst die Anzahl an δ-Granula in murinen Thrombozyten

Die Degranulation ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von Thrombozyten. Er beinhaltet die zytoplasmatische Exozytose gespeicherter Granula. Als Teil dieser Speichergranula enthalten die δ-Granula maßgebliche aggregationsfördernde Faktoren wie ADP oder ATP, aber auch Ca²⁺-Ionen als Cofaktor der plasmatischen Gerinnung⁶⁰.

Die Auswertung der δ-Granula in fixierten und mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersuchten Thrombozyten, zeigte einen signifikanten Einfluss der PON2 auf das Verhältnis der Anzahl an δ-Granula pro Anzahl an Thrombozyten, dargestellt zusammen mit zwei repräsentativen Bildern der Thrombozyten in der nachfolgenden Abbildung 34.

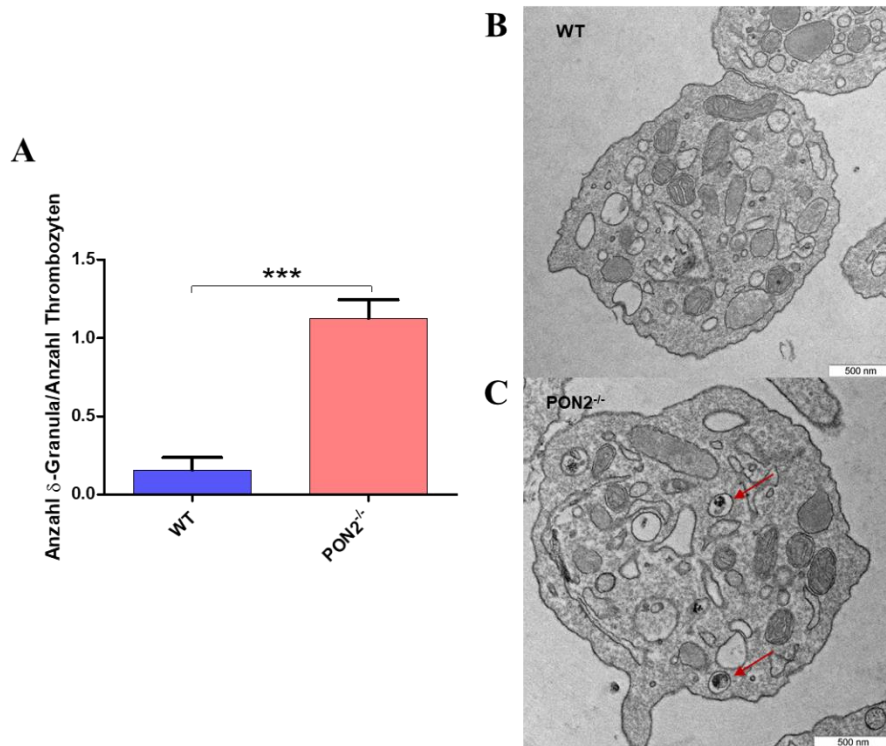


Abbildung 34: Vergleich der Anzahl der δ -Granula pro Anzahl der Thrombozyten in WT und PON2^{-/-}-Mäusen. (A) Auszählung der δ -Granula aus den entstandenen TEM-Bildern pro vorhandene Thrombozyten (n= 25-37). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. *** p<0,001; zweiseitiger T-test. (B) Repräsentatives Bild von einem Ultradünnschnitt eines WT-Thrombozyten und (C) Repräsentatives Bild von einem Ultradünnschnitt eines PON2^{-/-}-Thrombozyten. Rote Pfeile weisen auf die δ -Granula hin.

Zur Analyse der δ -Granula aus den Thrombozyten der verwendeten Mausmodelle PON2^{-/-} und NOX2^{-/-} mit dem entsprechendem WT, wurden diese mit Mepacrine, einem Acridin-Derivat beladen, welches an ADP und ATP in den δ -Granula bindet und durchflusszytometrisch im Ruhezustand gemessen.

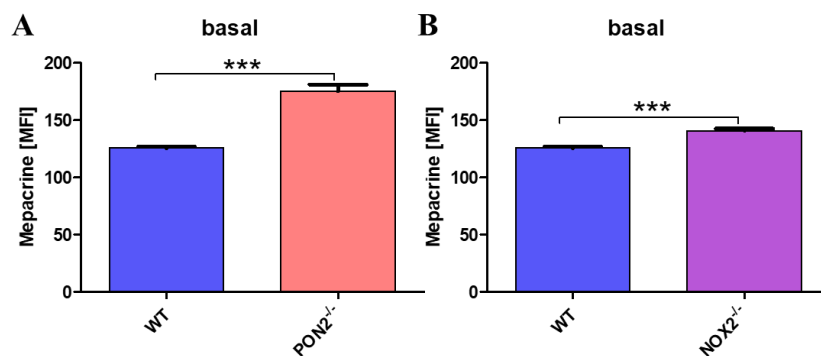


Abbildung 35: Die Beladung mit Mepacrine in den δ -Granula wird von PON2 und NOX2 beeinflusst. Thrombozyten aus PRP von (A) PON2^{-/-}- und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen wurden mit Mepacrin beladen (n= 4-14). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. *** p<0,001; zweiseitiger T-test.

Die Ergebnisse zeigten für die Mausmodelle PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}, dass die Beladung mit Mepacrine im Ruhezustand der Thrombozyten signifikant erhöht war (Abbildung 35). Dies steht für PON2^{-/-}-Thrombozyten im Zusammenhang mit einem erhöhten MPV (Abschnitt 5.2.1) bzw. mit der signifikant zu WT-Thrombozyten erhöhten Anzahl an δ -Granula (Abbildung 34) und damit einer generellen erhöhten Aufnahmekapazität. Die Differenz in der Beladung mit Mepacrine fällt bei den NOX2^{-/-}-Thrombozyten zum WT gering aus und eine biologische Bedeutung des in den Experimenten beobachteten signifikanten Unterschiedes ist fraglich.

5.3 Redox Kontrolle muriner Thrombozyten durch PON2 und NOX2

5.3.1 PON2 und NOX2 beeinflussen antagonistisch den oxidativen Stress in murinen Thrombozyten

Wie bereits im vorherigen Abschnitt (5.1.2) dieser Arbeit angesprochen, haben Studien gezeigt, dass PON2 im ER und den Mitochondrien lokalisiert ist und dort die Produktion der ROS abschwächt^{13;14}. Dies bedeutet, dass in PON2-defizienten Mäusen im Umkehrschluss eine gesteigerte Produktion von ROS vorherrschen sollte, was bereits für Endothelzellen¹³⁸, sowie tendenziell für hämatopoetische Stammzellen¹³⁹ nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu PON2, zu dem erste initiale Experimente durchgeführt wurden¹³⁸, gibt es für NOX2 bereits den Nachweis durch eine publizierte Studie, dass eine Inhibierung der ROS-produzierenden NOX2 zu einer Verringerung der ROS in murinen Thrombozyten führt¹⁴³.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die endogene ROS Produktion in Thrombozyten von WT sowie PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen basal und nach Aktivierung der Thrombozyten analysiert und verglichen. Dabei wurden zwei sensitive, unterschiedliche Methoden zur ROS-Bestimmung angewendet. Zum einen wurde das PRP mit dem ROS-Indikator CM-H₂DCFDA, zum anderen mit dem ROS-Indikator DHR123 angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Im Gegensatz zum weniger sensitiven CM-H₂DCFDA wird DHR123 hauptsächlich von H₂O₂ oxidiert¹⁴⁴. Somit lässt sich verifizieren, ob und welche Rolle beide Enzyme auf die Produktion von H₂O₂ in Thrombozyten nehmen. Dabei klassifizieren publizierte Daten zu NOX2 dieses Enzym bereits als Superoxid-Produzenten und nicht als H₂O₂-Produzenten^{104;145}.

5.3.1.1 Der Gehalt aller ROS in Thrombozyten steht in inverser Abhängigkeit zu PON2 und NOX2

Die Ergebnisse zur Kontrolle der Stimulation zeigten (Abbildung 36), dass es zu einer tendenziellen, sowie signifikanten Erhöhung der ROS-Produktion unabhängig der eingesetzten Agonisten Thrombin, Convulxin sowie dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 (Calcimycin) gekommen ist, die durch die durchflusszytometrische Erfassung des Indikators CM- H_2DCFDA gemessen wurde.

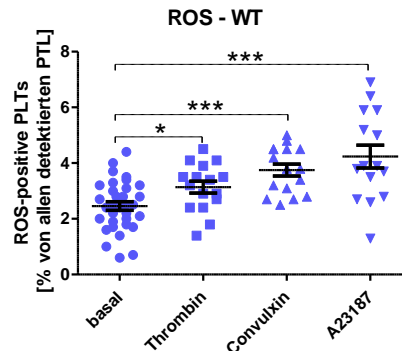


Abbildung 36: Stimulation der WT-Thrombozyten führt zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Aus dem PRP gewonnene Thrombozyten von WT-Mäusen wurden mit CM- H_2DCFDA beladen und die ROS basal sowie nach Zugabe von Thrombozyten-Agonisten durchflusszytometrisch bestimmt (n= 15-33). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$, zweiseitiger T-Test.

Im Vergleich zu den WT-Kontrollen ergaben sich bei der Untersuchung mit CM- H_2DCFDA sowohl für $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten, als auch für $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten signifikante Unterschiede bei Thrombozyten im Ruhezustand als auch nach ihrer Aktivierung. Eine PON2 -Defizienz führte dabei immer zu einem erhöhten ROS-Level gegenüber der WT-Kontrolle (Abbildung 37-A). Es zeigte sich ebenso, dass es nach der Aktivierung der Thrombozyten mit den Thrombozyten-Agonisten Convulxin oder Thrombin zu einer gesteigerten Produktion der ROS durch eine PON2 -Defizienz kommt und der ROS-Gehalt in den Thrombozyten im Vergleich zum WT nach der Inkubation mit dem entsprechenden Agonisten vermehrt ansteigt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Thrombozytenuntersuchungen der $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäuse zeigten $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäuse (Abbildung 37-B) konstant eine verringerte ROS-Produktion im Vergleich zum WT. Vergleichbar ist auch, dass die Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin bzw. Convulxin zu einem verringerten Anstieg des ROS-Gehaltes in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zum WT führte. Zusammenfassend spielen somit sowohl NOX2 als auch PON2 eine Rolle bei der Produktion der ROS während der Aktivierung der Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

Eine Ausnahme in den Ergebnissen ist die Aktivierung der Thrombozyten mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187. Bei dieser kommt es sowohl mit den Thrombozyten aus $\text{PON2}^{-/-}$ - als auch aus $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zum WT.

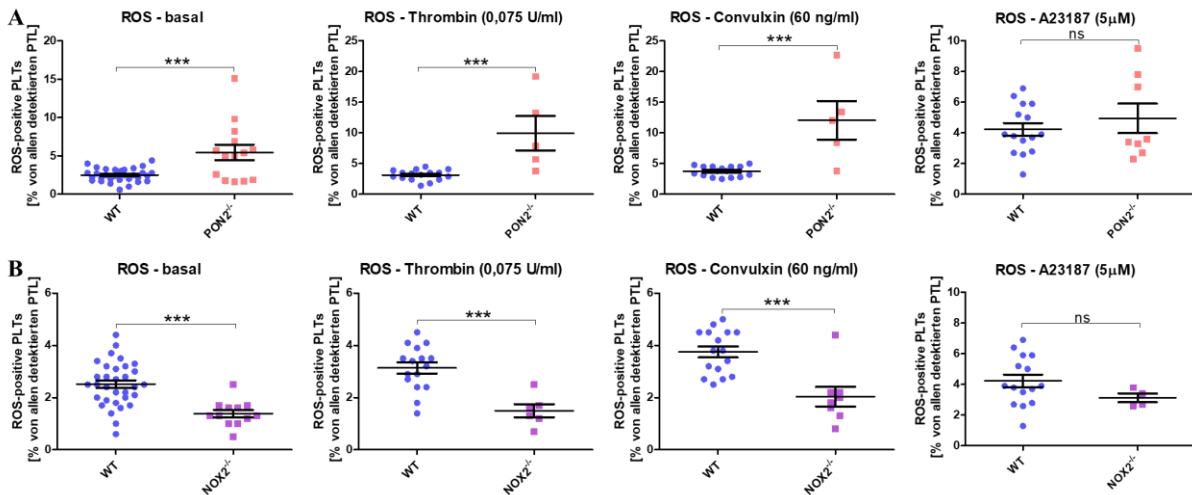


Abbildung 37: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen einen erhöhten, NOX2^{-/-}-Thrombozyten einen erniedrigten Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Aus dem PRP gewonnene Thrombozyten von (A) PON2^{-/-}-Mäusen und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen wurden mit CM-H₂DCFDA beladen und die ROS basal sowie nach Zugabe von Thrombozyten-Agonisten durchflusszytometrisch bestimmt und mit dem WT als Kontrolle verglichen (n= 5-32). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p<0,001; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

5.3.1.2 PON2 inhibiert die Produktion von H₂O₂ in murinen Thrombozyten

Ebenso wie in Abschnitt 5.3.1.1 zeigten die Ergebnisse zur Kontrolle der Stimulation, dargestellt in der nachfolgenden Abbildung, dass die Zugabe der Agonisten Thrombin und Convulxin zu den WT-Thrombozyten eine signifikante Erhöhung der ROS-Produktion, hauptsächlich der H₂O₂-Produktion, auslösen, die durchflusszytometrisch erfasst wurde.

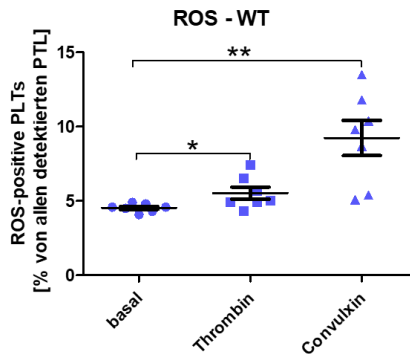


Abbildung 38: Die Stimulation der WT-Thrombozyten führt zu einer erhöhten Produktion an H₂O₂. Aus dem PRP gewonnene Thrombozyten von WT-Mäusen wurden mit DHR123 beladen und die ROS basal sowie nach Zugabe von Thrombozyten-Agonisten durchflusszytometrisch bestimmt (n= 7). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. ** p<0,01; * p<0,05, zweiseitiger T-Test.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung mit DHR123 mit PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Thrombozyten bestätigen die Resultate des nicht sensitiven ROS-Indikator CM-H₂DCFDA. Es ergaben sich im Vergleich zu den WT-Kontrollen gleichsam signifikante Änderungen im Ruhezustand der Thrombozyten sowohl für die PON2^{-/-}- (Abbildung 39-A), als auch für die NOX2^{-/-}-Mäuse (Abbildung 39-B), die eine Erhöhung bzw. eine Erniedrigung des ROS-Gehaltes, hauptsächlich des H₂O₂-Gehaltes in den Thrombozyten aufwiesen. Die PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigten zudem nur nach Aktivierung mit Thrombin signifikante Veränderungen, während die Aktivierung mit Convulxin bedingt durch die Streuung der Ergebnisse nicht statistisch signifikant war bzw. der Anstieg des ROS-Gehalt nach der Aktivierung im Vergleich zum WT stark verringert gewesen ist. Im Gegensatz zu PON2 hatte NOX2 keine Signifikanz im Vergleich zu den WT Kontrollen nach der Aktivierung der Thrombozyten, da ein im Vergleich zum WT erhöhter Anstieg des ROS-Gehaltes nach der Aktivierung mit Thrombin bzw. Convulxin zu beobachten war. Da das Ergebnis im Ruhezustand der NOX2^{-/-}-Thrombozyten aber bereits nur eine geringe, statistische Differenz zu den WT-Thrombozyten als Kontrolle aufwies, ist eine biologische Relevanz fraglich. Zusammenfassend zeigten nur die PON2^{-/-}-Thrombozyten eine biologische Signifikanz, was darauf hindeutet, dass die PON2 die Produktion von H₂O₂ in Thrombozyten inhibiert und NOX2 nicht an dieser beteiligt ist.

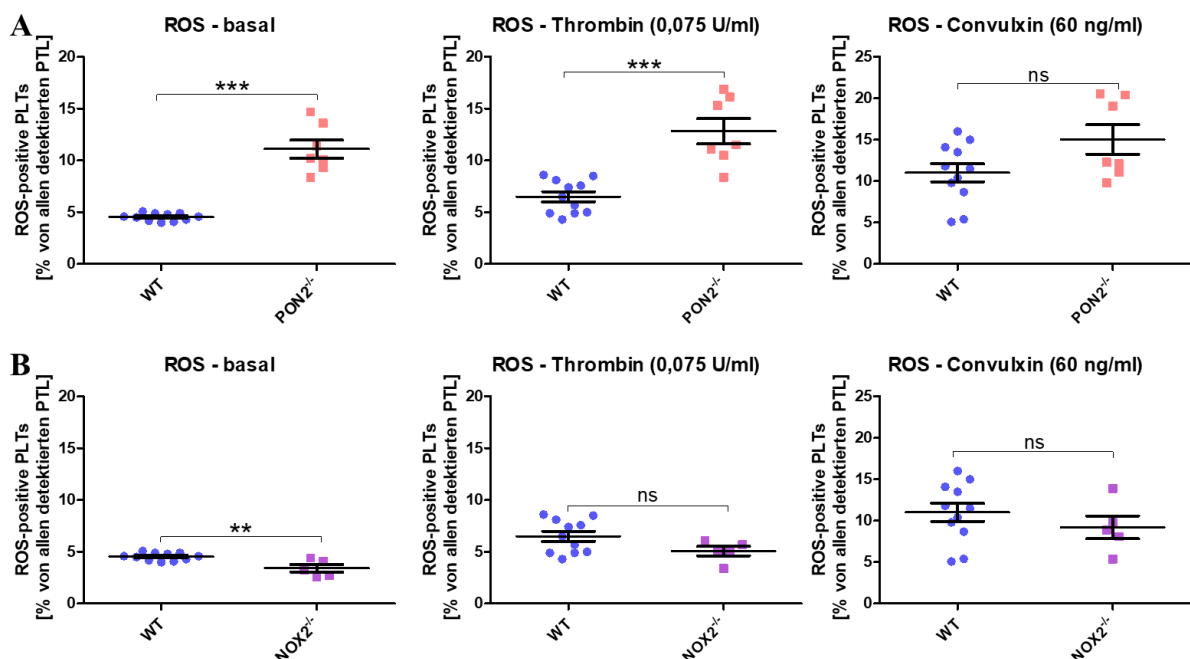


Abbildung 39: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Level an H₂O₂ an. Aus dem PRP gewonnene Thrombozyten von (A) PON2^{-/-}-Mäusen und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen wurden mit DHR123 beladen und die ROS basal sowie nach Zugabe von Thrombozyten-Agonisten durchflusszytometrisch bestimmt und gegen den WT als Kontrolle verglichen (n= 5-11). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p<0,001; **p<0,01; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

5.3.1.3 Die Gabe eines Antioxidans senkt den thrombozytären Gehalt an ROS

Da die anti-oxidativen Eigenschaften der PON2 Auswirkungen auf das MPV im Blutbild von PON2^{-/-} sowie mit NAC behandelten PON2^{-/-}-Mäusen hatte (Abschnitt 5.2.1), wurde zusätzlich bei der Färbung mit dem allgemeinen ROS-Indikator CM-H₂DCFDA der mit NAC behandelten PON2^{-/-}-Mauslinie untersucht, ob die orale Zugabe des Antioxidans NAC Einfluss auf das thrombozytäre ROS-Level nimmt.

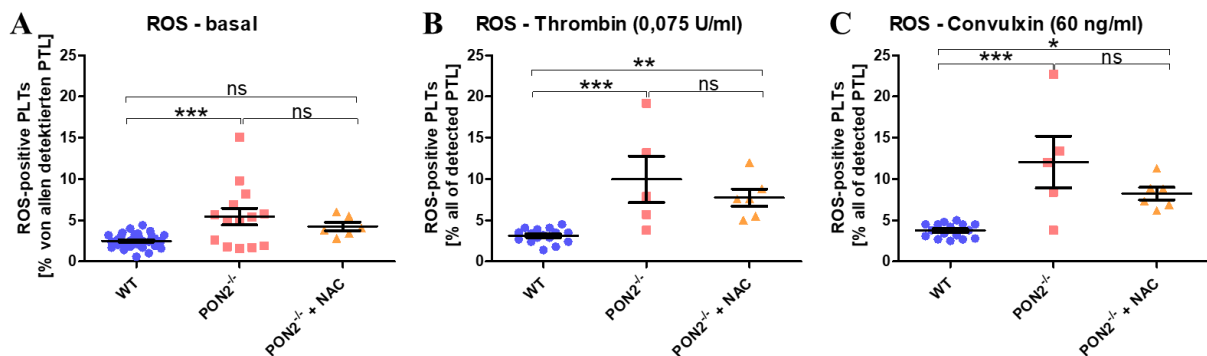


Abbildung 40: Das Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) nimmt Einfluss auf das thrombozytäre ROS-Level. Vergleich der aus dem PRP gewonnenen Thrombozyten von WT-, PON2^{-/-}- und mit NAC behandelten PON2^{-/-}-Mäusen. Die Thrombozyten wurden mit CM-H₂DCFDA beladen und die ROS (A) ohne Stimulation, (B) nach Stimulation mit Thrombin und (C) nach Stimulation mit Convulxin gemessen (n= 5-32). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, 1way-ANOVA mit Bonferroni's Posttest.

Die Ergebnisse zeigten, dass es unabhängig vom Zustand der Thrombozyten, ob im Ruhezustand (Abbildung 40-A), oder auch nach Aktivierung mit einem Thrombozyten-Agonisten (Abbildung 40-B+C) zu einer tendenziellen Abnahme des ROS-Gehaltes in den mit NAC behandelten PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zu den unbehandelten PON2^{-/-}-Thrombozyten kommt, was zu einer gleichzeitigen Annäherung an den ROS-Gehalt der WT-Kontrollgruppe geführt hat. Dies wird als Bestätigung für den Einfluss des Antioxidant NAC auf das thrombozytäre ROS-Level gewertet.

5.3.2 PON2- und NOX2-defiziente Mäuse weisen keine Schädigung der Mitochondrialen Membran in Thrombozyten auf

Mitochondrien spielen eine Schlüsselrolle in dem Energiemetabolismus der Zelle¹⁴⁶. In ihrem Kompartiment befinden sich fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung, die für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) zuständig sind. Die Bildung von überschüssigen ROS führt zu einer veränderten Membranpermeabilität durch Lipidperoxidation, die ein Freisetzen von Proteinen aus dem Intermembranraum und in Konsequenz ein Absterben der Zelle zur Folge haben.

Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Defizienz eines anti-oxidativen Enzyms bzw. eines pro-oxidativen Enzyms eine Auswirkung auf die Mitochondrien der Thrombozyten besitzen. Dazu wurde durch den MitoTracker™ Orange CM-H₂TMRos die Mitochondrien-Anzahl von Thrombozyten aus PON2^{-/-} sowie NOX2^{-/-}-Mäusen aus PRP im Ruhezustand durchflusszytometrisch bestimmt und mit dem WT als Kontrolle verglichen.

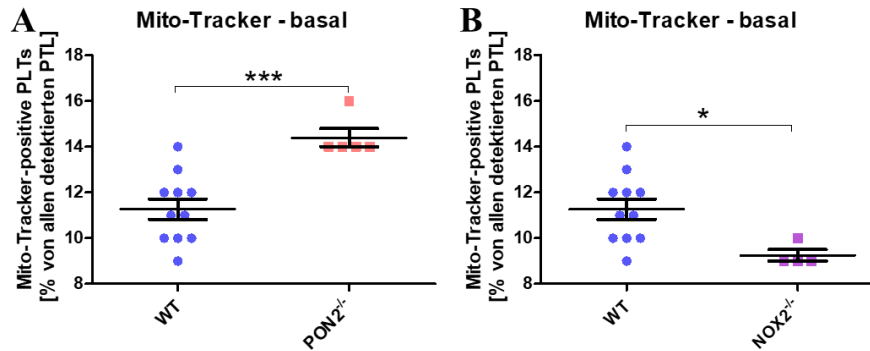


Abbildung 41: PON2 und NOX2 beeinflussen das Mitochondrien-Anzahl in murinen Thrombozyten. Thrombozyten aus PRP von (A) PON2^{-/-}-Mäusen und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen mit den jeweiligen WT-Kontrollgruppen wurden mit dem Mito Tracker Orange CM-H₂TMRos angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (n= 4-11). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p< 0,001; * p<0,05, zweiseitiger T-Test.

Abbildung 41 zeigt, dass eine Defizienz von PON2 zu einer signifikant höheren Anzahl an Mitochondrien in Thrombozyten, wahrscheinlich bedingt durch ein höheres MPV der PON2^{-/-}-Thrombozyten, eine Defizienz von NOX2 zu einer signifikant erniedrigten Anzahl an Mitochondrien in Thrombozyten führt.

Ebenfalls wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Antikörpers JC-1 das mitochondriale Membranpotenzial der Thrombozyten aus PRP von PON2^{-/-} sowie von NOX2^{-/-}-Mäusen im Ruhezustand und nach Zugabe eines Ca²⁺-Ionophors gemessen und mit dem WT als Kontrolle verglichen. Die Untersuchungen (Abbildung 42) zeigten keinen signifikanten Unterschied unabhängig vom thrombozytären Zustand im mitochondrialen Membranpotenzial der Thrombozyten aus PON2^{-/-} bzw. NOX2^{-/-}-Mäusen.

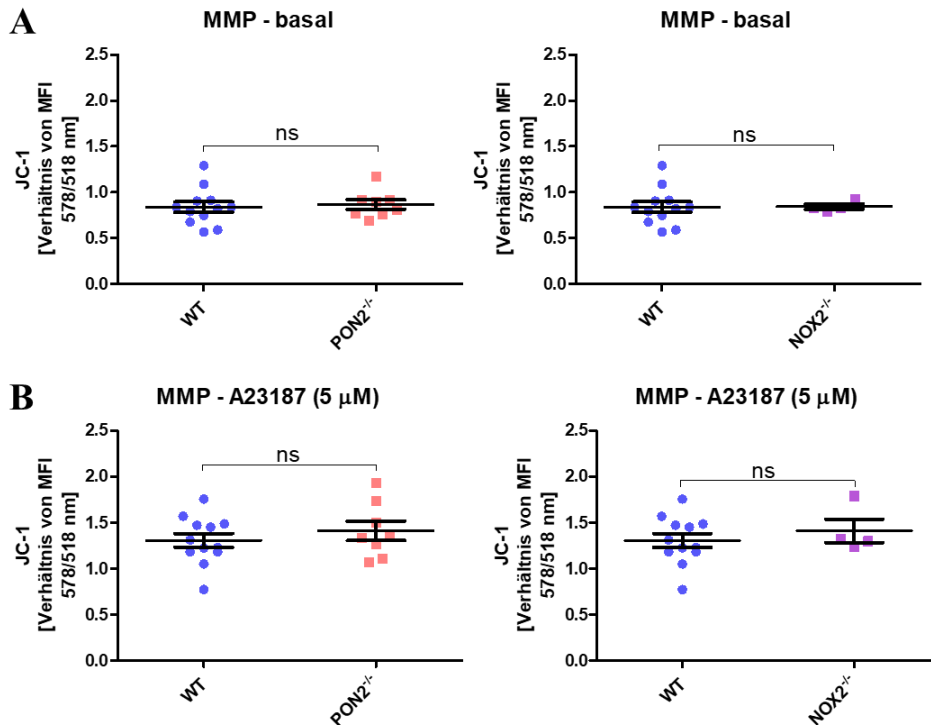


Abbildung 42: Keine Veränderung des Membranpotenzials durch PON2- oder NOX2-Defizienz. Das mitochondriale Membranpotenzial von Thrombozyten aus PRP von PON2^{-/-}-Mäusen und NOX2^{-/-}-Mäusen wurde (A) im Ruhezustand und (B) nach Zugabe eines Ca²⁺-Ionophors durch den mitochondrialen Marker JC-1 mittels FACS gemessen. **Linke Spalte:** WT- vs. PON2^{-/-}, **rechte Spalte:** WT- vs. NOX2^{-/-} (n= 4-11). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. Ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Zusammenfassend zeigten Thrombozyten von PON2^{-/-}- bzw. NOX2^{-/-}-Mäusen eine signifikant veränderte Mitochondrien-Anzahl, jedoch weisen diese Mitochondrien keine Schädigung ihres Membranpotenzials auf. Dies würde messbar durch die vermehrte Entstehung von sog. J-Monomeren und dem gleichzeitigen Abbau von sog. J-Aggregaten das Verhältnis gegen 0 laufen lassen.

5.4 Einfluss von PON2 und NOX2 auf den intrazellulären pH-Wert von Thrombozyten

5.4.1 Der intrazelluläre pH-Wert ist in PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}-defizienten murinen Thrombozyten unverändert

Publizierte Studien der Arbeitsgruppe belegen, dass PON2 das Lakton 3OC12 (N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone) enzymatisch hydrolysiert und damit eine saure Verbindung generiert. Dies führt zum Endergebnis, dass PON2 Einfluss auf den zytoplasmatischen bzw. mitochondrialen pH-Wert nimmt und diesen erniedrigt¹⁴⁷.

Da der effektive Ablauf der Hämostase, d.h. die Funktion der Thrombozyten vom pH-Wert abhängt¹⁴⁸, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Defizienz von PON2 bzw. NOX2 den intrazellulären pH-Wert der murinen Thrombozyten beeinflusst.

Dazu wurde durchflusszytometrisch und mit Hilfe des fluoreszierenden pH-Wert Indikators SNARF-4 der intrazelluläre pH-Wert von Thrombozyten von PON2^{-/-} sowie von NOX2^{-/-}-Mäusen aus PRP im Ruhezustand und nach Zugabe eines Ca²⁺-Ionophors gemessen und mit dem WT als Kontrolle verglichen.

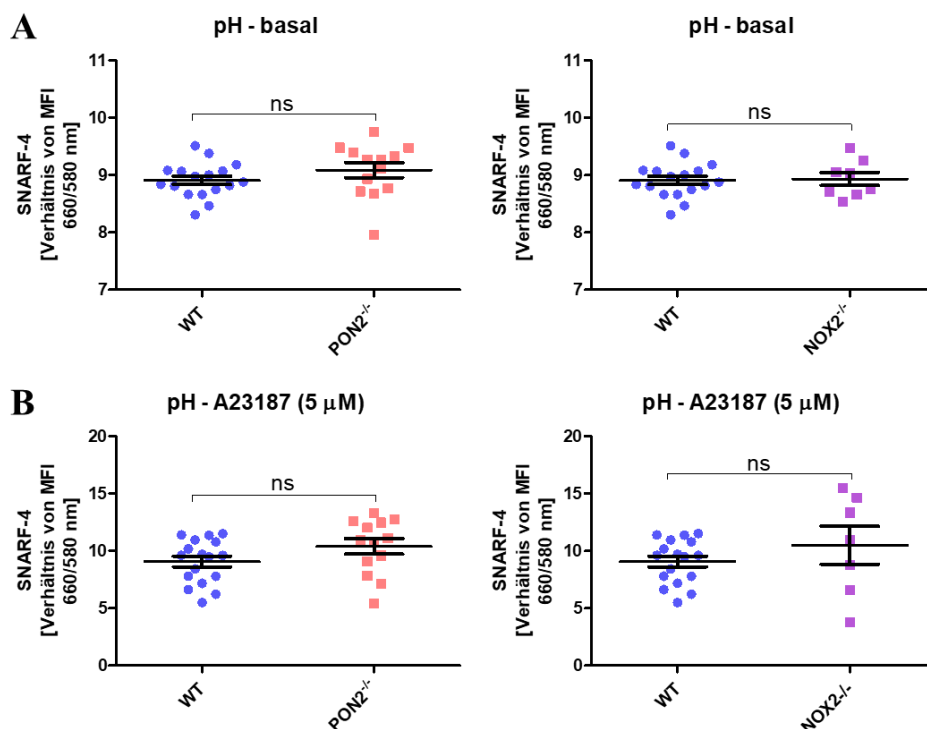


Abbildung 43: PON2- und NOX2-Defizienz verursachen keine Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Thrombozyten. Thrombozyten aus PRP von PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}-Mäusen wurden mit dem pH-Wert Indikator SNARF-4 beladen und mittels FACS die pH-abhängige Wellenlängenverschiebung der Emission im sauren (580 nm) und basischen (660 nm) Milieu im (A) Ruhezustand und (B) Zustand nach Aktivierung mit einem Kalzium-Ionophor bestimmt. **Linke Spalte:** WT vs. PON2^{-/-}, **rechte Spalte:** WT vs. NOX2^{-/-} (n= 8-17). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. Ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die durchflusszytometrischen Analysen in Abbildung 43 ergaben keinen signifikanten Unterschied, sowohl für PON2^{-/-} als auch für NOX2^{-/-}-Thrombozyten. Das bedeutet, dass sowohl PON2 als auch NOX2 basal und auch nach Aktivierung mit Ca²⁺-Ionophor der Thrombozyten den intrazellulären pH-Wert nicht beeinflussen.

5.5 Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Thrombozytenfunktionen

5.5.1 Thrombozyten zeigen einen von PON2 und NOX2 abhängigen pro-koagulantem Status *ex vivo*

Es wurde bereits in publizierten Promotionsarbeiten^{87;138;139} unserer Arbeitsgruppe sowie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 5.2.1) gezeigt, dass PON2 und NOX2 mit ihren anti- bzw. pro-oxidativen Eigenschaften Einfluss auf die Produktion der in den Zellen vorhandener ROS nehmen. Da ein erhöhter Gehalt an ROS die pro-koagulatorische Aktivität der Thrombozyten steigert¹⁴⁹, wurde in den folgenden Unterabschnitten die Bindung der Thrombozyten an verschiedene Rezeptoren unter dem Einfluss der PON2 und der NOX2 im Ruhezustand untersucht und die erhaltenen Ergebnisse analysiert.

Zusammengefasst zeigten die Resultate der nachfolgenden Abschnitte, dass beide Enzyme Einfluss auf den pro-koagulantem Status der Thrombozyten *ex vivo* nehmen.

5.5.1.1 vWF bindet verstärkt an PON2^{-/-} Thrombozyten und vermindert an NOX2^{-/-} Thrombozyten *ex vivo*

Die primäre Funktion des multimeren Glykoproteins von-Willebrand-Faktor (vWF) ist die Bindung seiner spezifischen Domänen an Faktoren, die an der Blutgerinnung beteiligt sind. Speziell ist vWF involviert als Bindung zwischen den Thrombozyten und der endothelialen Gefäßwand (Thrombozytenadhäsion) sowie als Trägerprotein des Gerinnungsfaktors FVIII, der in der plasmatischen Gerinnung benötigt wird¹⁵⁰. Zusätzlich bindet vWF verstärkt an bereits von Agonisten aktivierte Thrombozyten¹⁵¹.

Da erste initiale Versuche¹³⁸ einen Einfluss der PON2 auf die Thrombozyten zeigten und bereits publizierte Daten für NOX2^{-/-}-Mäuse vorhanden waren¹⁴⁰, sollte der Versuch für eine detaillierte Aussage wiederholt und mit verschiedenen Konzentrationen an Botrocetin ausgebaut und durchgeführt werden. Dazu wurden die Thrombozyten aus PRP mit verschiedenen Konzentrationen an Botrocetin behandelt und mittels FACS durchflusszytometrisch analysiert.

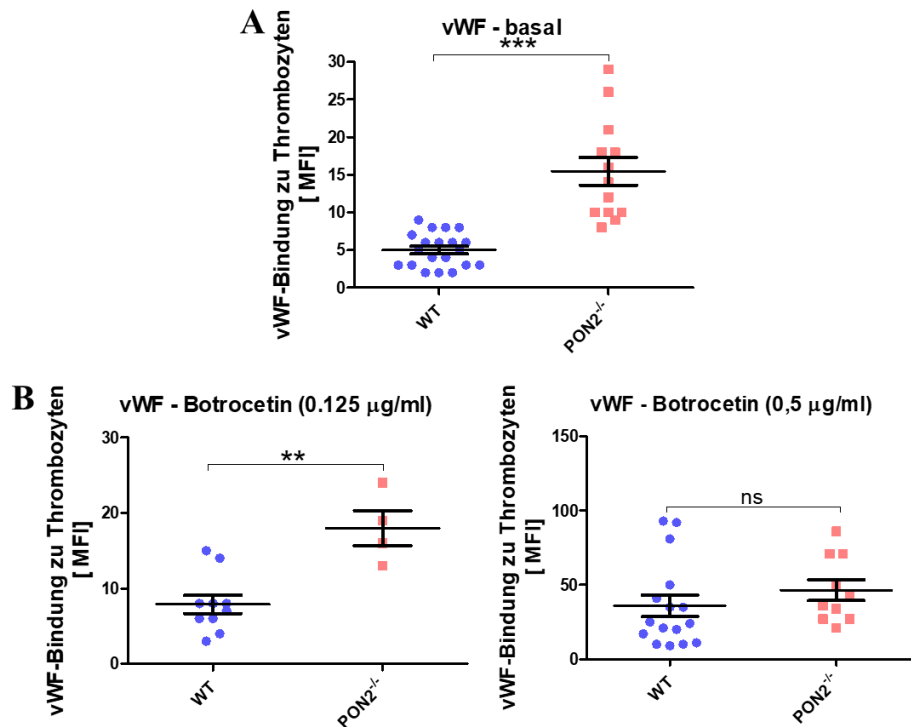


Abbildung 44: vWF bindet verstärkt an PON2^{-/-}-Thrombozyten unter basalen Bedingungen und nach moderater Botrocetin-Behandlung. Aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen wurde PRP isoliert und die vWF-Bindung an (A) unbehandelten und (B) an mit Botrocetin stimulierten Thrombozyten mittels eines fluoreszenz-gekoppelten anti-vWF-Antikörpers durchflusszytometrisch gemessen (n= 4-20). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. *** p< 0,001; ** p<0,01; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die FACS-Analyse zeigte zusammenfassend eine deutlich verstärkte Bindung von vWF an Thrombozyten von PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen. Unter basalen Bedingungen (Abbildung 44-A) war die erhöhte Bindung am stärksten ausgeprägt, als es in mit Botrocetin-aktivierten Thrombozyten zu beobachten war. Es zeigte sich dabei, dass die Stimulation mit der niedrigeren Botrocetin-Konzentration einen deutlicheren signifikanten, erhöhten Effekt aufwies, als die höhere gesättigte Konzentration (Abbildung 44-B), bei der die statistische Signifikanz nicht mehr vorhanden war und die Ergebnisse der PON2^{-/-}-Thrombozyten sich dem WT wieder annäherten.

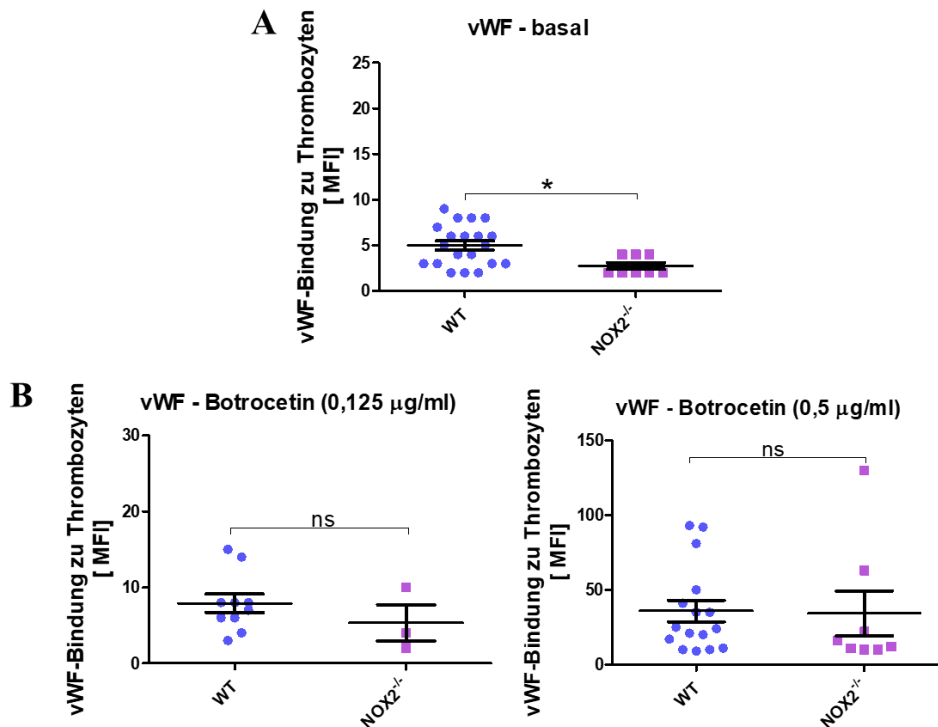


Abbildung 45: vWF bindet vermindert an $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten unter basalen Bedingungen. Aus $\text{NOX2}^{-/-}$ - und WT-Mäusen wurde PRP isoliert und die vWF-Bindung an (A) unbehandelten und (B) an mit Botrocetin stimulierten Thrombozyten mittels eines fluoreszenz-gekoppelten anti-vWF-Antikörpers durchflusszytometrisch gemessen ($n=3-20$). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Im Gegensatz zu den Resultaten der $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten zeigte die FACS-Analyse für die $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten eine statistisch signifikant verminderte vWF-Bindung im Ruhezustand im Vergleich zu WT-Thrombozyten (Abbildung 45-A), wohingegen nach der Stimulation mit Botrocetin die Thrombozyten der $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäuse keinen Unterschied zu ihrer WT-Kontrolle aufwiesen (Abbildung 45-B).

5.5.1.2 $\text{PON2}^{-/-}$ Mäuse zeigen eine verstärkte, $\text{NOX2}^{-/-}$ Mäuse eine verringerte Exposition von anionischen Phospholipiden auf der Thrombozytenoberfläche *ex vivo*

Die Funktion der durch Agonist-induzierten Exposition der anionischen Phospholipide auf der Thrombozytenoberfläche, insbesondere des Phosphatidylserin (PS) ist die Katalyse der enzymatischen Gerinnungskaskade. Sie ermöglichen die Bindung von Gerinnungsfaktoren mit Gla-Domäne auf der Thrombozytenoberfläche. Dies führt zu einer gesteigerten Thrombinbildung auf der Thrombozytenoberfläche und damit zur Aktivierung weiterer Thrombozyten in der Umgebung sowie zur Verstärkung des bereits aktivierten Thrombozyten durch den starken Thrombozytenagonisten Thrombin über die Reaktion mit den auf der Thrombozytenoberfläche befindlichen PAR (engl. *Protease-Activated-Rezeptor*).

Infolge dessen erhöht sich der Anteil des auf der Oberfläche exponierten PS um ein Vielfaches und hat eine deutliche Steigerung der gerinnungsaktivierenden Funktion der Thrombozyten zur Folge^{60;152}.

Initiale Versuche der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass PON2^{-/-}-Thrombozyten vermehrt PS auf ihrer Zelloberfläche im Ruhezustand tragen¹³⁸. Dies führte zum Ausbau der Untersuchungen der PS-Expression auf Thrombozyten von PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen und deren WT-Kontrolle unter basalen Bedingungen und nach Aktivierung mit einem Thrombozyten-Agonisten in Abhängigkeit von Ca²⁺. Dazu wurde PRP entweder mit dem Ca²⁺-abhängigen Annexin V oder dem Ca²⁺-unabhängigen Lactadherin gefärbt. Beide eingesetzten Proteine waren mit einem Fluorophor gekoppelt, um die gefärbten Thrombozyten im Anschluss durchflusszytometrisch erfassen zu können.

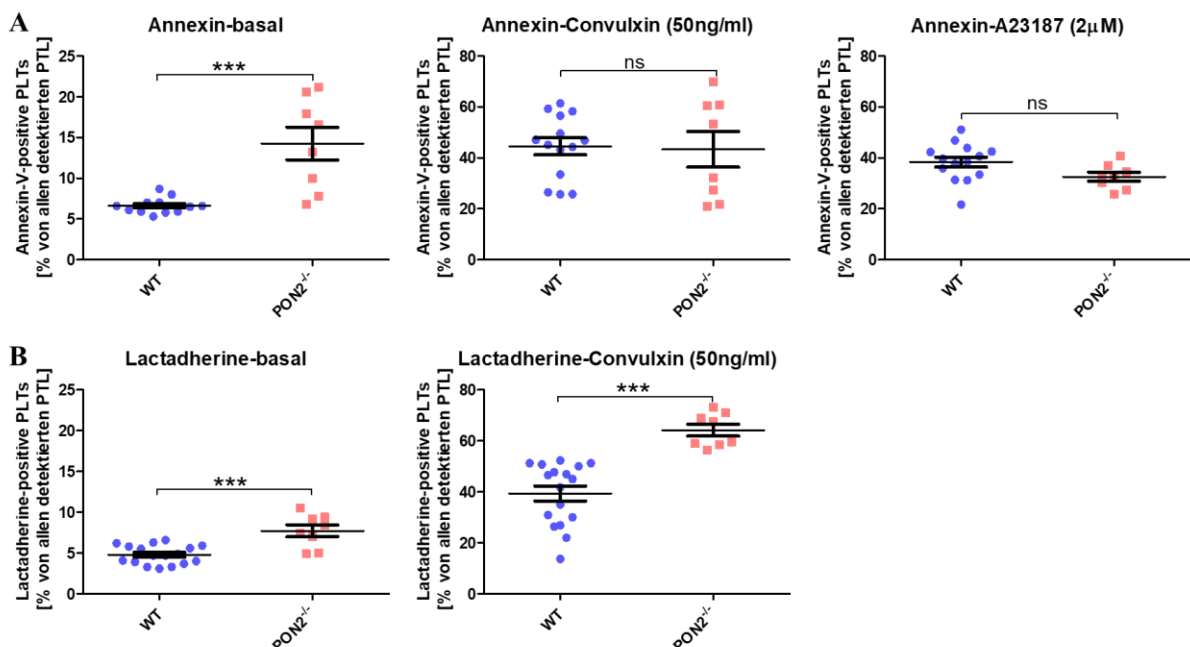


Abbildung 46: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen im basalen Zustand und nach Stimulierung mit Convulxin abhängig von Ca²⁺ eine erhöhte Exposition von anionischen Phospholipiden. Thrombozyten aus Plättchenreichem-Plasma (PRP) von PON2^{-/-}- und WT-Mäusen blieben unbehandelt oder wurden mit Convulxin oder A23187 stimuliert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS durch Färbung mit (A) dem kalziumabhängigen Annexin-V und Zugabe von 10 mM Ca²⁺ oder (B) dem kalziumunabhängigen Lactadherin (n= 8-17). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *** p<0,001; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die Auswertung beider Experimente zeigte, dass die Thrombozyten der PON2^{-/-}-Mäuse *ex vivo* unabhängig von Kalzium einen signifikant erhöhten Anteil an anionischen Phospholipiden auf der Oberfläche bilden im Vergleich zu WT-Mäusen. In Antwort auf die Zugabe des Thrombozyten-Agonisten Convulxin war die Exposition an Phospholipiden auf der Oberfläche von PON2^{-/-}-Thrombozyten beim kalziumabhängigen Annexin-V nicht signifikant im Vergleich zu den WT-Thrombozyten (Abbildung 46-A).

Im Gegensatz dazu blieb die Exposition von PS von $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten beim Ca^{2+} -unabhängigen, PS-spezifischen Lactadherin signifikant erhöht im Vergleich zu der WT-Kontrolle (Abbildung 46-B).

Dies führt zu dem Ergebnis, dass im basalen Zustand eine Defizienz von PON2 eine prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten bewirkt, aber auch die Exposition von anionischen Phospholipiden, speziell von PS in $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten nach ihrer Aktivierung in Abhängigkeit von Kalzium beeinflusst wird.

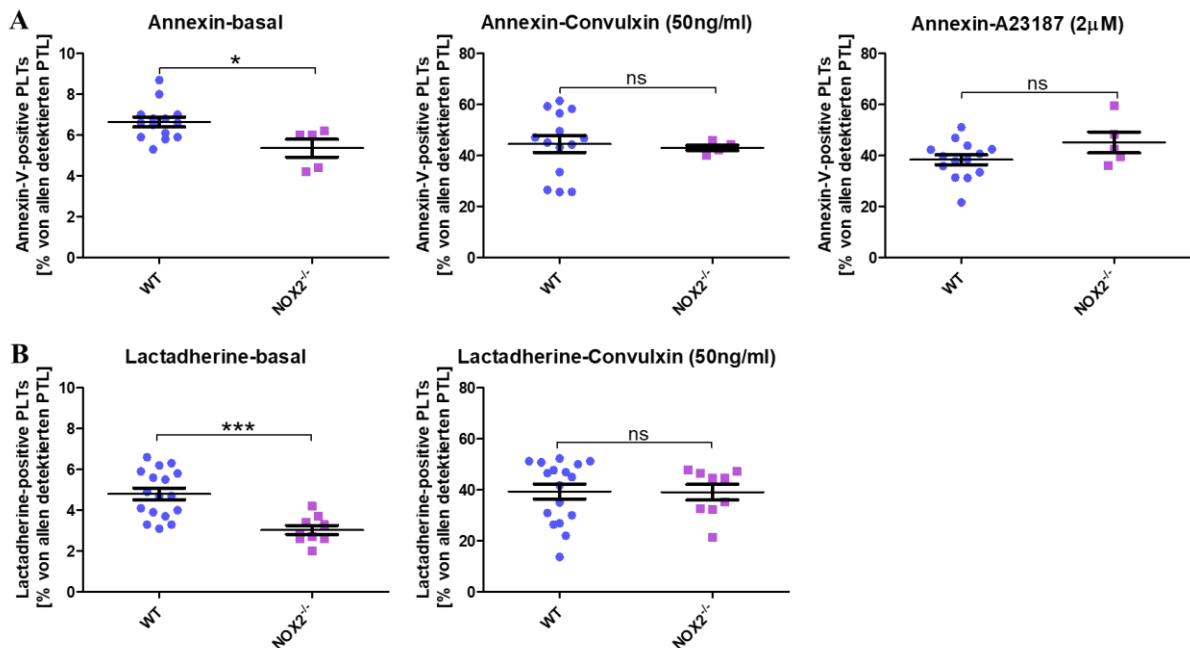


Abbildung 47: $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten zeigen eine geringere Exposition an anionischen Phospholipiden *ex vivo*. Thrombozyten aus Plättchen-reichem-Plasma (PRP) von $\text{NOX2}^{-/-}$ und WT-Mäusen blieben unbehandelt oder wurden mit Convulxin oder A23187 stimuliert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS durch Färbung mit (A) dem kalziumabhängigen Annexin-V und Zugabe von 10 mM Ca^{2+} oder (B) dem kalziumunabhängigen Lactadherin (n= 6-17). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten zeigten die Auswertungen beider Experimente für die $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten eine signifikante und kalziumunabhängige erniedrigte Phospholipid-Exposition auf der Thrombozytenoberfläche *ex vivo* im Vergleich zu den WT-Thrombozyten (Abbildung 47). Dagegen wies die Stimulation der Thrombozyten mit Convulxin nach, dass eine Defizienz von NOX2 unabhängig von Kalzium zu keinem Unterschied im Vergleich zum WT führte.

5.5.1.3 Der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa ist *ex vivo* auf PON2-defizienten murinen Thrombozyten nicht aktiviert

Zentrale Bedeutung in der Thrombozytenaggregation hat der Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa). Thrombozyten, die durch einen Agonisten aktiviert wurden, legen auf ihrer Oberfläche durch Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors Bindungsstellen für Fibrinogen frei¹⁵³. Über diese „Fibrinogenbrücken“ zwischen zwei benachbarten Thrombozyten kann sich ein Thrombozytenmikroaggregat bilden⁶⁰.

Um eine mögliche *ex vivo* Aktivierung des GPIIb/IIIa auf Thrombozyten zu überprüfen und bereits vorhandene Resultate¹³⁸ auszubauen und zu bestätigen, wurden Thrombozyten aus PRP, so wie, als unabhängige Gruppe, gewaschene Thrombozyten mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen den aktivierten Fibrinogenrezeptor (JON/A) gefärbt.

Die durchflusszytometrische Quantifizierung erfolgte für die Mausmodelle PON2^{-/-}, NOX2^{-/-} und deren WT-Kontrolle durch FACS-Analyse.

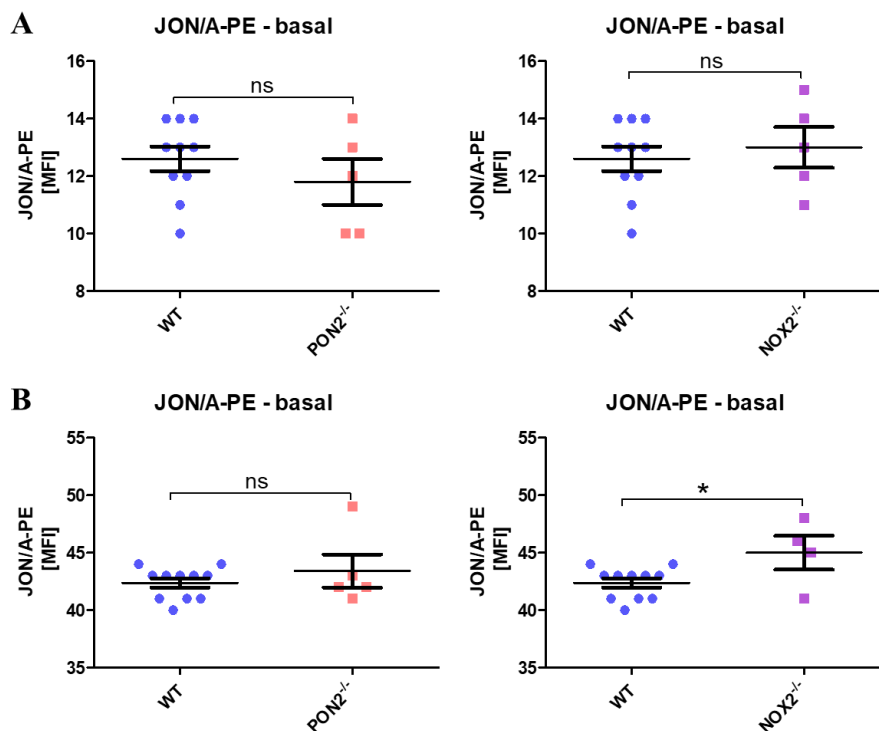


Abbildung 48: PON2^{-/-} und NOX2^{-/-} Thrombozyten zeigen *ex vivo* keinen Unterschied zum WT bei der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors. Thrombozyten von PON2^{-/-}, NOX2^{-/-} und WT-Mäusen wurden (A) aus Plättchen-reichem-Plasma (PRP) isoliert oder (B) gewaschen und mit einem Fluoreszenz-konjugierten Antikörper gegen den aktivierten Fibrinogenrezeptor gefärbt (n= 4-11). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Abbildung 48 zeigte, dass die Defizienz sowohl von PON2 als auch von NOX2 keine Auswirkungen im basalen Zustand auf die Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa) im Vergleich zum WT haben. Auffallend war die leicht signifikante Erhöhung der gewaschenen NOX2^{-/-}-Thrombozyten, die als statistisch aber nicht als biologisch relevant eingeordnet wurde sowie die allgemein erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität der gewaschenen Thrombozyten im Vergleich zu den Thrombozyten aus PRP, was auf eine leichte Voraktivierung der Thrombozyten durch den Waschprozess und Zentrifugation hinweisen könnte.

5.5.1.4 PON2 und NOX2 beeinflussen die Exozytose der α -Granula *ex vivo* von murinen Thrombozyten gegensätzlich

Eine weitere Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation hat P-Selektin. Bei Aktivierung des Thrombozyten kommt es durch Exozytose der α -Granula an die Oberfläche, wo es rasch exprimiert wird¹⁵⁴. Dort spielt es eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. Seine Funktion ist die Förderung der Anlagerung an Leukozyten sowie die Induktion von inflammatorischen Reaktionen in Leukozyten.

Um zu prüfen, ob die Expression dieses Aktivierungsmarkers auf der Oberfläche von PON2 bzw. NOX2 beeinflusst wird und dabei vorrangigene und teilweise publizierte initiale Arbeiten^{138;156} auszubauen, wurde PRP sowie als unabhängige Gruppe gewaschene Thrombozyten jeweils von PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen und deren WT-Kontrolle mit einem Antikörper gefärbt. Der Antikörper war mit einem Fluorophor gekoppelt und konnte dabei nur an das P-Selektin binden, wenn sich dieses bereits auf der Oberfläche befand. Die Quantifizierung erfolgte durch die FACS-Analyse.

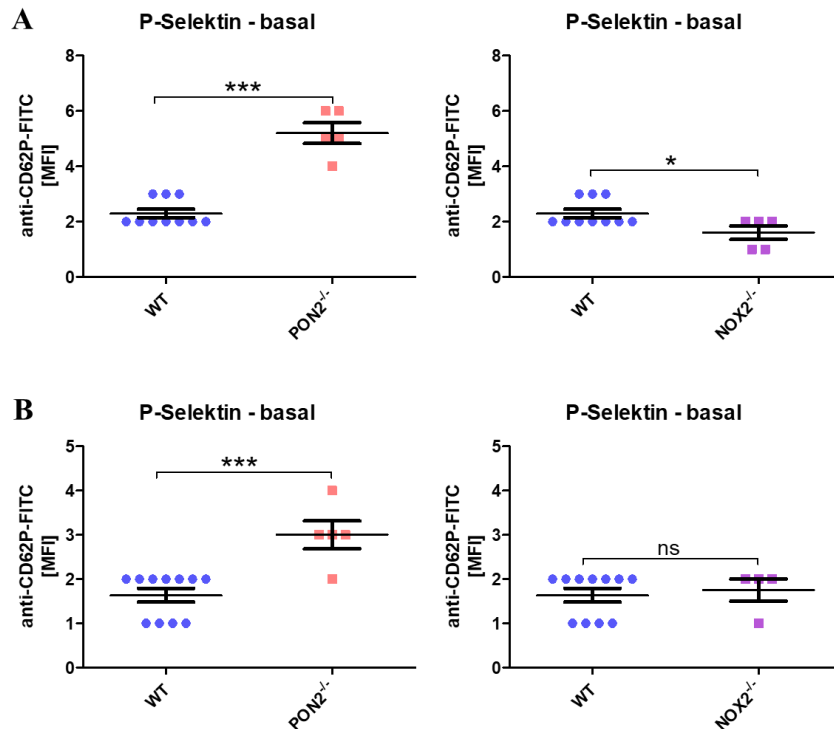


Abbildung 49: PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine gegensätzliche Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. Thrombozyten von PON2^{-/-}-, NOX2^{-/-}- und WT-Mäusen wurden (A) aus Plättchen-reichem-Plasma (PRP) isoliert oder (B) gewaschen und mit einem Fluorophor-konjugierten Antikörper gegen das auf der Oberfläche exprimierte P-Selektin gefärbt (n= 4-11). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. ***p<0,001; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die aus der FACS-Analyse erhaltenen Daten zeigten für PON2^{-/-}-Thrombozyten eine signifikante Erhöhung des sich auf der Oberfläche präsentierenden P-Selektin im Vergleich zum WT (Abbildung 49). Dies beweist, dass PON2 die inflammatorischen Eigenschaften der Thrombozyten beeinflusst. Im Vergleich zu NOX2^{-/-}-Thrombozyten wurden diese Ergebnisse sowohl für Thrombozyten aus PRP als auch für gewaschene Thrombozyten erzielt. Für die Thrombozyten aus NOX2^{-/-}- Mäusen zeigte sich nur in Thrombozyten aus isolierten PRP eine leicht signifikante Abnahme des sich auf der Oberfläche präsentierenden P-Selektins im Vergleich zum WT.

Dieser Unterschied war nicht mehr in gewaschenen Thrombozyten nachzuweisen. Zusätzlich fiel im Vergleich der gewaschenen WT-Thrombozyten zu den Thrombozyten aus WT-PRP auf, dass die mittlere Fluoreszenzintensität und damit die Expression des P-Selektin bei gewaschenen Thrombozyten erniedrigt war.

5.5.2 Agonisten induzierte Stimulation führt zu einer Veränderung des Aktivitätsstatus der Thrombozyten von PON2^{-/-} und NOX2^{-/-} Mäuse

Im vorherigen Abschnitt 5.5.1 wurde bereits ein Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Thrombozytenaktivierung *ex vivo* festgestellt. Auf Grund dessen wurde in diesem Abschnitt durch komplementäre Ansätze untersucht, ob dieser Einfluss auch bei der Agonisten-induzierten Stimulation der Thrombozyten vorhanden ist. Zur Aktivierung der Thrombozyten können dabei mehrere komplexe Pfade führen, grundlegend erfolgt die Aktivierung durch zwei prinzipielle Mechanismen⁷⁰. Zum einen über die Ligandenbindung von Kollagen, Fibrin, oder Podoplanin an das Glykoprotein VI (GP VI) oder den *C-Typ-Lectin-like-Rezeptor 2* (CLEC 2), die stimulierende Signalkaskaden z.B. bei GP VI über die Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotivsequenz (ITAM) des mit ihm verbundenen FcR γ in Thrombozyten über die Aktivierung der Phospholipase C γ auslösen und dabei die zytosolische Ca²⁺-Konzentration erhöhen¹⁵⁷. Zum anderen kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten über die Kopplung der Phospholipase C β durch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin, über GTP-bindende G-Proteine als deren Rezeptoren¹⁵⁸.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse in den nachfolgenden Unterabschnitten dieses Kapitels, dass sowohl PON2, als auch NOX2 Einfluss auf die Signaltransduktionswege zur Aktivierung der Thrombozyten nehmen.

5.5.2.1 Die Agonisten-induzierte Aktivierungsreaktivität ist bei PON2-defizienten und NOX2-defizienten murinen Thrombozyten *in vitro* verändert

Für die Aktivierung der Thrombozyten hat zum einen die Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, zum anderen die granuläre Exozytose von P-Selektin, eine zentrale Bedeutung. In beiden vorherigen Abschnitten (5.5.1.3 und 5.5.1.4) konnte geklärt werden, dass PON2 und NOX2 bereits Einfluss auf die Aktivierung des Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten im Ruhezustand ohne Agonisten-induzierte Stimulation nehmen.

Um zu prüfen, auf welchem der beiden partiellen Wege PON2 und NOX2 zur Aktivierung der Thrombozyten führen, wurde PRP sowie als unabhängige Gruppe gewaschene Thrombozyten jeweils von PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}-Mäusen und deren WT-Kontrolle mit verschiedenen Agonisten (Thrombin, Convulxin und ADP) in unterschiedlichen Konzentrationen aktiviert und mit zwei spezifischen Antikörpern (JON/A-PE und CD62P-FITC) gefärbt.

Auf den nachfolgenden Abbildungen und in den nachfolgenden Unterabschnitten werden die Ergebnisse für den aktivierten Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und für die P-Selektin Oberflächenexpression nach den Mausmodellen getrennt voneinander gezeigt und die dazugehörigen Ergebnisse direkt nach den Abbildungen dargestellt.

5.5.2.1.1 Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa ist in PON2^{-/-}-Thrombozyten erniedrigt

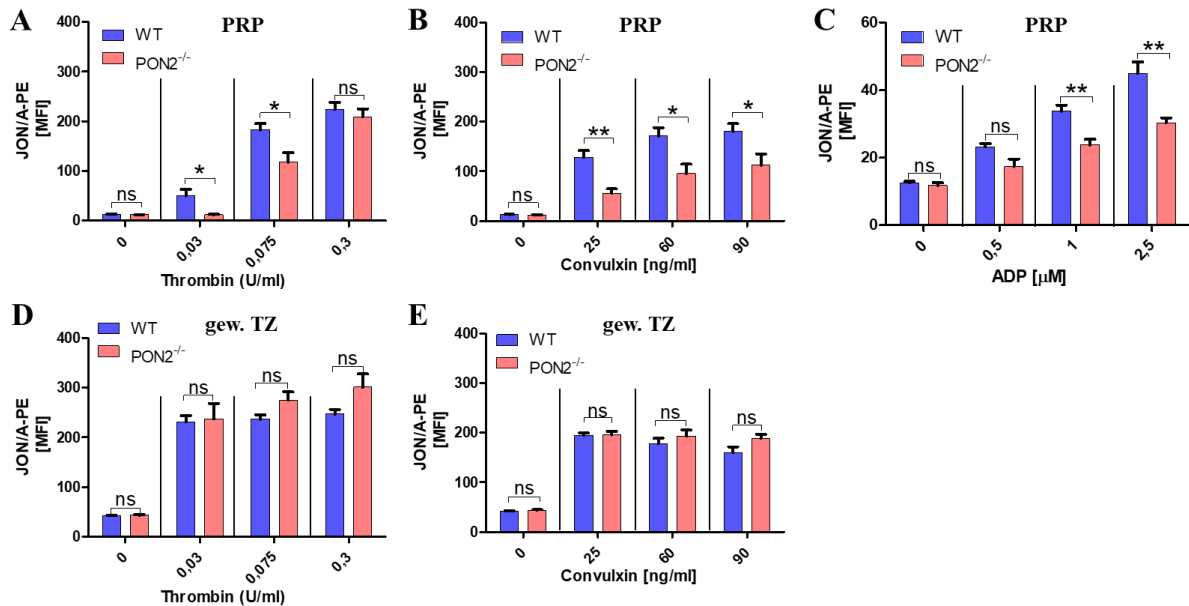


Abbildung 50: Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa ist auf PON2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP verringert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen (**obere Reihe: A-C**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: D+E**) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Thrombin (0,03-0,3 U/ml), Convulxin (25-90 ng/ml) und ADP (0,5-2,5 µM) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen das aktivierte GPIIb/IIIa (JON/A) gefärbt. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von aktiviertem GPIIb/IIIa gegen die Agonisten-Konzentration quantifiziert (n=5-11). Diagramm mit Mittelwert ±SEM. **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test mit Welch Korrektur.

Abbildung 50 stellt zum einen dar, dass das untersuchte PRP von PON2^{-/-}-Mäusen unabhängig vom Aktivierungsweg über Phospholipid C β (Aktivierung über Thrombin bzw. ADP) bzw. Phospholipid C γ (Aktivierung über Convulxin) eine signifikant verringerte Thrombozytenaktivierung im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe aufwies (Abbildung 50 A-C). Gegenüber diesen Ergebnissen zeigten die gewaschenen Thrombozyten von PON2^{-/-}-Mäusen keine Veränderung der Thrombozytenaktivierung nach Stimulation durch Thrombin oder Convulxin in Bezug zu ihrer WT-Kontrollgruppe auf (Abbildung 50-D+E). Allerdings ist zu erkennen, dass die gewaschenen WT-Thrombozyten im Vergleich zu den WT-Thrombozyten aus PRP keine Erhöhung der Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors nach Zugabe höherer Konzentrationen der Agonisten aufwiesen.

Zusammengefasst ist somit PON2 in beiden Signaltransduktionswegen involviert, die zur Änderung der Konformation des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa und damit zur Aktivierung der Thrombozyten führen.

5.5.2.1.2 Die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa wird von NOX2 nicht beeinflusst

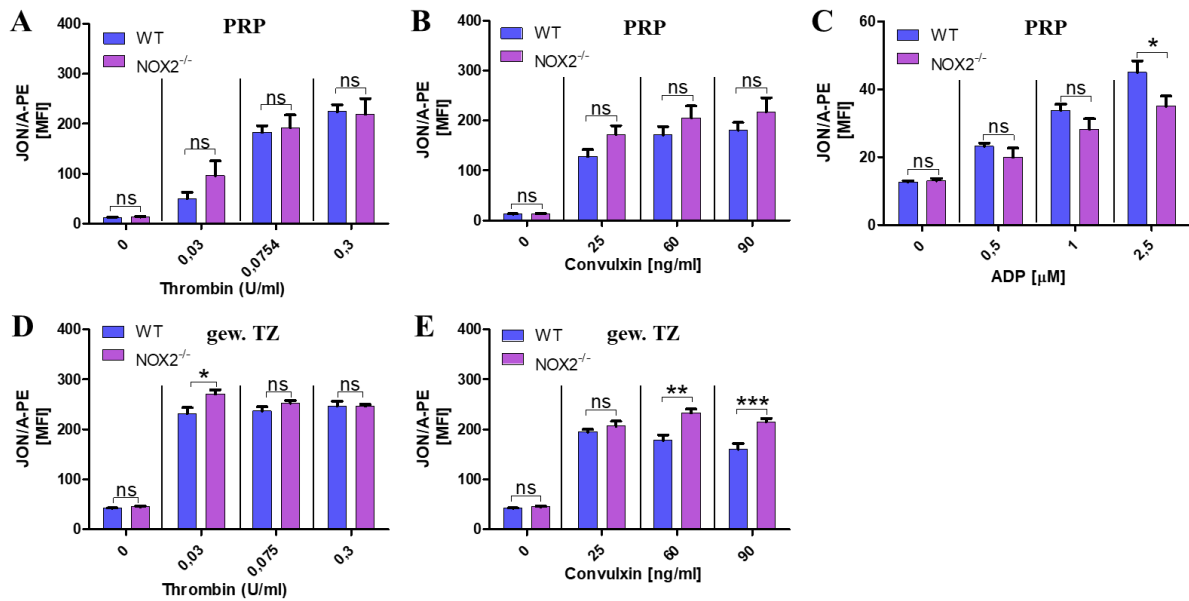


Abbildung 51: Die Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors ist auf NOX2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP im Vergleich zu PRP-WT-Kontrolle überwiegend unverändert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus NOX2^{-/-}- und WT-Mäusen (obere Reihe: A-C) und gewaschene Thrombozyten (untere Reihe: D+E) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml); Convulxin (25-90 ng/ml) und ADP (0,5-2,5 µM) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen das aktivierte GPIIb/IIIa (JON/A-PE) gefärbt. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von aktiviertem GPIIb/IIIa gegen die Agonisten-Konzentration quantifiziert (n=4-11). Balkendiagramm mit Mittelwert ±SEM. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test mit Welch Korrektur.

Die Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa-Rezeptors in NOX2^{-/-}- Thrombozyten aus PRP wiesen unabhängig vom zugegebenen Agonisten keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Kontrollen auf (Abbildung 51). Im Gegensatz dazu zeigten die gewaschenen Thrombozyten der NOX2^{-/-}-Mäuse eine signifikante Erhöhung nach Stimulation mit Convulxin in den höheren Konzentrationsbereichen (Abbildung 51-E).

Allerdings ist auch hier ebenso wie bei den bereits besprochenen Ergebnissen der PON2^{-/-}-Thrombozyten-Analysen (5.5.2.1.1) zu erkennen gewesen, dass die gewaschenen Thrombozyten der WT-Mäuse im Vergleich zu den Thrombozyten aus PRP keine Erhöhung der Expression des aktivierten GPIIb/IIIa nach Zugabe höherer Konzentrationen der Agonisten aufwiesen. Aufgrund dessen nimmt NOX2 keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten nach Stimulation mit den Agonisten und der damit verbundenen Aktivierung von GPIIb/IIIa.

5.5.2.1.3 Die Agonisten-induzierte Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin ist in $PON2^{-/-}$ -Thrombozyten erniedrigt

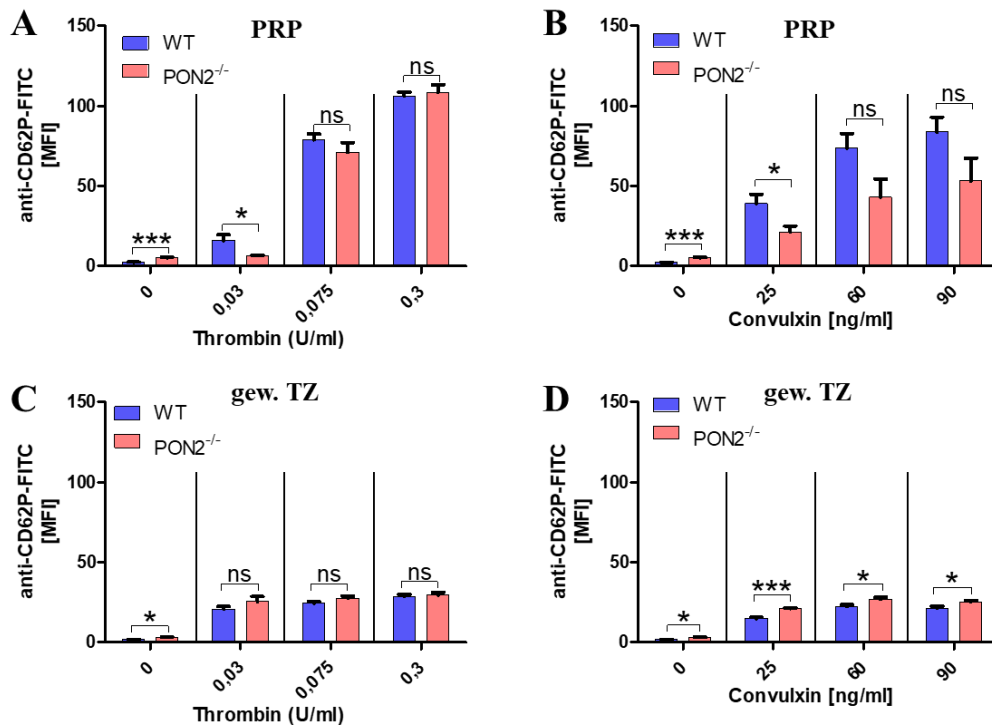


Abbildung 52: Die Thrombin- und Convulxin-induzierte Oberflächenexpression von P-Selektin ist in $PON2^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP verringert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus $PON2^{-/-}$ - und WT-Mäusen (**obere Reihe: A+B**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: C+D**) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml) und Convulxin (25-90 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen CD62P gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n= 5-11). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. ***p<0,001; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test mit Welch Korrektur.

Die Quantifizierung der Oberflächenexpression von P-Selektin auf $PON2^{-/-}$ -Thrombozyten im PRP ergab, dass $PON2$ in niedrigen Konzentrationen der Agonisten Thrombin und Convulxin eine signifikante Verringerung zur WT-Kontrollgruppe zu beobachten war (Abbildung 52-A+B), während die gewaschenen Thrombozyten bei der Stimulation mit Convulxin eine statistisch signifikante Erhöhung aufwiesen (Abbildung 52-C+D).

Andererseits erkannte man im Vergleich der WT-Thrombozyten zwischen beiden Gruppen, dass die gewaschenen Thrombozyten beider Mausmodelle eine verringerte mittlere Fluoreszenzintensität und damit eine verringerte Expression von P-Selektin im Vergleich zur WT-Gruppe aus PRP aufwiesen und es unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Agonisten zu keiner Erhöhung der Expression von P-Selektin kam.

5.5.2.1.4 Die Convulxin-induzierte Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin ist in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten erhöht

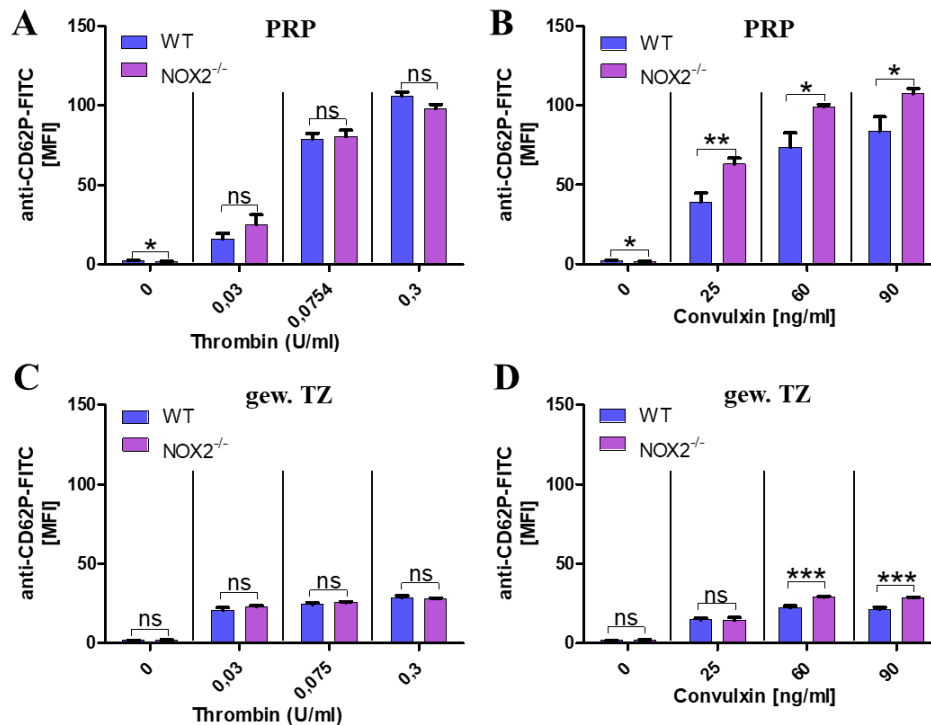


Abbildung 53: Die Expression von P-Selektin ist in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP und gew. TZ nach Stimulation mit Convulxin erhöht. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus $\text{NOX2}^{-/-}$ - und WT-Mäusen (**obere Reihe: A+B**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: C+D**) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml) und Convulxin (25-90 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen CD62P gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n= 4-11). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test mit Welch Korrektur.

Die Analyse für $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten ergab, dass ebenso in gewaschenen Thrombozyten wie auch in Thrombozyten aus PRP, eine NOX2 -Defizienz eine signifikante Erhöhung der Oberflächenexpression von P-Selektin im Vergleich zu WT-Thrombozyten nach Stimulation mit verschiedenen Konzentration von Convulxin verursachte (Abbildung 53-B+D).

Gleichsam den Ergebnissen mit $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten im vorherigen Abschnitt (5.5.2.1.3) ist auch hier anzumerken, dass im Vergleich der WT-Thrombozyten zwischen beiden Gruppen die gewaschenen Thrombozyten beider eingesetzter Mausmodelle eine verringerte mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur WT-Gruppe aus PRP aufwiesen und ebenfalls unabhängig der eingesetzten Konzentration der Agonisten keine Erhöhung der Expression von P-Selektin zu beobachten war.

5.5.2.2 Effekt von PON2 und NOX2 auf die murine Agonisten-induzierte Aggregation

Der Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten über Fibrinogenbrücken wird Aggregation genannt. Dabei sind drei Bedingungen für eine normal verlaufende Aggregation entscheidend: die Scherkraft, welche die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen zwei Thrombozyten erhöht, die Ca^{2+} -Konzentration und die Fibrinogenkonzentration⁶⁰. Zentrale Bedeutung hat auch hier der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa, da nur durch seine Konformationsänderung bei der Thrombozytenaktivierung Bindungsstellen für Fibrinogen und damit die Bildung von „Fibrinogenbrücken“ zwischen zwei benachbarten Thrombozyten erfolgt⁶⁰. Zur Analyse der Thrombozytenaggregation wurde PRP von $\text{PON2}^{-/-}$ und $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen und deren WT-Kontrolle durch das turbimetrische Lichttransmissionsaggregometrie Verfahren nach Born¹²¹ durch PD Dr. Kerstin Jurk am CTH untersucht.

Zusammenfassend betrachtet beeinflussen PON2 und NOX2 die Agonisten-stimulierte Thrombozytenaggregation gegensätzlich.

5.5.2.2.1 Die ADP- und Convulxin-induzierte Aggregation ist in $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten vermindert

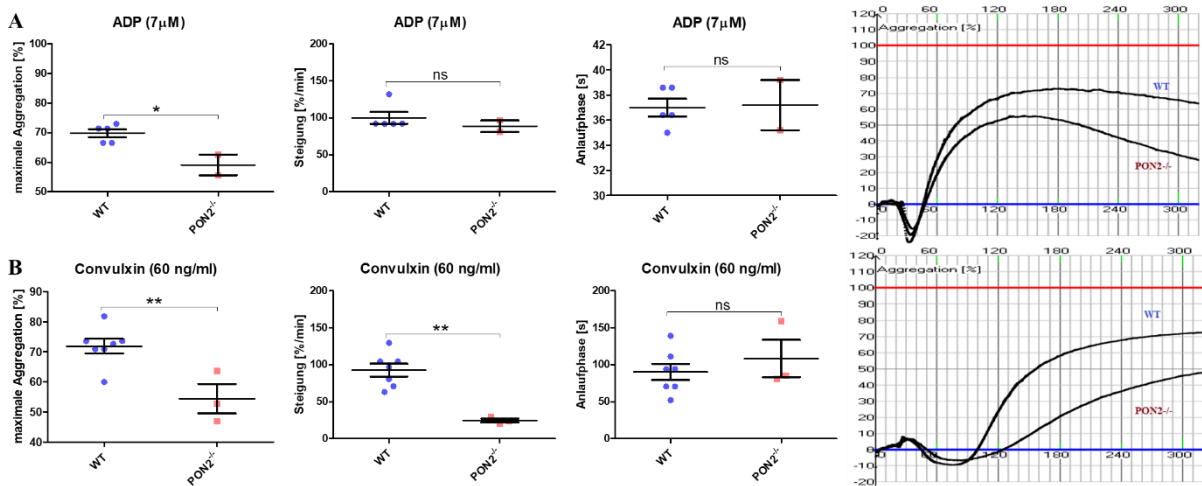


Abbildung 54: Die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung durch ADP und Convulxin ist in $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten vermindert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) von $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäusen wurde im turbimetrischen Verfahren nach Born¹²¹ mit (A) 7 µM ADP oder (B) 60 ng/ml Convulxin aktiviert und die Aggregationskurve aufgezeichnet (n= 2-7). Spalte 1-3: Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test. Spalte 4: Jeweils ein repräsentatives Bild einer Aggregationskurve von (A) WT gegen $\text{PON2}^{-/-}$ Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP und (B) WT gegen $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten nach Aktivierung mit Convulxin.

Die Thrombozytenaggregation mit den Agonisten ADP und Convulxin, zeigte für $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten eine signifikant erniedrigte maximale Aggregation, sowie einen deutlich signifikanten Unterschied in der Steigung zur WT-Kontrollgruppe. Die Anlaufphase der $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten war dagegen dem WT ähnlich und zeigte keinen Unterschied.

5.5.2.2 Die ADP--induzierte Aggregation ist in NOX2^{-/-}-Thrombozyten erhöht

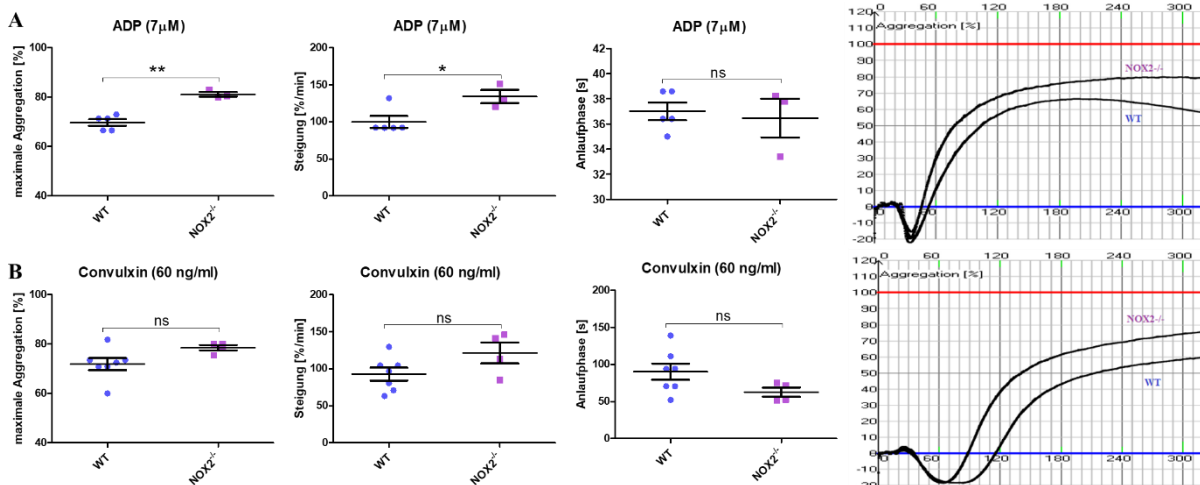


Abbildung 55: Die Thrombozytenaggregation von NOX2^{-/-}-Mäusen ist nach Aktivierung mit ADP signifikant erhöht. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) von NOX2^{-/-}-Mäusen wurde im turbimetrischen Verfahren nach Born¹²¹ mit (A) 7 µM ADP oder (B) 60 ng/ml Convulxin aktiviert und die Aggregationskurve aufgezeichnet (n= 3-7). Spalte 1-3: Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. **p<0,01; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test. Spalte 4: Jeweils ein repräsentatives Bild einer Aggregationskurve von (A) WT gegen NOX2^{-/-}-Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP und (B) WT gegen NOX2^{-/-}-Thrombozyten nach Aktivierung mit Convulxin.

Die Ergebnisse für NOX2^{-/-}-Thrombozyten zeigten eine signifikant erhöhte maximale Aggregation und Steigung gegenüber den WT-Thrombozyten nach der Stimulation mit ADP, während bei der Stimulation mit Convulxin eine tendenzielle Erhöhung der maximalen Aggregation und Steigung zu beobachten gewesen ist. Ebenfalls wie im vorherigen Abschnitt (5.5.2.2.1) zeigte die Anlaufphase nach der Stimulation mit ADP oder Convulxin im Vergleich zu WT-Thrombozyten keinen Unterschied.

5.5.2.3 PON2 und NOX2 sind nicht an der Freisetzung der δ-Granula beteiligt

Bereits im vorherigen Abschnitt (s. 5.2.3) wurde die Rolle der δ-Granula für die Thrombozyten erklärt: Als Teil der Speichergranula enthalten sie maßgebliche aggregationsfördernde Faktoren wie ADP oder ATP, aber auch Ca²⁺-Ionen als Kofaktor der plasmatischen Gerinnung⁶⁰. Dabei wurde bereits eine erhöhte Anzahl an δ-Granula in PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zum WT nachgewiesen, die zu einer signifikant erhöhten Beladung des Acridin-Derivates Mepacrine in PON2^{-/-}-Thrombozyten im Ruhezustand führte. Zur Analyse der Freisetzung der δ-Granula aus den Thrombozyten durch die Aktivierung wurden diese durchflusszytometrisch nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Convulxin gemessen.

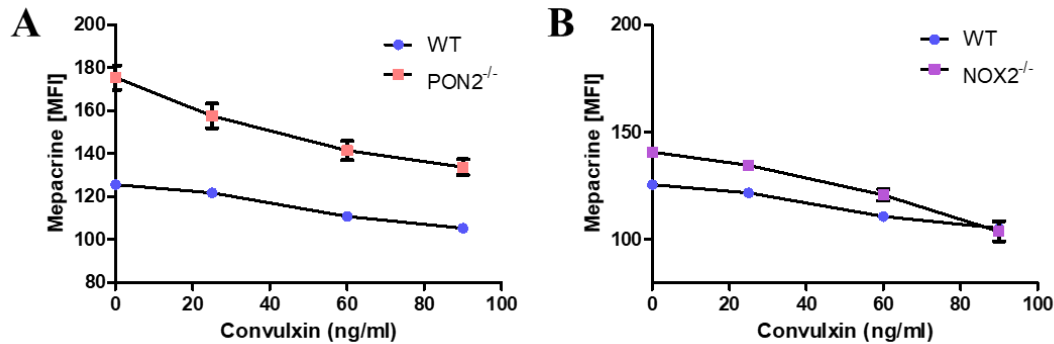


Abbildung 56: Die Freisetzung der δ -Granula wird nicht von PON2 oder NOX2 beeinflusst. Thrombozyten aus PRP von (A) $PON2^{-/-}$ und (B) $NOX2^{-/-}$ -Mäusen wurden mit Mepacrin beladen und ohne sowie mit verschiedenen Konzentrationen an Convulxin aktiviert ($n=4-14$). Verbindende Punktlinie \pm SEM

Die Ergebnisse zeigten für die Mausmodelle $PON2^{-/-}$ und $NOX2^{-/-}$ ähnliche Kurvenverläufe im Vergleich zum WT nach Aktivierung mit Convulxin (Abbildung 56), deren Abnahme mit der Exozytose der δ -Granula und der damit verbundenen extrazellulären Sezernierung der Speicherstoffe einhergehen. Die erhöhte Differenz der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität ist auf die bereits beobachtete signifikant erhöhte Aufnahme von Mepacrine zurückzuführen. Dies wies daraufhin, dass beide Enzyme auf die Freisetzung der δ -Granula aus den Thrombozyten keinen Einfluss ausüben.

5.6 Einfluss von PON2 und NOX2 auf die Ca^{2+} -Homöostase in murinen Thrombozyten

5.6.1 $PON2$ -defiziente und $NOX2$ -defiziente Thrombozyten weisen eine reziprok veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung auf

Wie bereits in den Abschnitten 5.2.3 und 5.5.2.3 beschrieben, ist die Anzahl der δ -Granula in Thrombozyten von $PON2^{-/-}$ -Mäusen signifikant erhöht, sie werden jedoch nicht von PON2 oder NOX2 bei ihrer Freisetzung beeinflusst. Da die δ -Granula ein Speicherort für freie Ca^{2+} -Ionen sind, wird in diesem Abschnitt der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf die murinen Thrombozyten untersucht, da Ca^{2+} -Ionen eine zentrale Rolle in der Regulation des Thrombozytenmetabolismus sowie deren Aktivierung spielt. Überschreitet dabei die zytoplasmatische freie Ca^{2+} -Konzentration eine bestimmte Schwelle, so kommt es zur Formveränderung des Thrombozyten mit der Bildung von Pseudopodien und einer Degranulation des Thrombozyten⁶⁰.

Zur Untersuchung der freien Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten als auch des Einflusses von extrazellulärem Ca^{2+} -Ionen wurde PRP von $\text{PON2}^{-/-}$ und $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen und deren WT-Kontrolle durchflusszytometrisch mit dem Fluoreszenz-Indikator Fluo-3 durch PD Dr. Kerstin Jurk am CTH analysiert.

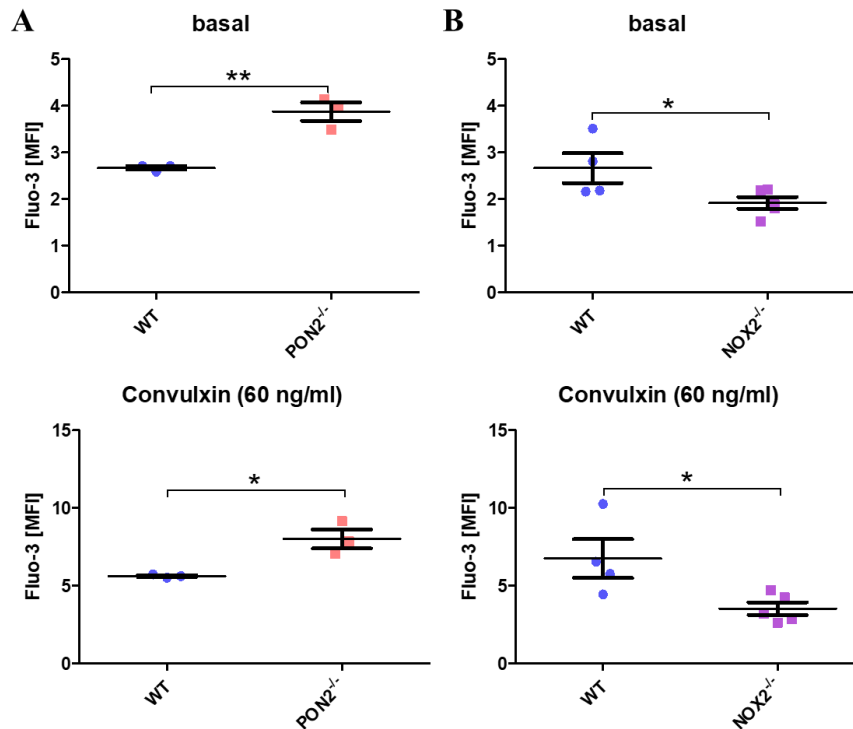


Abbildung 57: Die freie Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten ist in $\text{PON2}^{-/-}$ und $\text{NOX2}^{-/-}$ - Mäusen *ex vivo* und nach Stimulierung *in vitro* different. Thrombozyten aus Plättchen-reichem-Plasma (PRP) wurden von (A) $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäusen und (B) $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen freie Ca^{2+} -Ionen gefärbt und unverändert gelassen (obere Reihe) oder mit Convulxin stimuliert (untere Reihe) (n= 3-7). Scatterplot mit Mittelwert \pm SEM. **p<0,01; *p<0,05; zweiseitiger T-Test.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, dass $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten basal signifikant und nach Aktivierung mit Convulxin eine höhere Menge an intrazellulärem Ca^{2+} -Ionen im Vergleich zu WT-Thrombozyten aus intrazellulären Speichern freisetzen (Abbildung 57-A). Im Gegensatz dazu war die Freisetzung an intrazellulärem Ca^{2+} -Ionen in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe sowohl basal als auch nach Aktivierung mit Convulxin signifikant erniedrigt (Abbildung 57-B).

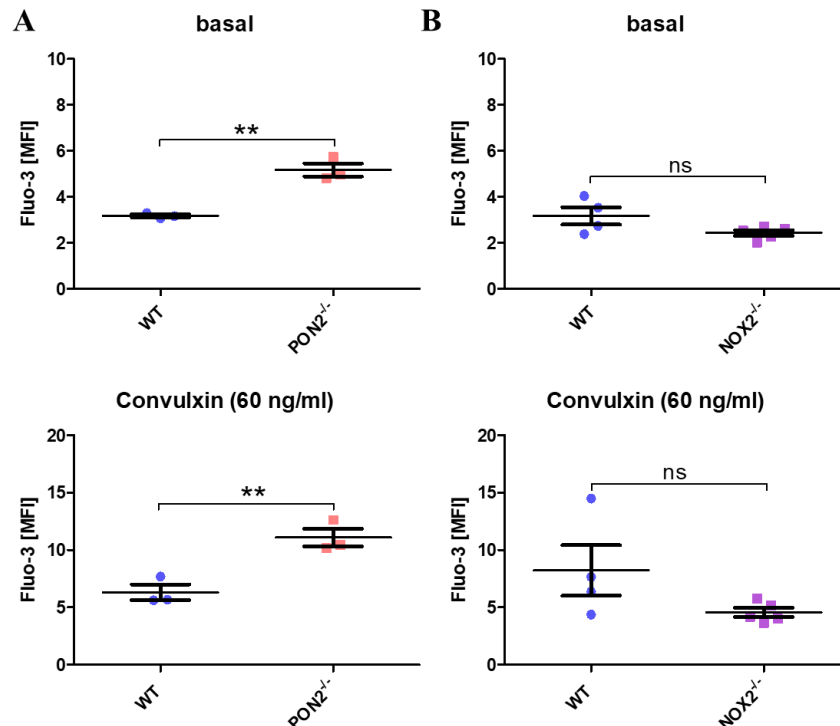


Abbildung 58: PON2 und NOX2 beeinflussen die Konzentration freier Kalzium²⁺-Ionen im Ruhezustand der Thrombozyten nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺-Ionen (0.5 mM). Thrombozyten aus Plättchenreichem-Plasma (PRP) wurden von (A) PON2^{-/-}-Mäusen und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen freie Ca²⁺-Ionen gefärbt und unverändert gelassen (obere Reihe) oder mit Convulxin stimuliert (untere Reihe) sowie extrazelluläres Kalzium hinzugegeben (n= 3-7). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. **p<0,01; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Durch die Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen konnten die Resultate im obigen Abschnitt, in dem die Untersuchung ohne die Zugabe von Ca²⁺-Ionen stattfand, sowohl für PON2^{-/-}- als auch tendenziell für NOX2^{-/-}-Thrombozyten im Ruhezustand bestätigt werden. Diese Thrombozyten wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Thrombozyten aus WT-Mäusen eine signifikant erhöhte (PON2^{-/-}; Abbildung 58-A) bzw. eine tendenziell erniedrigte (NOX2^{-/-}; Abbildung 58-B) Menge an intrazellulärem Ca²⁺-Ionen nach. Nach der Aktivierung der Thrombozyten durch Convulxin ist der Unterschied zu den WT-Thrombozyten ebenfalls noch in PON2^{-/-}-Thrombozyten signifikant und in NOX2^{-/-}-Thrombozyten tendenziell vorhanden gewesen.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse in diesem Unterabschnitt, dass sowohl PON2 als auch NOX2 die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration der Thrombozyten regulieren.

5.6.2 Die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration beeinflusst die Funktionsfähigkeit von PON2-defizienten und NOX2-defizienten Thrombozyten

Im Unterabschnitt 5.6.1 wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Ionen -Konzentration von Thrombozyten sowohl von PON2 als auch von NOX2 beeinflusst wird. Da Ca²⁺-Ionen bei vielen Prozessen die Thrombozyten betreffend eine zentrale Rolle spielt, wurde erneut der Versuch zur Bestimmung des Einflusses von PON2 und NOX2 auf die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa sowie die Expression des P-Selektin mit den Mausmodellen PON2^{-/-} und NOX2^{-/-} und deren WT-Kontrolle durchgeführt und dabei extrazelluläre Ca²⁺-Ionen hinzugefügt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die nachfolgenden Resultate sind dabei aufgeteilt nach den Mauslinien sowie nach dem untersuchten Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und P-Selektin.

5.6.2.1 Die Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ beeinflusst die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa in gewaschenen PON2^{-/-}-Thrombozyten

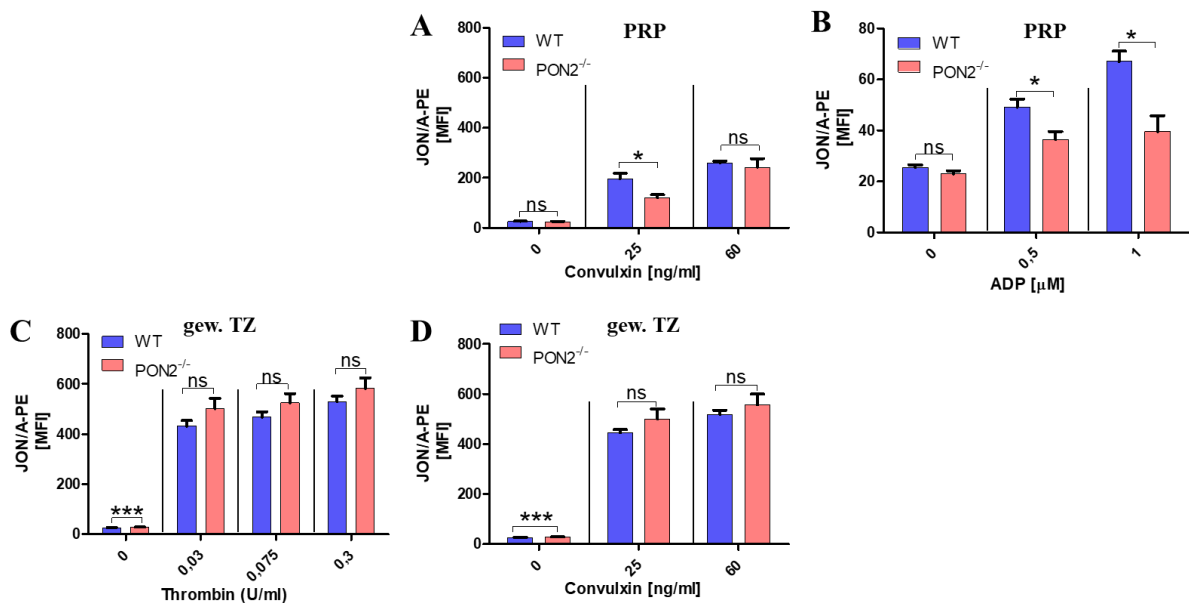


Abbildung 59: Die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors ist auf PON2^{-/-}-Thrombozyten nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺-Ionen verringert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen (**obere Reihe: A+B**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: C+D**) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml); Convulxin (25-60 ng/ml) und ADP (0,5-1 µM) stimuliert oder blieben unbehandelt. Es wurde jeweils 0,5 mM Ca²⁺ sowie ein Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen das aktivierte GPIIb/IIIa (JONA/A-PE) hinzugegeben. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von GPIIb/IIIa gegen die Agonisten-Konzentration quantifiziert (n=5-13). Balkendiagramm mit Mittelwert ±SEM. ***p<0,001; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

In Abbildung 59 ist zu erkennen, dass $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP eine signifikant verringerte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa im Vergleich zu den WT-Thrombozyten nach ihrer Aktivierung mit niedrigen Konzentrationen von Convulxin oder ADP und Zugabe von Ca^{2+} -Ionen aufwiesen, deren Differenz sich bei höheren Konzentrationen den Ergebnissen der Kontrollgruppe wieder anglich. Im Gegensatz dazu wurde bei den gewaschenen Thrombozyten von $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäusen im Ruhezustand und Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen eine signifikante Erhöhung des aktivierten Fibrinogenrezeptors, aber kein Unterschied bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin bzw. Convulxin nachgewiesen, was den Ergebnissen ohne Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen entsprach (5.5.2.1.1) und einen Einfluss von Ca^{2+} auf die gewaschenen Thrombozyten ausschloss.

5.6.2.2 Die Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} beeinflusst nicht die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten

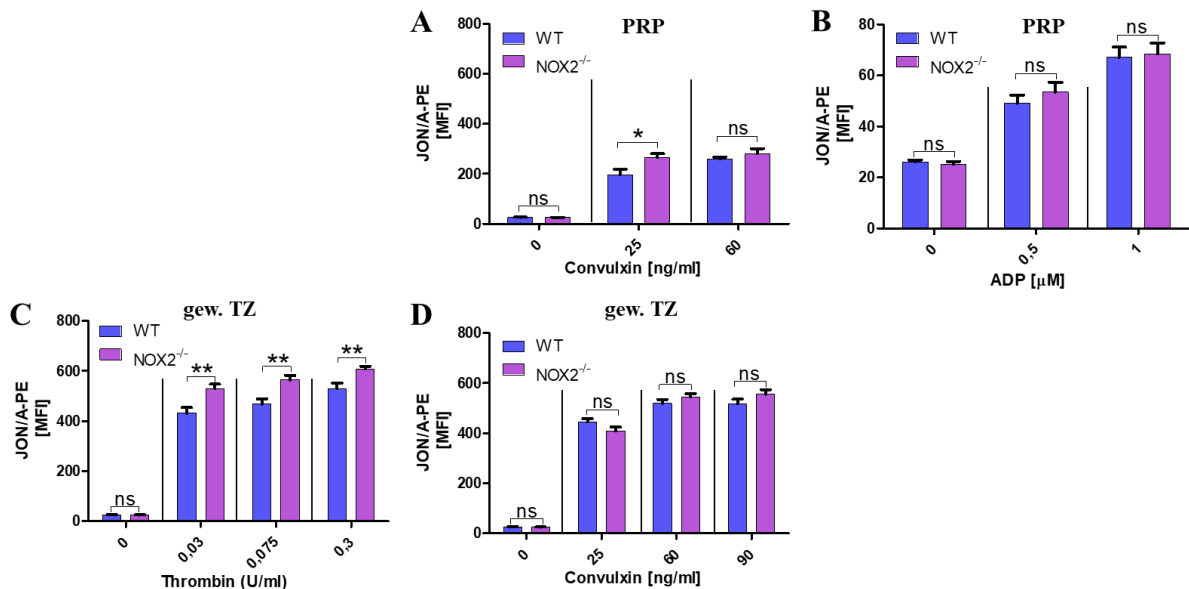


Abbildung 60: Die Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors ist nach der Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} -Ionen in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP unverändert. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus $\text{NOX2}^{-/-}$ - und WT-Mäusen (**obere Reihe: A+B**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: C+D**) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml); Convulxin (25-60 ng/ml) und ADP (0,5-1 μM) stimuliert oder blieben unbehandelt. Es wurde jeweils 0,5 mM Ca^{2+} sowie ein Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen das aktivierte GPIIb/IIIa (JON/A-PE) hinzugegeben. Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von GPIIb/IIIa gegen die Agonisten-Konzentration quantifiziert (n=4-13). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

$\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP zeigten in der Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa-Rezeptors mit niedrigen Konzentrationen an Convulxin einen signifikanten, erhöhten Unterschied zur Kontrollgruppe mit WT-Thrombozyten, während die Ergebnisse mit ADP keine Veränderung aufwiesen.

Die gewaschenen NOX2^{-/-}-Thrombozyten wiesen im Gegensatz dazu bei der Aktivierung mit Thrombin, aber nicht bei der Aktivierung mit Convulxin, eine Erhöhung der Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors im Vergleich zu den entsprechenden WT-Thrombozyten auf (Abbildung 60-C). Im Ruhezustand verhielten sie sich dabei ebenso wie die entsprechenden Thrombozyten aus PRP.

5.6.2.3 Die Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ hebt den hypofunktionellen Zustand bei der Agonisten-induzierten Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin in PON2^{-/-}-Thrombozyten auf

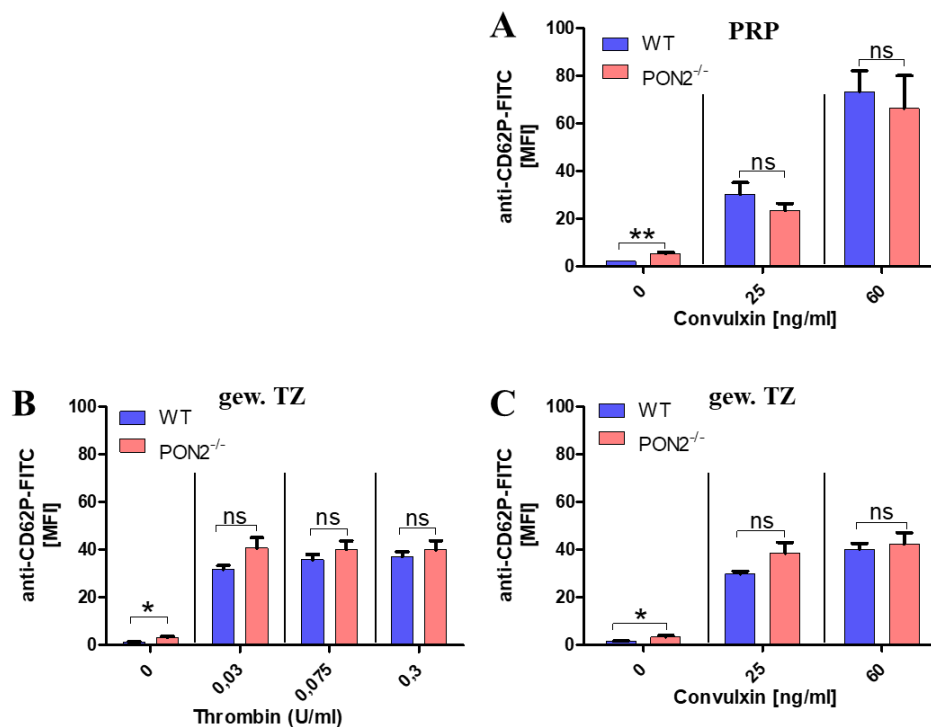


Abbildung 61: PON2^{-/-}-Thrombozyten aus PRP und gew. TZ zeigen keine Veränderung der Expression von P-Selektin. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus PON2^{-/-}- und WT-Mäusen (**obere Reihe: A**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: B+C**) wurden jeweils mit 0,5 mM Ca²⁺ sowie mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,03-0,3 U/ml) und Convulxin (25- 60 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen CD62P gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n= 5-13). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. **p<0,01; *p<0,05; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Im basalen Zustand zeigte die Analyse der Expression von P-Selektin (Abbildung 61), dass sowohl die gewaschenen ebenso wie die Thrombozyten aus PRP von PON2^{-/-}-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Expression von P-Selektin auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu den WT-Thrombozyten aufwiesen. Dagegen beobachtete man unabhängig von den eingesetzten Agonisten sowie unabhängig der Isolierungsmethode keine signifikanten oder tendenziellen Veränderungen zur WT-Kontrollgruppe im Gegensatz zu den signifikant erniedrigten Ergebnissen ohne Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ (s. 5.5.2.1.3)

5.6.2.4 Die basale und Agonisten-induzierte Oberflächenexpression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin ist von gewaschenen $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten nach der Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} erhöht

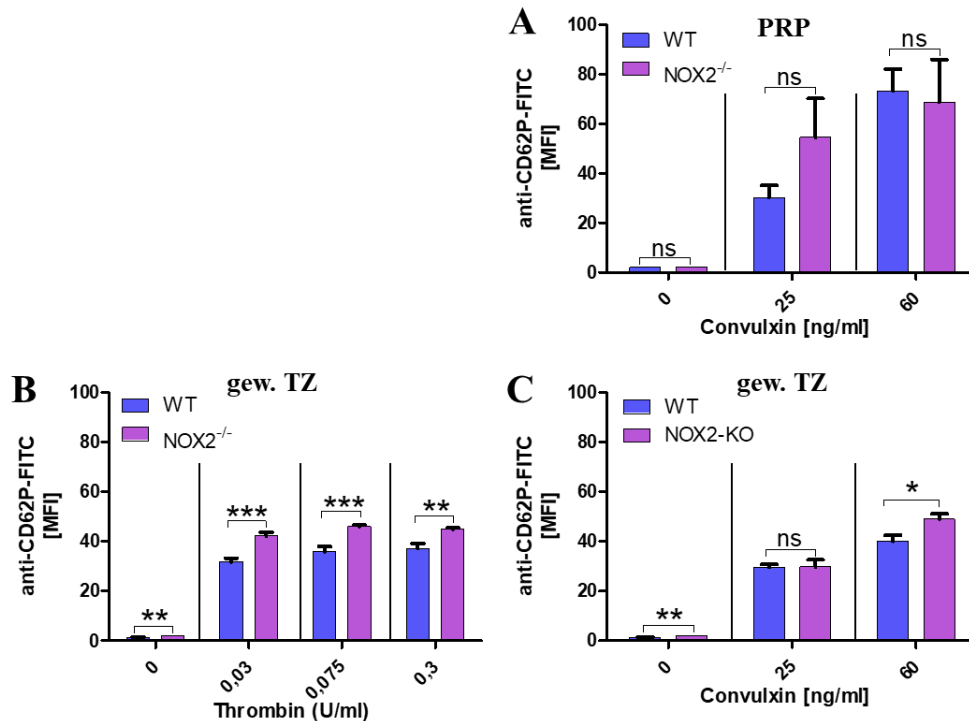


Abbildung 62: Die Expression von P-Selektin ist in $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP und gew. TZ erhöht. Plättchen-reiches-Plasma (PRP) aus $\text{NOX2}^{-/-}$ - und WT-Mäusen (**obere Reihe: A**) und gewaschene Thrombozyten (**untere Reihe: B+C**) wurden jeweils mit $0,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ sowie mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin ($0,03\text{-}0,3 \text{ U/ml}$) und Convulxin ($25\text{-}60 \text{ ng/ml}$) stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen CD62P gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie ($n=4\text{-}13$). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$; ns. Nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Im Gegensatz zu den $\text{PON2}^{-/-}$ -Thrombozyten waren die $\text{NOX2}^{-/-}$ -Thrombozyten aus PRP im *ex vivo* nicht, die gewaschenen Thrombozyten jedoch statistisch signifikant im Vergleich zu den WT-Thrombozyten erhöht. Gleichsam ist bei den gewaschenen Thrombozyten aus $\text{NOX2}^{-/-}$ -Mäusen eine signifikante und bei den Thrombozyten aus PRP eine tendenzielle Erhöhung der Expression von P-Selektin nach Zugabe von Thrombin bzw. Convulxin im Vergleich zum WT zu beobachten (Abbildung 62) gewesen.

5.7 Subendotheliale und endotheliale Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung *in vitro* und *in vivo*

Verschiedene Studien konnten bisher zeigen, dass die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einen Einfluss auf die Atherogenese haben^{159;160} und beispielsweise im Falle einer adenoviralen Überexpression von humanen PON2, in ApoE^{-/-}-Mäusen ein verringertes, im Fall eines *Knockouts* ein erhöhtes Atherosklerose-Risiko nachgewiesen werden konnte. Der Grund dafür wurde in einer erhöhten Adhäsion der Thrombozyten auf Grund von einer ROS verursachten Thrombozytenaktivierung vermutet^{88;161}. Da bereits im vorherigen Abschnitt 5.3.1 ein signifikanter Einfluss sowohl der PON2 als auch der NOX2 auf das intrazelluläre ROS-Level von Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, wird in den folgenden Unterabschnitten der Einfluss von PON2 auf die Adhäsion der Thrombozyten auf eine vaskuläre Oberfläche (Abschnitt 5.7.1) sowie der Einfluss beider Enzyme auf die jeweilige Thrombusbildung für ein arterielles *in-vivo* Mausmodell (Abschnitt 5.7.3) untersucht.

5.7.1 Adhäsion muriner Thrombozyten im Vollblut an einem Kollagen beschichteten Kanal der Flusskammer (*in vitro*)

Bei Verletzungen des Gefäßes sind neben dem Endothel auch subendotheliale Strukturen, wie die Kollagenmatrix, wichtig und besitzen einen erheblichen Einfluss auf die Adhäsion der Thrombozyten⁶¹. Daher wurde im Rahmen der Master-Arbeit⁹⁸ von Jennifer Oberländer ein Protokoll zusammen mit mir unter der Anleitung von PD Dr. Kerstin Jurk für die Adhäsion muriner Thrombozyten an Kollagen I unter Flussbedingungen etabliert und mit Vollblut aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss von PON2 auf die Menge der adhärenierten Thrombozyten und auf den pro-koagulanten Status der Thrombozyten treffen zu können. Zusätzlich wurde der Einfluss von Thrombin auf die Thrombozytenadhäsion bzw. den pro-koagulanten Status durch Zugabe bzw. dem Weglassen von zwei Thrombin-Inhibitoren untersucht.

5.7.1.1 Thrombozyten von PON2-defizienten Mäusen zeigen eine verminderte Adhäsion an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen

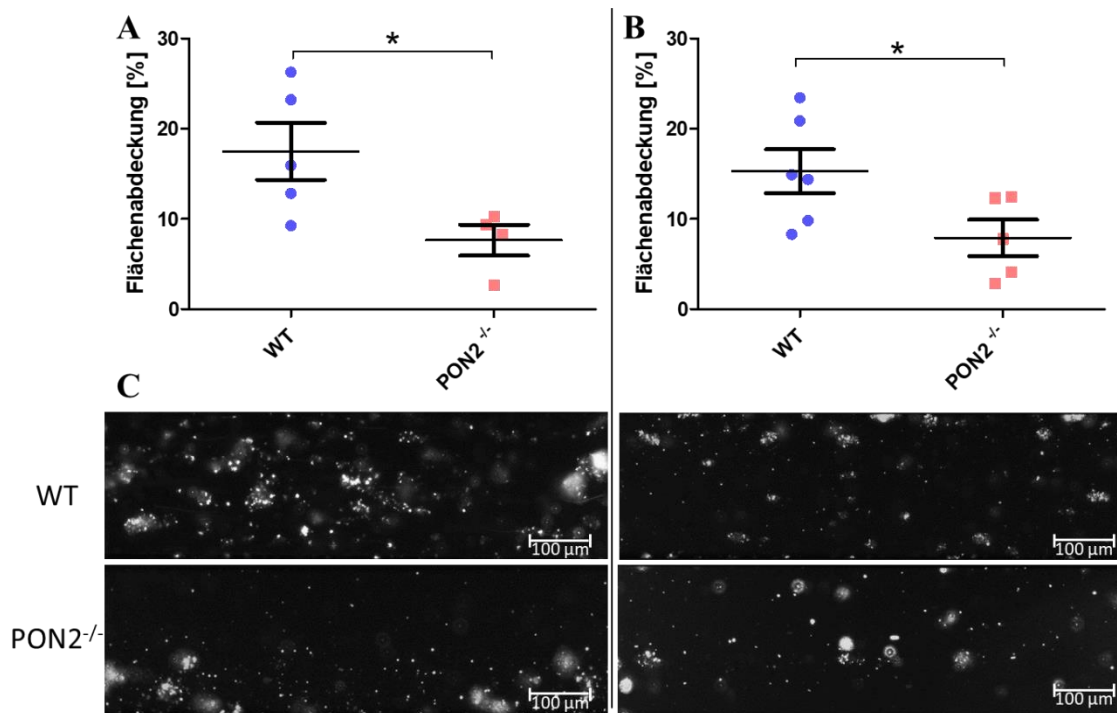


Abbildung 63: PON2^{-/-}-Thrombozyten zeigen eine verringerte Adhäsion an Kollagen I unter Flussbedingungen (40 Dyn/cm²). Citrat-Vollblut aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen wurde mit Calcein-AM gefärbt und (A) ohne Thrombin-Inhibitoren sowie (B) mit den Thrombin-Inhibitoren Fragmin® (40 U/ml) und PPACK (40 µM) beladen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Flächenabdeckung durch das Fluoreszenzsignal der adhärenierten Thrombozyten an der Kollagen I-beschichteten Oberfläche nach Anregung mit einer Quecksilberlampe. (C) Repräsentative Bilder jeder Gruppe der Calcein-AM gefärbten Thrombozyten (aufgenommen mit einem LSM 10x Objektiv n= 4-6, Kanäle; 3-5 Mäuse). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *p<0,05, zweiseitiger T-Test.

Abbildung 63-A zeigt, dass im Vergleich zu WT-Thrombozyten, die Thrombozyten aus PON2^{-/-}-Mäusen eine signifikant erniedrigte Adhäsion aufweisen. Ein ähnliches Ergebnis ist auch nach der Zugabe der Thrombin-Inhibitoren Fragmin® und PPACK zu sehen (Abbildung 63-B), wobei sich die Oberflächenabdeckung der adhärenierten Thrombozyten von WT-Mäusen im Vergleich zur untersuchten Gruppe ohne die Zugabe von Thrombin-Inhibitoren nicht signifikant aber tendenziell vermindert (Abbildung 64-A).

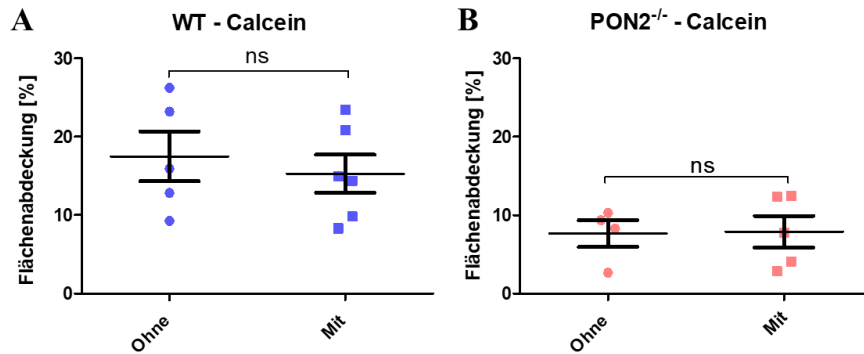


Abbildung 64: Thrombin-Inhibition durch Fragmin® und PPACK zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen Typ I. Citrat-Vollblut aus (A) WT und (B) PON2^{-/-} Mäusen wurde ohne Thrombin-Inhibitoren oder mit Fragmin® und PPACK behandelt und mit Calcein-AM gefärbt (n= 4-6 Kanäle; 3-5 Mäuse). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. ns. nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Auch die Adhäsion der pro-koagulant, durch Annexin-V-FITC gefärbten, PON2^{-/-}-Thrombozyten ist, wie in Abbildung 65-A zu erkennen, signifikant geringer im Vergleich zu den WT-Thrombozyten. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Gabe von Thrombin-Inhibitoren (Abbildung 65-B), da auch hier eine Verringerung der pro-koagulanten PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zu WT-Thrombozyten zu beobachten war. Dabei zeigte die Analyse außerdem, dass die Oberflächenabdeckung der pro-koagulanten WT-Thrombozyten sich nach der Zugabe von Thrombin signifikant, von PON2^{-/-}-Thrombozyten tendenziell verringerte (Abbildung 66).

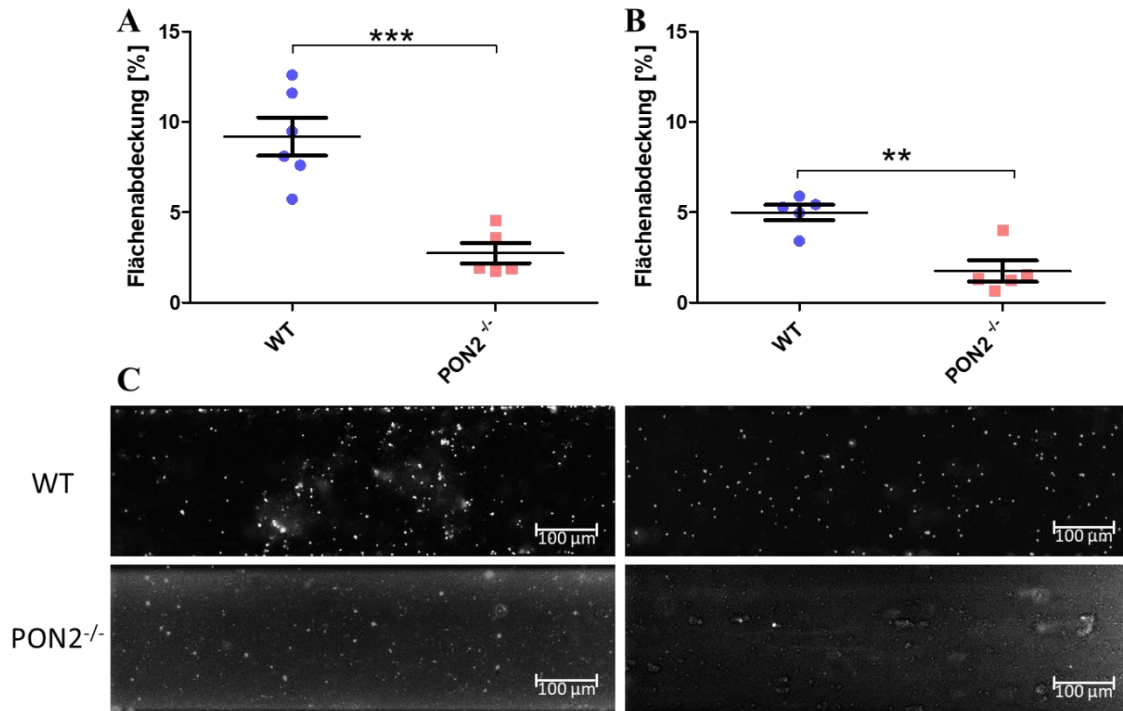


Abbildung 65: Prokoagulante Thrombozyten aus PON2^{-/-}-Mäusen adhäreren weniger an Kollagen Typ I unter Flussbedingungen (40 Dyn/cm²). Citrat-Vollblut aus WT- und PON2^{-/-}-Mäusen wurde mit Annexin-FITC gefärbt und (A) ohne Thrombin-Inhibitoren sowie (B) mit den Thrombin-Inhibitoren Fragmin® (40 U/ml) und PPACK (40 µM) beladen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Flächenabdeckung durch das Fluoreszenzsignal der adhärerten Thrombozyten an der Kollagen I-beschichteten Oberfläche nach Anregung mit einer Quecksilberlampe. (C) Repräsentative Bilder jeder Gruppe der Annexin-FITC gefärbten Thrombozyten (aufgenommen mit einem LSM 10x Objektiv (n= 5-6 Kanäle; 4-5 Mäuse). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. ***p<0,001; **p<0,01, zweiseitiger T-Test.

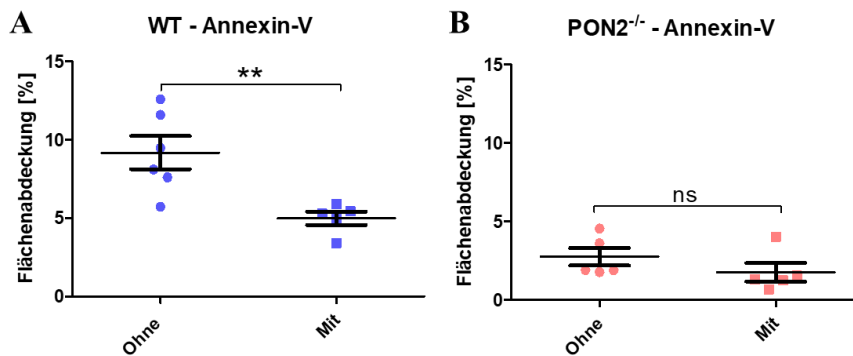


Abbildung 66: Thrombin-Inhibition durch Fragmin® und PPACK führt zu einer signifikant verringerten Oberflächenbedeckung pro-koagulanter WT-Thrombozyten. Citrat-Vollblut aus (A) WT und (B) PON2^{-/-} Mäusen wurde ohne Thrombin-Inhibitoren oder mit Fragmin® und PPACK behandelt und mit Annexin-V-FITC (n= 5-6 Kanäle; 4-5 Mäuse). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. **p<0,01; ns. nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

5.7.2 Methodenetablierung der Adhäsion muriner Thrombozyten im Vollblut an murinen, pulmonalen Endothelzellen unter Flussbedingungen (*in vitro*)

Das Endothel, als Teil der Gefäßwandzellen, spielt eine zentrale Rolle in der Initiation und Regulation der Gerinnung¹⁶². Unter physiologischen Bedingungen besitzt das Endothel dabei wichtige anti-koagulatorische Funktionen, in dem es beispielsweise durch Sekretion von Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) für die Hemmung der Thrombozytenaggregation und für die Vasodilatation sorgt⁵⁹. Kommt es zur Verletzung der Gefäßwand oder zur Inflammation, kann das Endothel seine pro-koagulatorischen Funktionen einnehmen¹⁶³.

Zur Nachahmung eines Gefäßes in der Flusskammer mit muriner Endothelauskleidung für die Betrachtung der Interaktion des Endothels mit den Thrombozyten, wurde ein Protokoll für die Isolation, Selektion und Kultivierung von murinen, pulmonalen Endothelzellen in der Flusskammer entwickelt und in den nachfolgenden Unterabschnitten beschrieben.

5.7.2.1 Selektion der murinen pulmonalen Endothelzellen

Ziel war es eine Selektionsmethode für murine, pulmonale Endothelzellen zu entwickeln, die eine Isolierung und Selektion von Endothelzellen in einer hohen Anzahl und Reinheit ermöglicht. Vorteil dieser Methode sollte sein, dass die isolierten Endothelzellen nicht mehr mit magnetischen *Beads* behaftet sind, um die Mikroumgebung eines Gefäßes in der Flusskammer im weiteren Verlauf gut und ohne Beeinflussung nachahmen zu können.

➤ Positive Selektion mit *Dynabeads* und *Microbeads*:

Ein früherer Versuchsansatz der Arbeitsgruppe war die Isolierung und positive Selektion der Zellen durch die jeweiligen für Endothelzellen spezifischen *Beads*, die über einen Magneten von den restlichen Zellen abgetrennt wurden. Dafür wurde ein Protokoll¹³⁸ etabliert. Vorteil dieser Selektionsmethode ist der Erhalt von hauptsächlich Endothelzellen (Reinheit ~ 85%¹³⁸), deren *Beads* nachteilig unter Ausbeuteverlust entfernt werden müssen. Diese Ablösung der *Beads* von den Endothelzellen konnte jedoch weder bei den biotinylierten anti-ICAM2-*Dynabeads*, noch bei den *Microbeads* in ausreichendem Maße erfolgen. Da in weiteren Versuchen gezeigt werden konnte, dass das Anhaften der *Beads* das Wachstum der Zellen sowie die Kultivierung der Zellen in der Flusskammer stört (Abbildung 67), wurde die positive Selektionsmethode nicht weiter verfolgt.

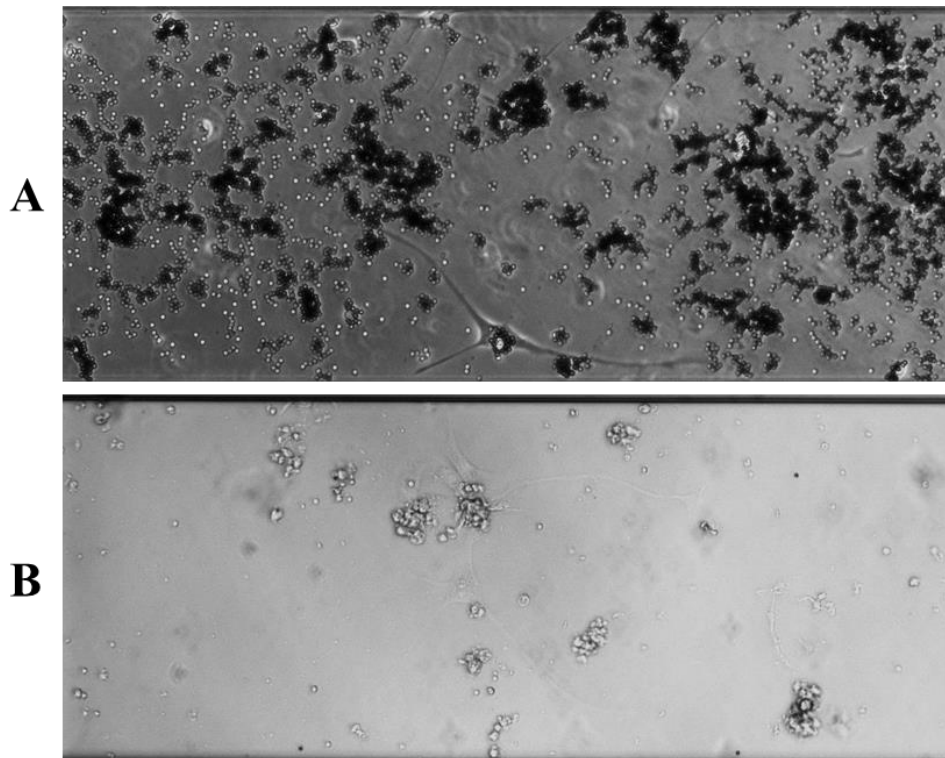


Abbildung 67: Positive Selektion der murinen, pulmonalen Endothelzellen führt zu einer schlechten Kultivierbarkeit. Repräsentative Bilder von murinen, pulmonalen Endothelzellen im Kanal der Flusskammer nach 5 Tagen nach Isolation und positiver Selektion aus WT-Mäusen mit **(A)** anti-ICAM2-Dynabeads und **(B)** anti-CD31-Microbeads (Aufgenommen mit einem LSM und 10x Objektiv).

➤ Negative Selektion mit *Microbeads*:

Ein weiterer Ansatz ist die negative Selektion. Der Vorteil dabei ist, dass die isolierten Endothelzellen nicht mit Beads markiert werden und diese daher auch nicht unter Ausbeuteverlust entfernt werden müssen und es im weiteren Verlauf des Versuches zu keinem Einfluss der Beads auf die Mikroumgebung des Gefäßes in der Flusskammer kommt. Es muss jedoch mit Sorgfalt darauf geachtet werden, dass alle vorhandenen, aber nicht gewünschten Zelltypen mit ausreichend Beads markiert und magnetisch aussortiert werden.

Auf Grund der besseren Ausbeute an Zellen und vor allem des ungestörten Wachstums (Abbildung 68) der isolierten Endothelzellen, wurde die negative Selektionsmethode für die weitere Etablierung des Versuches benutzt.

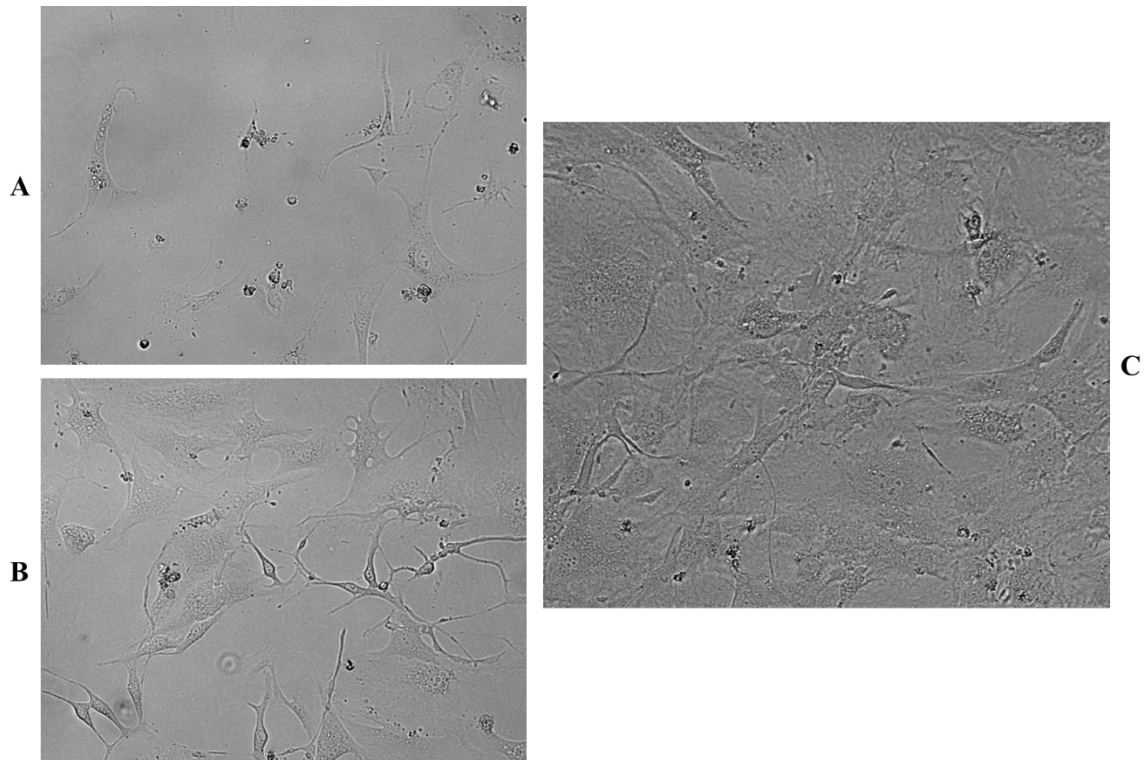


Abbildung 68: Kultivierung von murinen, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen über mehrere Tage. Repräsentative Bilder der Kultivierung von isolierten und negativ selektierten Endothelzellen nach (A) 2 Tagen (B) 5 Tagen und (C) 7 Tagen (Aufgenommen mit einem Lichtmikroskop und 10x Objektiv).

Die Reinheit der erhaltenen Endothelzellen aus der negativen Selektion wurde zum einen qualitativ mittels LSM und quantitativ durch qRT-PCR kontrolliert.

➤ Qualitative Kontrolle der negativen Selektion mittels LSM:

In den repräsentativen Bildern der Abbildung 69 lässt sich erkennen, dass es sich bei den isolierten und negativ selektierten Zellen um Endothelzellen handelt. Der eingesetzte Antikörper anti-CD62E-APC bindet nur an aktivierte Endothelzellen, da nur diese das Selektin auf ihrer Oberfläche exprimieren, allerdings ist dadurch das Signal von APC nicht über die ganze Zelloberfläche verbreitet. Dafür konnte mit Hilfe des an das Fluorophor FITC gekoppelten Lectins alle Zelloberflächen und mit Hilfe des DRAQ 5 alle Zellkerne spezifisch angefärbt werden. In der Kombination aller drei Bilder erkennt man, dass sich alle Zellkerne auf Lectin nachgewiesenen Zellen befinden und der spezifische Antikörper für Endothelzellen die Signale des Lectins-FITC überlagern, weshalb die Endothelzellen in hoher Reinheit vorliegen müssen.

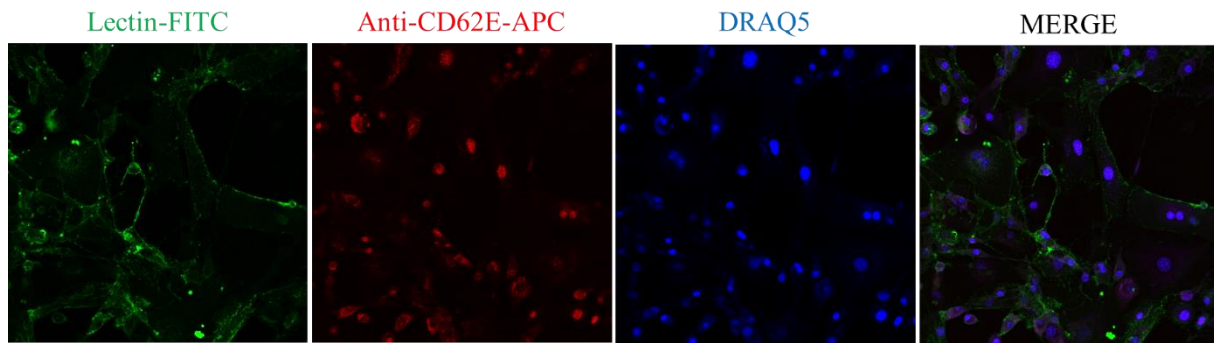


Abbildung 69: Qualitative Kontrolle der isolierten, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen durch LSM. Repräsentatives Bild der murinen, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen nach einer negativen Selektion, angefärbt mit Lectin-FITC, anti-CD62E-APC und DRAQ5 (Aufgenommen mit einem LSM und 20x Objektiv). Erste Spalte: Bild der Emission von FITC bei 519 nm (grün). Zweite Spalte: Bild der Emission von APC bei 649 nm (rot). Dritte Spalte: Bild der Emission von DRAQ5 bei 723 nm (blau). Vierte Spalte: Kombination (MERGE) der Bilder aus erster, zweiter und dritter Spalte.

➤ Quantitative Kontrolle der negativen Selektion mittels qRT-PCR

Die Resultate in Abbildung 70 der qRT-PCR aus WT-Mäusen zeigten eine erfolgreiche Aufreinigung mit über 80 % murinen, pulmonalen Endothelzellen nach negativer Selektion. Die unerwünschten Reste setzten sich zum Großteil aus Epithelzellen zusammen, während keine Fibroblasten und nur wenige Leukozyten nachweisbar waren.

Zusammenfassend kann daher in Übereinstimmung mit den Bildern der qualitativen Kontrolle durch LSM gesagt werden, dass die negative Selektion der Endothelzellen erfolgreich und die gewünschten Zellen in einer hohen Reinheit vorlagen.

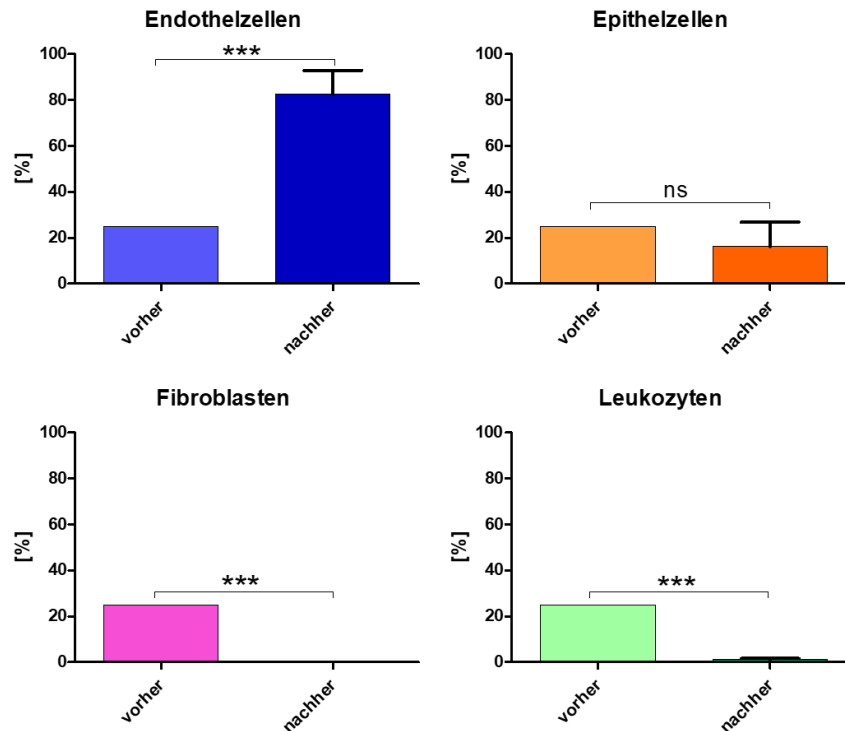


Abbildung 70: Quantitative Kontrolle der isolierten, pulmonalen Endothelzellen aus WT-Mäusen durch qRT-PCR. Zellproben vor und nach der negativen Selektion der murinen, pulmonalen Endothelzellen. Bezugnahme zum gleichen Zelltyp vor der Selektion (n= 5). Balkendiagramm mit Mittelwert \pm SEM. ***p<0,001; ns. nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

5.7.2.2 Beschichtung der Kapillaren der Flusskammerplatte

Das Protokoll zur Kultivierung von Endothelzellen in einem Kanal der Flusskammer basiert auf dem Protokoll der Arbeitsgruppe PD Dr. Kerstin Jurk, in welchem die Kultivierung mit einer humanen Endothelzelllinie (HMEC) in einem Kanal einer *Low-Shear* Platte beschrieben wurde. Die Beschichtung erfolgte mit Fibronectin (200 μ g/ml in 0,9 % NaCl-Lösung) für 30 min bei RT. Dieser Schritt wurde für das neue Protokoll übernommen, wobei die Beschichtung vom *Inlet* bis zum Ende des Sichtfensters aufgetragen wurde, sodass es bei der späteren Zugabe der Zellen vom *Outlet* nicht zu einer Adhäsion bereits vor dem Sichtfenster kommt und damit zur Verstopfung des Kanals.

5.7.2.3 Einsatz der murinen, pulmonalen Endothelzellen in den Kanal der Flusskammerplatte

Als Voraussetzung für eine Adhäsion der Zellen im Sichtkanal der *Low-Shear* Flusskammer war es wichtig, dass möglichst viele Zellen vorlagen. Aus ersten Versuchen ließ sich erkennen, dass eine Isolation (bestehend aus den Zellen eines Tages nach einer einwöchigen Kultivierung in 6-well Platten und in einem Volumen von 500 μ l EC-Medium) keine bzw. nur eine schlechte Adhäsion in der Flusskammer ergab.

Deswegen wurde zum Erhalt von genügend Zellen in den folgenden Versuchen das Gesamtvolumen der Endothelzellen durch eine Zentrifugation (300 xg, 5 min) gesenkt und damit die Konzentration an Endothelzellen pro μl Volumen erhöht. Zusätzlich wurden Zellen von insgesamt 2 Isolationstagen zusammengeführt, um eine noch größere Ausgangskonzentration zu erhalten.

Das Einspülen der aufkonzentrierten Zellen erfolgte am Anfang impulsartig mit hohem Druck (5 Dyn/cm²) und einmalig. Es konnte dabei festgestellt werden, dass nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT die eingebrachten Zellen nicht oder nur sehr ungenügend adhärirt hatten. Nach der Erhöhung der Inkubationszeit und der Wiederholung der Durchführung wurde festgestellt, dass ein großer Teil der eingebrachten Zellen sich wieder löste und nur wenige neue Zellen in der Kammer adhärirten und mit der Zahl der Wiederholungen die Qualität der Adhäsion stark abnahm.

Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen der Druck erniedrigt (1 Dyn/cm²) und die Zahl der Wiederholungen auf 3 festgelegt. Während der 30 min Inkubationszeit wurden die Zellen dazu nicht bei RT, sondern im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Ebenfalls wurde im Anschluss nach jeder Inkubationsphase und vor Einbringen der neuen Endothelzellen die Flusskammer für 2 min mit EC-Medium bei 0,2 Dyn/cm² gespült, um tote nicht adhärirte Zellen zu entfernen, die das Wachstum der lebenden Zellen beeinflusst hätten. Auf diese Weise konnten die Endothelzellen von 2 Isolationstagen in insgesamt 2 Kammern der *Low-Shear*-Platte eingebracht werden.

5.7.2.4 Kultur der adhärenierten, murinen, pulmonalen Endothelzellen im Kanal der Flusskammer

Zur Kultivierung der eingebrachten murinen Endothelzellen aus der Lunge eignet sich, verschiedenen Studien^{131;164;165} zufolge, ein schwerkraftbetriebener Fluss aus frischem EC-Medium. Deswegen wurde das EC-Medium jeden Tag sowohl aus dem *Inlet*, als auch aus dem *Outlet* entfernt und neues EC-Medium in verschiedenen Volumina hinzugegeben, sodass ein stetiger Fluss in der Kammer entstand.

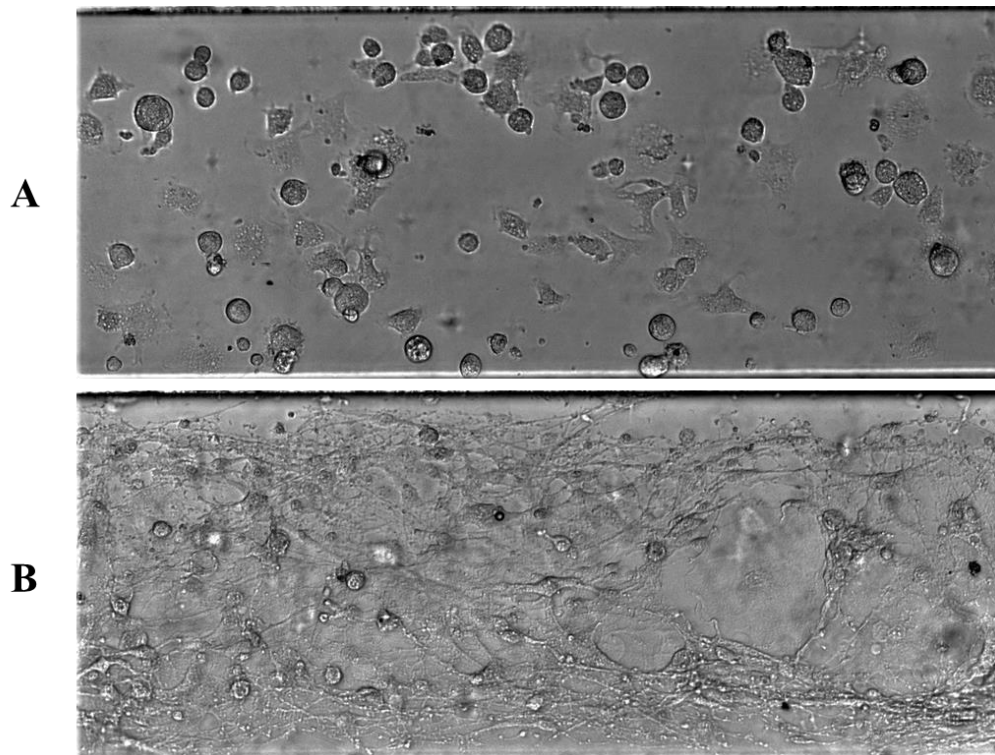


Abbildung 71: Entstehung eines Monolayers aus murinen, pulmonalen Endothelzellen im Kanal der Flusskammer. Repräsentative Bilder der murinen, pulmonalen Endothelzellen von WT-Mäusen in einem mit Fibronectin beschichteten Kanal der Flusskammer nach (A) 0 Tagen und (B) 7 Tagen Kultivierung. Aufgenommen mit einem LSM und 10x Objektiv.

In Abbildung 71 ist zu erkennen, dass es mit Hilfe dieser Methoden ermöglicht wurde einen nahezu vollständigen *Monolayer* im Kanal der Flusskammer zu kultivieren und damit die Aufgabe der „Etablierung eines Protokolls für die Isolation, Selektion und Kultivierung von murinen, pulmonalen Endothelzellen“ erfüllt wurde. Wichtig war dabei, dass in beiden Ebenen Endothelzellen wachsen, damit keine freie Fläche an Fibronectin mehr zur Verfügung steht. Dazu wurden repräsentative Bilder aus beiden Aufnahmeebenen erstellt (Abbildung 72). Zusätzlich wurde festgestellt, dass sich die Zellen bis zu 11 Tage in der Flusskammer kultivieren lassen. Weiterführende Experimente haben gezeigt, dass sie länger als 10 min und einem Druck von 20 Dyn/cm² aushalten, ohne sich abzulösen.

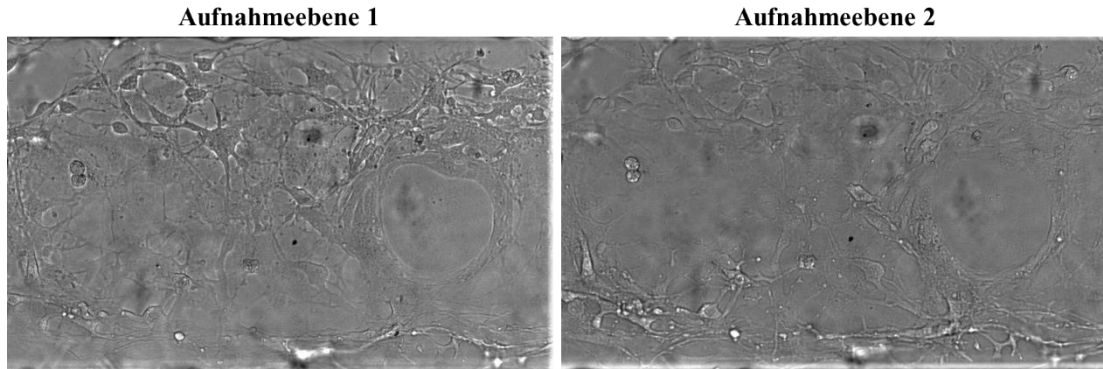


Abbildung 72: Monolayer aus murinen, pulmonalen Endothelzellen. Repräsentative Bilder der murinen, pulmonalen Endothelzellen von WT-Mäusen in einem mit Fibronectin beschichteten Kanal der Flusskammer nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Aufnahmeebenen (aufgenommen mit einem LSM und 10x Objektiv).

In zukünftigen Experimenten können nun die Interaktion von Thrombozyten aus Vollblut mit Endothelzellen analysiert werden. Dabei können die Interaktionen von WT-Thrombozyten mit WT-Endothelzellen bzw. die Interaktionen der PON2 oder NOX2 defizienten Thrombozyten mit PON2 oder NOX2 defizienten Endothelzellen sowie die Interaktion von WT-Thrombozyten mit PON2 oder NOX2 defizienten Endothelzellen und PON2 oder NOX2 defizienten Thrombozyten mit WT-Endothelzellen beobachtet werden, um einen Zell-spezifischen Einfluss der Enzyme NOX2 und PON2 zu untersuchen.

5.7.3 Vaskuläre Adhäsion muriner Thrombozyten und Thrombusbildung in einem arteriellen FeCl₃-induzierten Thrombosemodell der Maus (*in vivo*)

Auf Grund ihrer geringen Größe ist es in Mäusen möglich durch *in vivo* Studien mit einem Intravitalmikroskop Zusammenhänge zu visualisieren, die ansonsten nicht untersucht werden können, da alle Thrombosemodelle Limitationen aufweisen. Da bereits verschiedene Modelle basierend auf der Virchow'schen Trias im arteriellen System etabliert sind, wurden zur Untersuchung der arteriellen Thrombusbildung an der *Arteria carotis communis* und Auflösung des gebildeten Thrombus PON2^{-/-} und NOX2^{-/-}-Mäuse und deren WT-Kontrolle intravitalmikroskopisch mit dem arteriellen FeCl₃-Modell durch Dr. vet. med. Alexandra Grill am CTH untersucht.

5.7.3.1 PON2 beeinflusst die arterielle Gefäßverschlusszeit

Die Analyse der erhaltenen Ergebnisse zeigte, dass die Zeit bis zum kompletten Verschluss des Gefäßes in PON2^{-/-}-Mäusen nach Anlegen des FeCl₃-getränkten Filterpapiers an die Endothelwand der Arterie statistisch erhöht war, während die Zeit bis zur kompletten Wiedereröffnung keinen Unterschied zur WT-Kontrollgruppe aufwies (Abbildung 73).

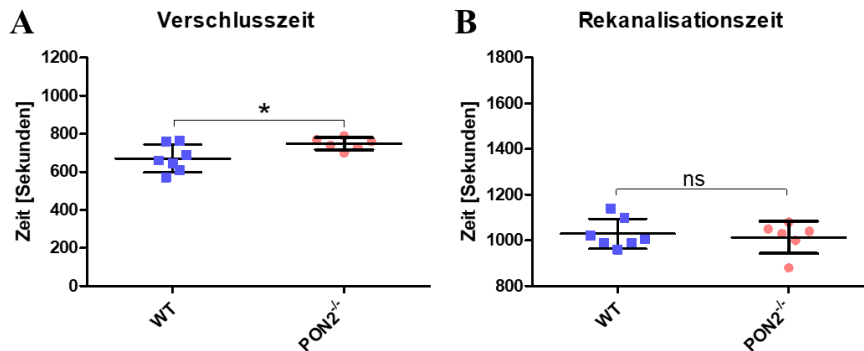


Abbildung 73: PON2 nimmt Einfluss auf die arterielle Thrombusbildung. Anwendung des FeCl₃-Modells und intravitalmikroskopische Untersuchung der Zeit bis (A) zum vollständigen Verschluss des arteriellen Gefäßes durch einen Thrombus (Verschlusszeit) und (B) der Zeit bis zur vollständigen Auflösung des Thrombus (Rekanalisationszeit) von PON2^{-/-}-Mäusen (n=6-7). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. *p<0,05; ns. nicht signifikant, zweiseitiger T-Test.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden zudem durch die aufgenommenen repräsentativen Bilder in Abbildung 74 wiedergespiegelt.

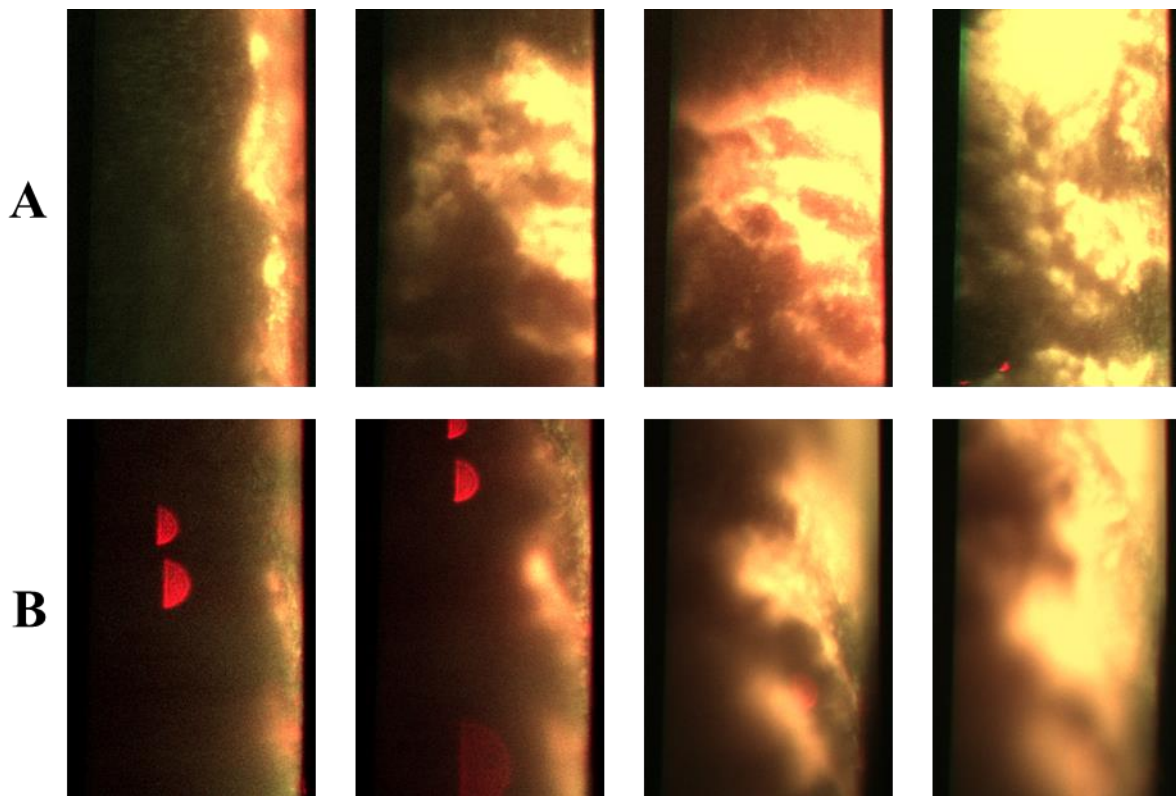


Abbildung 74: PON2^{-/-}-Mäuse zeigen eine verringerte arterielle Thrombusbildung. Repräsentative Bilder des intravitalmikroskopischen Versuchs des arteriellen FeCl₃-Modells von (A) WT-Mäusen und (B) PON2^{-/-}-Mäusen nach 300, 420, 600 und 720 s. Die Thrombozyten wurden im Vorfeld mit Rhodamin B Isothiocyanat gefärbt. Aufgenommen mit einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop mit der Emission bei 595 nm.

5.7.3.2 NOX2 beeinflusst die Bildung und die Auflösung eines arteriellen Thrombus.

Die erhaltenen Ergebnisse wiesen eine signifikante Erhöhung der arteriellen Verschlusszeit in NOX2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen, ebenso wie eine signifikante Erhöhung der Rekanalisationszeit auf (Abbildung 75). Die repräsentativen Bilder (Abbildung 76) unterstützen dabei die erhaltenen Ergebnisse zur arteriellen Verschlusszeit.

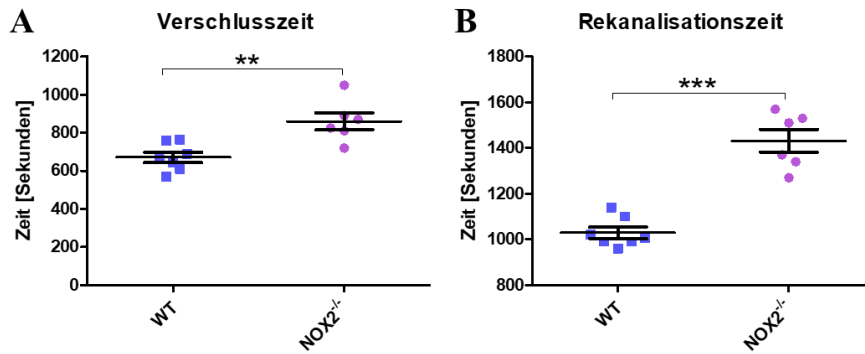


Abbildung 75: NOX2 beeinflusst die arterielle Thrombusbildung und Rekanalisation. Anwendung des FeCl₃-Modells und intravitalmikroskopische Untersuchung der Zeit bis (A) zum vollständigen Verschluss des arteriellen Gefäßes durch einen Thrombus (Verschlusszeit) und (B) der Zeit bis zur vollständigen Auflösung des Thrombus (Rekanalisationszeit) von NOX2^{-/-}-Mäusen (n=6-7). Scatterplot mit Mittelwert ±SEM. ***p<0,001; **p<0,01, zweiseitiger T-Test.

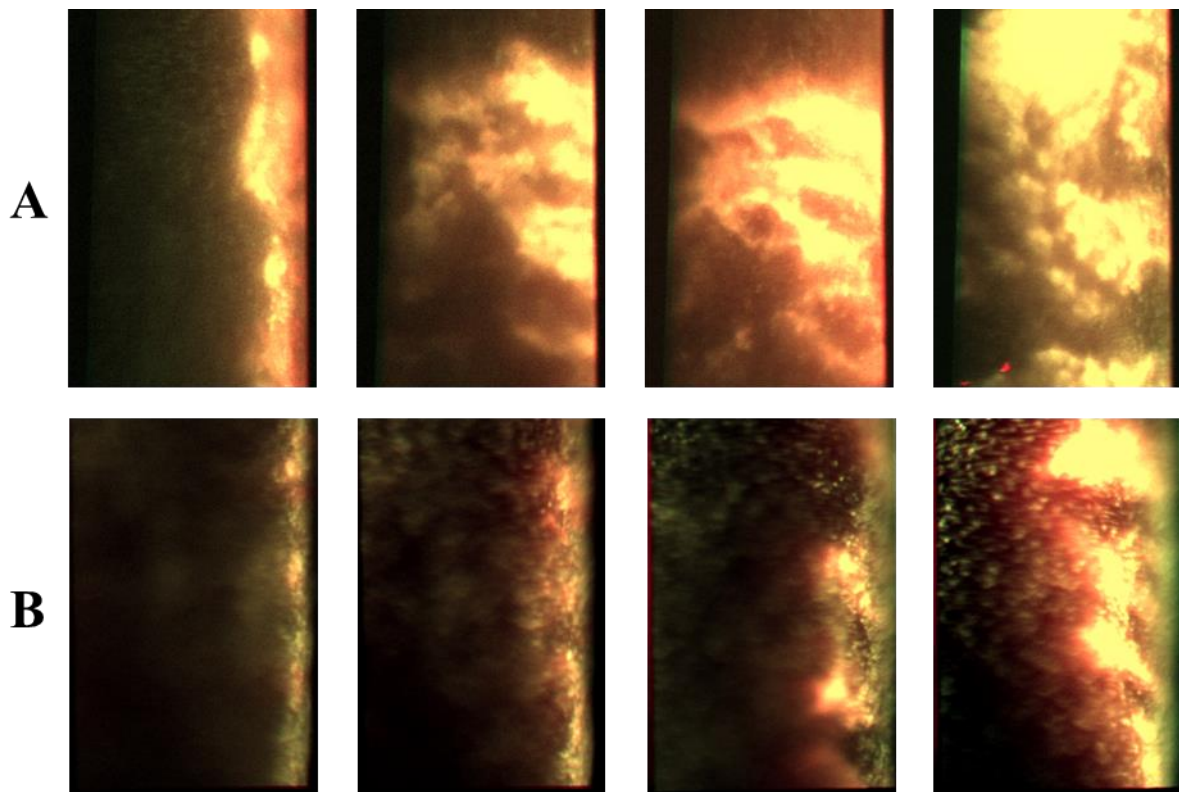


Abbildung 76: NOX2^{-/-}-Mäuse zeigen eine verringerte arterielle Thrombusbildung. Repräsentative Bilder des intravitalmikroskopischen Versuches des arteriellen FeCl₃-Modells von (A) WT-Mäusen und (B) NOX2^{-/-}-Mäusen nach 300, 420, 600 und 720 s. Die Thrombozyten wurden im Vorfeld mit Rhodamin B Isothiocyanat gefärbt. Aufgenommen mit einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop mit der Emission bei 595 nm.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle der Paraoxonase-2 (PON2) auf die Entwicklung und Funktion von Thrombozyten untersucht und die Erkenntnisse zur Rolle der NADPH Oxidase-2 (NOX2) in Bezug auf die Thrombozyten ausgebaut.

Dabei repräsentieren Thrombozyten ein wichtiges pharmakologisches Ziel, da sie sowohl in physiologischen Prozessen wie der Hämostase als auch in pathologischen Prozessen wie der Atherogenese und der Thrombose eine dominante Rolle einnehmen.

In Bezug auf PON2 und NOX2 zeigten bisherige Studien, dass beide zentral in pathologische Prozesse des kardiovaskulären Systems wie z.B. der Arteriosklerose^{166;167} involviert sind. Ebenso konnte in einer vorangegangenen Dissertation der Arbeitsgruppe die wesentliche Funktion der PON2 in der TF-abhängigen endothelialen Hämostase aufgeklärt und die damit verbundenen Redox-abhängigen und inflammatorischen Signalwege in der Gefäßwand gezeigt werden¹³⁸. Jedoch blieb bislang eine mögliche Beeinflussung der PON2 und NOX2 auf die thrombozytäre Hämostase unbekannt bzw. nur wenig aufgeklärt.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit an defizienten PON2 und NOX2 Mausmodellen konnten zeigen, dass sowohl PON2 als auch NOX2 wichtige Funktionen in Thrombozyten durch ihre anti-oxidative sowie pro-oxidative Charakteristik einnehmen und damit auch die Bindung an das Gefäßendothel im Rahmen der thrombozytären Hämostase beeinflussen.

6.1 PON2 und NOX2 regulieren ROS in murinen Thrombozyten

Thrombozyten sind hoch spezialisierte Zellen der Hämostase, die eine wichtige Rolle in der pathologischen Thrombose spielen, weswegen Modulationen der Thrombozyten durch ROS sich auf vielfältige Weise auswirken. Physiologisch fungieren ROS als Signalmoleküle und werden von Thrombozyten bei deren Aktivierung selbst vermehrt gebildet, da sie eine regulierende Rolle in der Bildung des Thrombus einnehmen⁷⁹.

Diese Verbindung mit dem ROS-Level und der Funktion der Thrombozyten diente als Grundlage für die Hypothese, dass das anti-oxidative Enzym PON2 und ebenso das pro-oxidative Enzym NOX2 durch Regulierung des Redox-abhängigen Mechanismus Einfluss auf die thrombozytäre Hämostase nimmt. Um diese Hypothese überprüfen zu können, mussten zunächst vergleichende ROS-Analysen an Thrombozyten von PON2^{-/-}; NOX2^{-/-}- sowie WT-Mäusen durchgeführt werden. Die folgende Diskussion der Ergebnisse wird dabei nach den untersuchten Mausstämmen unterteilt.

Zunächst deckten die in dieser Arbeit verwendeten hochsensitiven Methoden der ROS-Bestimmung (s. 5.3.1) in Thrombozyten ein signifikant erhöhtes Gesamt ROS-Level in Thrombozyten von PON2^{-/-}-Mäusen, als auch ein spezifisch erhöhtes Level an H₂O₂ in Thrombozyten von PON2^{-/-}-Mäusen auf, welches über den normalen Abbauweg des gebildeten Superoxid produziert wurde⁷⁹. Dabei beeinflusst PON2 aber auch die durch Thrombozyten bei deren Aktivierung durch Thrombin und Convulxin gebildeten ROS. Die Analysen im Vergleich zum WT zeigten eine erhöhte Produktion im Vergleich zu den basalen Werten des gleichen Mausstammes. Alle Ergebnisse der verschiedenen ROS-Messungen entsprachen den Erwartungen, die aus vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe hervorgingen. So konnte bereits 2007 von Horke mit Hilfe des Indikators L-012 an EA.hy 926 Zellen, behandelt mit einer PON2-siRNA im Vergleich zu naiven Zellen, ein erhöhtes ROS-Level nachgewiesen werden¹⁴. Dies wurde auch von Witte im Jahr 2011 bestätigt, die in der Studie mit Hilfe des Farbstoffes CM-H₂DCFDA einen gesteigerten ROS-Level in A549-Zellen nach PON2 knock-down detektieren konnte²⁷. Für primäres Gewebe/Zellen aus PON2^{-/-}-Mäusen konnte der gleiche Effekt zunächst von Ebert 2016 an murinen Endothelzellen¹³⁸ aus der Aorta und in ersten Experimenten 2018 auch an murinen Thrombozyten⁸⁷, sowie zuletzt tendenziell von Spiecker 2018 an murinen, hämatopoetischen Stammzellen¹³⁹ beschrieben werden.

Für NOX2 gab es im Gegensatz zu PON2 eine publizierte, ältere Studie von Delaney aus dem Jahr 2016, in der ein im Vergleich zum WT geringeres Gesamt ROS-Level in Thrombozyten nach der Behandlung mit Thrombin in NOX2^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden konnte¹⁴³, während eine neuere Studie von Sonkar aus dem Jahr 2019 keine signifikanten Unterschiede des ROS-Gehaltes im Vergleich zum WT fand¹⁸³. Diese publizierten Unterschiede können zum einen auf die unterschiedlich verwendeten Stämme an NOX2^{-/-}-Mäusen zurückzuführen sein. Der NOX2^{-/-}-Stamm, der kommerziell bei Jackson Laboratory zu erwerben und in der älteren Studie sowie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, wurde bei der neueren Studie heterozygot mit WT gekreuzt und mit unbekannter Generationsanzahl zurückgekreuzt, um mit den Wurfgeschwistern die Experimente durchzuführen. Zum anderen kann die unterschiedliche Zusammensetzung des Tyrode-Puffers speziell die Zugabe von CaCl₂ und MgCl₂ (ältere Studie) als auch die Zugabe von MgCl₂ und Prostaglandin E1 (neuere Studie) Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Die Ergebnisse der ROS-Messungen im Rahmen dieser Arbeit entsprachen und bestätigten die Ergebnisse der älteren Studie und zeigten ein signifikant verringertes Gesamt ROS-Level der NOX2^{-/-}-Thrombozyten unabhängig von der Zugabe von Thrombin oder Convulxin im Vergleich zum WT. Die Analysen der Ergebnisse zeigten zudem, dass die Produktion der ROS nach der Aktivierung im Vergleich zum WT im Bezug zu den basalen Werten der NOX2^{-/-}-Thrombozyten verringert war. Dies führt zur Aussage, dass NOX2 in den Thrombozyten eine primäre Quelle für die Produktion der ROS darstellt und essentiell für die Produktion der ROS nach Aktivierung der Thrombozyten ist. Allerdings muss diese Aussage mit dem Zusatz versehen werden, dass NOX2, bestätigt durch die Ergebnisse nicht an der direkten H₂O₂-Produktion in den Thrombozyten beteiligt ist, sondern spezifisch Superoxid produziert^{144;145}.

Da es bei einem hohen Gehalt an ROS zur Schädigung von Proteinen, Membranen und der DNA kommen kann, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Phänotypisierung der Thrombozyten der verwendeten Mausstämme durchgeführt, weil die Bildung der Thrombozyten durch die mit ROS assoziierten¹⁶⁹ polyploiden Megakaryozyten erfolgt. Dabei konnten Abweichungen von der WT-Kontrolle in den Thrombozyten von PON2-defizienten Mäusen festgestellt werden. Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) war signifikant erhöht, während die Konzentration der Thrombozyten im Vollblut von PON2^{-/-}-Mäusen signifikant verringert war.

Diese Veränderungen implizieren eine Störung der Thrombopoese, die mit einer Störung des ROS-Levels assoziiert sein könnte. Die Ansammlung der ROS auf Grund einer defekten Redox-Kopplung soll dabei zu einer unterschiedlichen hämatopoetischen Abstammungshäufigkeit und einer erhöhten Thrombopoese führen¹⁷⁰. Ergebnisse aus der vorrangegangenen Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe von Ebert von 2016 zeigten jedoch keine Veränderung der Lebensdauer von PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe¹³⁸ und es konnte auch keine Abweichung in den eigenen Daten in Bezug auf das MPV und die Anzahl der Thrombozyten in NOX2^{-/-}-Mäusen festgestellt werden, dessen Enzym NOX2 als primäre Quelle für ROS dient.

Daher wurde in weiterführenden Studien auf die Frage nach der Kausalität von ROS in Bezug auf weiterführende Effekte der PON2-Defizienz auf Thrombozyten durch Wiederholung einiger grundlegender Analysen mit NAC-behandelten PON2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT nachgegangen. Es konnte jedoch anhand der durchgeführten Versuche keine explizite Verminderung des Gesamt ROS-Gehaltes durch die kontinuierliche Behandlung von PON2^{-/-}-Mäusen mit dem Antioxidant NAC festgestellt werden, jedoch schien eine tendenzielle geringfügige Reduktion erreicht worden zu sein, dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant.

Dennoch konnte die labormedizinische Untersuchung des Blutbildes der NAC-behandelten PON2^{-/-}-Mäuse eine Verminderung des Effektes von PON2 im mittleren Thrombozytenvolumen aufdecken, jedoch blieb die verringerte Thrombozytenanzahl bestehen. Damit kann die Frage nach der Kausalität an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Möglichkeit für die Zukunft wäre eine Wiederholung des Versuches durch Substitution des Antioxidants oder einer Veränderung der Applikationsmethode. Dabei stellt Vitamin E bereits eine erprobte und eingesetzte Alternative zu NAC da und wurde bereits in multiplen Studien an Mäusen zur Reduktion des ROS-Levels angewendet^{171;172;173}.

Zusammenfassend ist es angeraten, in der Zukunft nach weiteren möglichen Ansätzen zur Erklärung der veränderten Thrombozytenanzahl zu forschen, da die Ergebnisse auf eine PON2-abhängige, jedoch ROS-unabhängige Modulation hinweisen.

6.2 Der pro-koagulatorische Status von murinen Thrombozyten ist abhängig von PON2 und NOX2

Grundlegend erfüllt das hämostatische System zwei gegensätzliche Aufgaben: Im Normalfall führt es als Schutzmechanismus des Körpers die Hämostase rasch und lokal aus, ansonsten gewährleistet es eine ständige Antikoagulation für die kontinuierliche Strömung des Blutes¹⁷⁴. Jedoch führen kleinere Störungen, die das System aus dem Gleichgewicht bringen, einerseits bei Überfluss von pro-koagulatorischen Faktoren zur erhöhten Ausbildung intravasaler Thromben und damit zum Zusammenhang von Atherothrombose und Hämostase, andererseits bei Überfluss von anti-koagulatorischen Faktoren zur erhöhten Blutungsneigung und inneren Blutungen. In diesem Zusammenhang ist die beschriebene Verbindung von PON2 und NOX2 für die Atherothrombose (s. 1.1.1 und 1.2.1) relevant und PON2 wurde in der vorrangigen Arbeit von Ebert 2016 für Endothelzellen als potenter anti-koagulatorischer Effektor dargestellt¹³⁸.

Dabei zeigten die Ergebnisse von Ebert, dass die anti-oxidative Wirkungsweise von PON2 in Endothelzellen die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) verhindert und dadurch vor der TF-Aktivierung schützt und gleichzeitig durch Erhöhung der endothelialen TFPI-Aktivität (engl. *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) die Aktivität von TF hemmt. Als Folge inhibiert PON2 die TF-FVIIa/FXa-vermittelte Thrombinbildung, was eine Verminderung der Aktivierung von intrinsischen Gerinnungsfaktoren zur Folge hat¹³⁸.

In dieser Arbeit deckten die angewendeten *in vitro* Ansätze neue Erkenntnisse zur Rolle der PON2 und NOX2 in Bezug auf die Regulation des pro-koagulatorischen Zustandes von Thrombozyten auf.

Hauptsächlich beteiligt am pro-koagulantem Status der Thrombozyten ist die Externalisierung von anionischen Phospholipiden, wie z. B. PS, die essentiell für die Membranbindung von Koagulationsfaktorkomplexen, einschließlich der für die Thrombin-Erzeugung erforderlichen Tenase- und Prothrombinase-Komplexe sind¹⁵². Die Ergebnisse der ersten Versuche mit dem Ca^{2+} -abhängigen Protein Annexin-V zeigten inverse Differenzen von PON2^{-/-}- bzw. NOX2^{-/-}-Thrombozyten, d.h. eine erhöhte Präsentation von anionischen Phospholipiden bei PON2^{-/-}-Thrombozyten sowie eine verringerte Präsentation bei NOX2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe, die nach der Aktivierung durch hohe Konzentrationen der Agonisten Convulxin oder Calcymicin vollständig verschwanden.

Durch vorangegangenen Studien wurde belegt, dass ROS die PS-Externalisierung induziert¹⁷⁵, ebenso wurde in vergangenen Studien der Arbeitsgruppe von Horke 2007 und Witte 2011 bewiesen, dass eine Überexpression von PON2 in Endothelzellen, welche mit ROS-induzierenden Substanzen stimuliert wurden, die Superoxid-Produktion vermindert und die PS-Externalisierung reduziert^{14;27}.

Damit gibt es einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten ROS-Bildung und der verstärkten PS-Externalisierung von PON2^{-/-}-Thrombozyten, sowie gegensätzlich die erniedrigte ROS-Bildung und damit einhergehend die verringerte PS-Externalisierung in NOX2^{-/-}-Thrombozyten. Der Mechanismus erfolgt für das transmembrane, aktivierte NOX2 über die Bildung von Superoxid in der Zelle, was in der Folge zur PS-Externalisierung führt. Für PON2 sind zwei verschiedene Wege denkbar. Zum einen ist PON2 in den Mitochondrien lokalisiert und verhindert durch Bindung an der inneren Mitochondrienmembran an das Coenzym Q10 die Übertragung der Elektronen aus dem Komplex I und dem Komplex III der mitochondrialen Atmungskette auf molekularen Sauerstoff^{13;17;23}. Zum anderen transloziert PON2 als Antwort auf oxidativen Stress von den Mitochondrien bzw. vom Endoplasmatischen Retikulum in die Plasmamembran²⁴ und inhibiert dort die Lipidperoxidation der Phospholipide der Plasmamembran zu Phospholipidhydroperoxiden, die nun keine PS-Externalisierung induzieren¹⁷⁶.

Versuche mit dem Ca²⁺-unabhängigen Marker für PS, Lactadherin bestätigten die mit Annexin-V erhaltenen basalen Ergebnisse, zeigten aber Abweichungen bei der Stimulation mit Convulxin mit einer erhöhten Präsentation an PS für PON2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zur WT- Kontrollgruppe und im Vergleich zum Ca²⁺-abhängigen Annexin-V. Dies könnte auf eine weitere Aktivierung der Thrombozyten zurückzuführen sein, die durch Ca²⁺-Ionen induziert werden kann¹⁷⁷.

Weiterführende Analysen zur Kollagen-vermittelten Adhäsion pro-koagulanter muriner Thrombozyten wurden entsprechend des im Rahmen der Masterarbeit von Jennifer Oberländer optimierten Protokolls⁹⁸ für Citrat-antikoaguliertes Vollblut ohne und mit Thrombin Inhibition für PON2^{-/-}- und WT-Mäuse durchgeführt.

Dabei zeigten die Ergebnisse wie nach den ersten Analysen zu erwarten eine signifikante Verminderung der prozentualen Oberflächenbedeckung Annexin-V-FITC gefärbter Thrombozyten beider untersuchten Mausstämme mit Thrombin-Inhibition im Vergleich ohne Thrombin-Inhibition, die sich durch die synergistische Wirkung der Agonisten Kollagen und dem zusätzlich generierten Thrombin auf den pro-koagulanten Zustand der Kollagen-adhärenzten Thrombozyten erklären lässt¹⁷⁸. Allerdings wiesen die Ergebnisse auch auf einen Aktivierungsdefekt bezüglich des pro-koagulanten Zustandes bereits adhärenzter muriner Thrombozyten mit PON2-Defizienz hin. Dies könnte darauf hindeuten, dass PON2^{-/-}-Thrombozyten, die vermehrt anionische Phosphatidylserine auf der Oberfläche präsentieren, nicht bevorzugt an Kollagen unter arteriellen Scherkräften adhären.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die PS-Externalisierung durch PON2 und NOX2 ROS-abhängig aber Ca²⁺-unabhängig beeinflusst und die Adhäsion der pro-koagulanten Thrombozyten an einer Kollagen-präsentierenden Oberfläche unter Flussbedingungen von PON2 beeinflusst wird, da PON2 basal vor spontan erhöhter ROS-Bildung und damit PS-Externalisierung schützt und die Thrombozyten in einem ruhenden Zustand hält. Keinen Einfluss auf die gefundene verminderte Adhäsion an Kollagen von PON2^{-/-}-Thrombozyten haben dagegen die nachgewiesenen erhöhten Rezeptorlevel von GPVI sowie $\alpha_2\beta_1$ im Vergleich zum WT.

Es zeigte sich in fortführenden Versuchen, dass die Regulation des pro-koagulanten Status von PON2 und NOX2 Auswirkungen auf weitere beschriebene pro-koagulante Attribute besitzt und die Thrombozyten in ihrer Aktivität beeinflusst¹⁷⁸. Dies wurde zum einen nachgewiesen, indem auf der Oberfläche von basalen PON2^{-/-}-Thrombozyten eine erhöhte Expression von P-Selektin im Vergleich zu WT-Thrombozyten stattfindet, während die Ergebnisse für basale NOX2^{-/-}-Thrombozyten eine verringerte P-Selektin Exposition auf ihrer Oberfläche beschreiben. Zum anderen steht es auch in Verbindung mit den gefundenen Abweichungen der Ergebnisse zur Bindungskapazität von vWF für PON2-defiziente Thrombozyten, welche basal eine erhöhte vWF-Bindung aufwiesen, die sich nach moderater Stimulation mit Botrocetin dem WT wieder anglich.

Dies kann von der erhöhten Expression des Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa auf PON2^{-/-}-Thrombozyten beeinflusst sein. Im Gegensatz dazu zeigten die Resultate, dass die Bindung von vWF an NOX2^{-/-}-Thrombozyten verringert ist und sich sofort dem WT nach Stimulation wieder anglich und damit mit dem Aktivierungszustand als mit dem Expressionslevel von GPIIb/IIIa assoziiert ist. Interessant dazu ist, dass die Expression von GPIIb/IIIa, der als pro-koagulante Eigenschaft beschrieben wurde¹⁷⁸ bzw. der in die pro-koagulante Aktivität der Thrombozyten involviert ist¹⁷⁹, weder von PON2 oder NOX2 beeinflusst wird und die Ergebnisse der ruhenden Thrombozyten keine Differenzen zum WT aufwiesen.

Zusammenfassend stellt anhand der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der miteinbezogenen vorangegangenen Studien PON2 einen potenten anti-koagulatorischen Effektor bzw. NOX2 einen potenten pro-koagulatorischen Effektor dar, der durch seine anti-oxidative bzw. seine pro-oxidative Wirkungsweise den pro-koagulanten Status zirkulierender Thrombozyten, sowie deren Adhäsion beeinflusst.

6.3 Die thrombozytäre Hämostase in Mäusen wird von PON2 und NOX2 reguliert

Thrombozyten tragen entscheidend zur Hämostase bei, indem sie besonders in der primären Hämostase nach einer Verletzung der vaskulären Gefäßwand oder durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaque die Ausbildung eines primären Thrombus durch die Adhäsion der Thrombozyten über Membranrezeptoren, die Aktivierung der Thrombozyten durch *outside-in* und *inside-out* Signale und schließlich die Aggregation der Thrombozyten durch die Ausbildung von Fibrinogenbrücken ermöglichen (s. 1.4.2).

Da bereits im vorherigen Abschnitt (6.2) eine Rolle der Enzyme PON2 und NOX2 auf den Zustand der zirkulierenden Thrombozyten, sowie für PON2 auf die Adhäsion in Abhängigkeit des pro-koagulanten Zustandes der Thrombozyten festgestellt und diskutiert wurde, wird im nachfolgenden Abschnitt die Rolle der PON2 und NOX2 auf die einzelnen Abschnitte der thrombozytären Hämostase (Adhäsion-Aktivierung-Aggregation) diskutiert.

Für die *in vitro* Untersuchung der thrombozytären Adhäsion und Aggregation an Adhäsionsproteinen im antikoagulierten Vollblut unter Flussbedingungen eignet sich das Flusskammermodell¹⁸⁰ in dem zusätzlich eine Analyse der Thrombin-vermittelten Blutgerinnung durch eine direkte Antikoagulation mit niedermolekularem Heparin und dem direkten Thrombin-Inhibitor PPACK in vielen Studien etabliert ist¹⁸¹. Die aus dem optimierten Flusskammersystem erhaltenen Analysen deckten interessanterweise eine signifikant verminderte Adhäsion von PON2-defizienten Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe auf, die unabhängig von der Thrombin-Inhibition beobachtet wurde. Dies weist darauf hin, dass die PON2-Defizienz in murinen Thrombozyten sowohl die direkte thrombozytäre Bindung an Kollagen als auch die Thrombin- und Fibrin-vermittelte thrombozytäre Vernetzung unter arteriellen Scherstressbedingungen signifikant beeinträchtigt. Bereits genannt steht diese Aussage im Gegensatz zu dem bereits in dieser Arbeit erbrachten Ergebnis, das murine PON2-defiziente Thrombozyten intrazellulär vermehrt ROS produzieren und eine vermehrte ROS-Produktion mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung bzw. Thrombozytenreaktivität beschrieben worden ist⁸⁷.

Die Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Analysen zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, der bei Aktivierung seine Konformation ändert, als auch durch Analysen des bei der Thrombozytenaktivierung auf der Oberfläche präsentierenden P-Selektin in PON2^{-/-}, NOX2^{-/-} und WT-Thrombozyten als deren Kontrolle untersucht. Die Auswahl der Agonisten Thrombin, Convulxin und ADP ergab zusätzlich Erkenntnisse über den Einfluss beider Enzyme auf die zwei wichtigsten Phospholipase Cbeta- (PLCbeta) und Phospholipase Cgamma (PLCgamma)-abhängigen Signaltransduktionswege¹⁵⁶, die zur Aktivierung der Thrombozyten führen. Die Ergebnisse deckten ähnlich denen des Flusskammermodells eine signifikant verringerte Aktivierbarkeit von PON2-defizienten Thrombozyten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe auf, die für den aktivierten GPIIb/IIIa für alle eingesetzten Agonisten im Plättchen-reichen-Plasma (PRP) gemessen wurde. Allerdings zeigten die Ergebnisse bei der Thrombin vermittelten Aktivierung eine Konzentrations-abhängige Angleichung zum WT. Die Ergebnisse für die Oberflächenexpression von P-Selektin auf aktivierten PON2^{-/-}-Thrombozyten waren dagegen nur signifikant nach Stimulation mit Convulxin und Thrombin bei sehr niedrigen Konzentrationen im PRP nicht aber in gewaschenen Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Diese Auffälligkeit könnte für Thrombin durch die Resultate aus der vorangegangenen Arbeit von Ebert erklärt werden, die im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe in PON2^{-/-}-Thrombozyten sowohl eine signifikant erhöhte basale als auch eine erhöhte Thrombin-stimulierte Thrombozyten-vermittelte Thrombinbildung durch die *calibrated automated thrombography* (CAT)-Methode ermittelt hatte¹³⁸, der als reziproker Faktor den Einfluss der PON2 wieder aufhebt und additiv die Konzentration an Thrombin bei der Thrombin-induzierte Aktivierung von GPIIb/IIIa und P-Selektin erhöht.

Zusammen mit dieser Beobachtung weisen die Ergebnisse darauf hin, dass PON2 in beide Signaltransduktionswege, zum einen über PLCbeta, als auch PLCgamma zur Aktivierung der Thrombozyten eingebunden ist und eine erhöhte Menge an ROS durch die Defizienz von PON2 zu einer allgemeinen Verminderung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten *in vitro* führt.

Im Gegensatz zu PON2 zeigten die Analysen zur Thrombozytenaktivierung mit NOX2, dass diese nur nach der Stimulation über die Agonisten Thrombin und Convulxin, nicht aber nach der Stimulation mit ADP eine signifikant erhöhte Präsentation von P-Selektin an ihrer Oberfläche sowohl in gewaschenen Thrombozyten als auch in Thrombozyten aus PRP, sowie eine signifikant erhöhte Aktivierung des GPIIb/IIIa in gewaschenen Thrombozyten aufwiesen. In Bezug auf die vorhandene Literatur sind diese neuen Erkenntnisse für NOX2 kontrovers anzusehen, allerdings zeigten die publizierten Studien untereinander selbst Unterschiede in ihren Ergebnissen auf.

So wurde 2014 von Walsh et al. kein Effekt von NOX2 auf die Exozytose von P-Selektin beschrieben¹⁵⁶, während Kim et al. 2015 bei geringen Konzentrationen von Thrombin eine verringerte Oberflächenpräsentation von P-Selektin, sowie eine verringerte Aktivierung von GPIIb/IIIa auf NOX2^{-/-}-Thrombozyten entdeckten¹⁸².

Delaney et al. sahen dagegen 2016 eine starke verringerte Aggregation nach Stimulation mit *Collagen-related-peptide* (CRP) aber nur eine partiell verringerte Aggregation mit Thrombin in NOX2^{-/-}-Thrombozyten¹⁴³ und in der neuesten Studie von 2019 erachtet Sonkar et al. NOX2 als nicht notwendig für die Thrombozytenaktivierung¹⁸³. Diese unterschiedlich publizierten Ergebnisse stehen im Zusammenhang mit der Behandlung und der Isolierungsmethode der murinen Thrombozyten aus NOX2^{-/-}-Mäusen, die keinem einheitlichen Protokoll folgten und es wahrscheinlich durch Zugabe von Antagonisten bzw. anderen Modulatoren der Thrombozytenfunktion zu einer Voraktivierung bzw. inhibierenden Beeinflussung der Thrombozyten gekommen ist.

Für die Untersuchungen der Thrombozytenaggregation wurde das vielfach publizierte und optimierte turbimetrischen Verfahren nach Born¹²¹ angewendet.

PON2^{-/-}-Thrombozyten im PRP zeigten dabei sowohl nach der Stimulation mit ADP, als auch nach der Stimulation mit Convulxin eine signifikant erniedrigte Aggregation im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe, während NOX2^{-/-}-Thrombozyten eine signifikant erhöhte Aggregation nach der Stimulation mit ADP und eine tendenziell erhöhte Aggregation nach der Stimulation mit Convulxin aufwiesen. Dies ist mit den Ergebnissen der Thrombozytenaktivierbarkeit im vorherigen Abschnitt assoziiert, da der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa eine zentrale Bedeutung in der Thrombozytenaggregation einnimmt, indem er durch seine Konformationsänderung die Bildung von „Fibrinogenbrücken“ zwischen zwei Thrombozyten ermöglicht⁶⁰. Ein Einfluss von sezerniertem ADP auf die Aggregation, d.h. ADP, das durch die Freisetzung aus den α -Granula als Feedback-Agonist agiert, ist nicht wahrscheinlich, da die Ergebnisse für die Mepacrine-Freisetzung keinen Unterschied für beide untersuchten Mausstämmen im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe aufzeigten.

Das weiterführende Experiment zur *in vivo* Untersuchung der Thrombusbildung durch vaskuläre Adhäsion mit dem arteriellen, TF-abhängigen FeCl₃-Thrombusmodell¹³⁷, deutete entgegen der zuvor ermittelten Ergebnisse eine signifikant höhere Zeit bis zum kompletten Verschluss und zur Auflösung des Thrombus im Vergleich zum WT für NOX2^{-/-}-Thrombozyten an, während PON2^{-/-}-Mäuse zwar auch eine signifikant erhöhte Zeit bis zur Ausbildung des Thrombus aufwiesen, die Ausprägung jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe gering ist.

Erklärt werden könnte dies durch die von Ebert aus der vorangegangenen Arbeit getätigte Aussage, die eine verstärkte Gerinnungsaktivität der PON2^{-/-}-Thrombozyten durch externe Signale vom pro-koagulatorischen PON2^{-/-}-Endothel durch Vermittlung einer endothelialen TF-abhängigen Aktivierung von Thrombin sieht. Dies schloss aber auch, durch Befunde der Gerinnungszeitmessung von chimären Mäusen belegt, eine primäre Funktion der Thrombozyten in der verstärkten Hämostase der PON2^{-/-}-Mäuse mit aus und betont die Relevanz eines PON2-vermittelten *EC-to-platelet signalings*¹³⁸.

Dies könnte auch eine mögliche Ursache der Hyperreaktivität der Thrombozyten im Bereich der Koagulation wie im Abschnitt 6.2 aufgeführt, darstellen. Andererseits gingen die Ergebnisse des arteriellen *in-vivo* Modells einher mit den *in vitro* Ergebnissen zur Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen Typ I, sowie der Agonisten-induzierten GPIIb/IIIa-Aktivierung und P-Selektin Oberflächenpräsentation und Thrombozytenaggregation. Dies deutet daraufhin, dass die thrombozytäre Hämostase in PON2^{-/-}-Mäusen eine dominante Rolle einnimmt.

Im Gegensatz dazu weisen die Ergebnisse in NOX2^{-/-}-Mäusen auf einen zum Teil verringerten Einfluss der thrombozytären Hämostase in der primären und sekundären Hämostase hin. Stattdessen könnte es hier dominierend zu indirekten Effekten der vaskulären Zellen kommen, welche die Thrombusbildung verhindern.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass PON2-defiziente Thrombozyten unabhängig von ihrer pro-koagulatorischen Aktivität hyporeaktiv für Funktionen der primären Hämostase *in vitro* und *in vivo* sind. Im Unterschied dazu sind NOX2^{-/-}-Thrombozyten unabhängig ihrer anti-koagulatorischen Aktivität hyperreaktiv für Funktionen der primären Hämostase *in vitro*. Erklärt werden könnte dies mit der Hypothese, dass chronisch intrazellulär gebildete ROS in PON2-defizienten Thrombozyten zu einem chronisch erhöhten pro-koagulantem Zustand aber zu einer verminderten Reaktivität in Bezug auf Adhäsion und Aggregation führt. Eine dauerhafte Verringerung der intrazellulär gebildeten ROS in NOX2^{-/-}-Thrombozyten führt andererseits zu einem chronischen anti-koagulantem Zustand, der aber mit einer erhöhten Reaktivität in Bezug auf Adhäsion und Aggregation einhergeht. Diese Hypothese müsste in Zukunft durch weitere Analysen abgeklärt werden, indem z.B. indirekte Effekte durch andere Blut- und vaskuläre Zellen durch *in vivo* Thromboseversuche mit Thrombozytenspezifischen PON2^{-/-}- bzw. NOX2^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden.

6.4 Wechselspiel der Ca^{2+} -Homöostase und PON2 bzw. NOX2 in murinen Thrombozyten

Ca^{2+} ist in fast allen Zellen ein essentieller sekundärer Botenstoff, der eine Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse reguliert¹⁸⁴. In Bezug auf die Thrombozyten sind Ca^{2+} -Ionen notwendig für verschiedene Schritte der zellulären Aktivierung, wie z.B. die für die Formveränderung notwendige Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts¹⁸⁵, die Degranulation oder die *Inside-out*-Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, der für die Aggregation der Thrombozyten unerlässlich ist¹⁸⁶. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entstammt dabei der Freisetzung von Ca^{2+} primär aus dem DTS oder durch den Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} durch die Plasmamembran über Ca^{2+} -Kanäle^{60;187}.

Die aus den etablierten Protokollen erhaltenen Analysen deckten eine signifikant erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in basalen sowie in Convulxin stimulierten PON2^{-/-}-Thrombozyten auf. Für NOX2^{-/-}-Thrombozyten waren die Ergebnisse invers zu denen von PON2^{-/-} und zeigten eine signifikant verringerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die ebenfalls nach der Stimulation signifikant verringert blieb. Eine Zugabe an extrazellulärem Ca^{2+} veränderte die erhaltenen Ergebnisse nicht, sondern erhöhte gleichmäßig bei allen drei untersuchten Mausstämmen die gemessene intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Da ROS die Ca^{2+} -Signaltransduktion beeinflusst¹⁸⁸ weist dies darauf hin, dass PON2 und NOX2 über die ROS-Redox Kontrolle Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase in Thrombozyten nehmen. Auf der anderen Seite ist auch bekannt, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen Einfluss sowohl auf PON2 wie auf NOX2 nehmen, da zum einen die Aktivierung verschiedener stimulierender Proteinkinase C (PKC)-Isoformen Ca^{2+} -abhängig ist, weswegen Ca^{2+} die Aktivierung der NOX2 und damit die Produktion von ROS reguliert, was für Makrophagen gezeigt wurde¹⁸⁹. Zum anderen inaktiviert ein verstärkter Ca^{2+} Zufluss die Aktivität von PON2 und verändert seine Expression, nachgewiesen in der permanenten EA. hy926 Zelllinie^{190;191}.

Zusammenfassend bildet also die Interaktion zwischen ROS und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einen regulatorischen Kreislauf, was die fortführenden Experimente zur Aktivierbarkeit der Thrombozyten unter dem Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} bestätigten. Die Analysen wiesen dabei eine Angleichung der zuvor beobachteten und diskutierten (6.3) Differenz der Agonisten-induzierten GPIIb/IIIa-Aktivität und P-Selektin Oberflächenpräsentation von Thrombozyten von PON2^{-/-}- und NOX2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ihrer WT-Kontrollgruppe auf.

6.5 Die Bedeutung der Ergebnisse für zukünftige Forschungsrichtungen und die Rolle der PON2 und NOX2 für gerinnungshemmende Therapieansätze

Wie beschrieben reagieren Thrombozyten auf verschiedene Reize mit der Produktion von ROS, der als sekundärer Botenstoff den pro-koagulanten Phänotyp im Blut zirkulierender Thrombozyten verursacht. Verschiedenste Studien schreiben dem Enzym NOX2 eine dominante Rolle der Produktion von ROS in Thrombozyten zu^{167;182}, während das Enzym PON2 die Bildung der mitochondrialen ROS verhindert¹⁴. Die aus dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse weisen auf einen Einfluss auf die thrombozytäre Hämostase durch Regulation der ROS *in vivo*. Um dies zu verifizieren, wurde damit begonnen, PON2^{-/-}-Mäuse mit dem Antioxidant NAC über das Trinkwasser zu behandeln, um nach der Normalisierung des ROS-Gehaltes die Auswirkungen auf den Phänotyp für die Gerinnung zu überprüfen. Dabei ergaben erste Ergebnisse keine Normalisierung des ROS-Gehaltes im Vergleich zum WT, hingegen eine tendenzielle Abnahme des ROS-Gehaltes im Vergleich zu PON2^{-/-}-Mäusen. Dennoch zeigte dies bereits signifikante Änderungen im Phänotyp der Thrombozyten und verringerte signifikant das MPV im Vergleich zum PON2^{-/-}. Eine Verifizierung für NOX2 könnte in der Zukunft durch Studien mit Vorbehandlung der Thrombozyten bzw. Vorbehandlung der WT-Mäuse mit Ebselen, Perhexilin oder Celastrol durchgeführt werden. Alle drei aufgeführten Antioxidantien zeigten eine hohe NOX2-Spezifität¹⁹² und wurden bereits an Mäusen in verschiedenen Studien angewendet^{193;194}.

Für eine Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass oxidativer Stress ausgelöst durch ROS zur Pathogenese beiträgt bzw. die Progression fördert. Insbesondere dem Superoxid, als Mitglied der ROS kommt eine zentrale Rolle bei der Modulation des peripheren Gefäßwiderstandes zu, indem es den stets wirksamen endogen gebildeten Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) abfängt, zum stark oxidativen Peroxynitrit umwandelt und damit eine endotheliale Dysfunktion auslösen kann¹⁹⁵.

Daher erscheint zunächst eine anti-oxidative Behandlung entweder als Prävention für vaskuläre Ereignisse oder zur Langzeittherapie von Patienten mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vielversprechende Aussichten zu besitzen. Eine Vielzahl klinischer Studien untersuchte diesen Therapieansatz, durch die Gabe von Antioxidantien zur Reduzierung des Risikos für primäre oder sekundäre kardiovaskuläre Ereignisse bzw. zur Reduzierung der kardiovaskulären Mortalität.

Dabei ergaben die Ergebnisse aus dem Großteil der Studien, dass dies keinen Nutzen in der Reduzierung des kardiovaskulären Risikos bringt und sogar auf eine Zunahme der kardiovaskulären Morbidität hindeutet^{196;197;198;199}.

Nur ein kleiner Teil der z.T. nicht ausreichend kontrollierten Studien zeigte, dass Antioxidantien wie Vitamin C oder Vitamin E einen positiven Nutzen haben können^{200;201;202}. Zusammenfassend weist dies darauf hin, dass der Therapieansatz zur Behandlung bzw. Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen durch die globale Gabe von hochdosierten Antioxidantien zur Inhibition von Radikalen (engl. *radical scavenging*) kein erfolgsversprechender Ansatz ist²⁰³.

Anstatt dessen stellt die selektive Modulation von pro-oxidativen pathologischen Prozessen in verschiedenen Zelltypen eine neue Form des therapeutischen Ansatzes dar. Die Grundlage bildet dabei die Erforschung von spezifischen molekularen und zellulären Mechanismen ROS-vermittelter Signale in kardiovaskulären Pathologien. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf PON2 und NOX2 interessant, da gezeigt wurde, dass z.B. eine chronisch pro-oxidative Umgebung durch Defizienz von PON2 zu einem prokoagulatorischen Zustand der Thrombozyten im Blutkreislauf, auf der anderen Seite zu einer Hemmung der Thrombozytenreaktivität für Funktionen der primären Hämostase führt, weswegen die selektive Inhibierung pro-oxidativer Ansätze bzw. selektive anti-oxidative Ansätze von mehreren Seiten betrachtet werden müssen.

Von Interesse wäre dabei auch die Etablierung eines PON2-überexprimierenden Mausmodells zur Begutachtung der möglichen protektiven Funktion von PON2 bei thrombotischen Erkrankungen, um die PON2-Überexpression als Therapiestrategie im Gerinnungsmanagement zu überprüfen. Erste Ansätze zur Etablierung dieses Mausmodells wurden bereits im Zuge der Rolle der PON2 in der Tumorforschung unternommen, bei dem eine Inhibierung des Tumorwachstums des Eierstockkrebses festgestellt wurde²⁰⁴.

Für die Rolle der NOX2 und der PON2, die beide durch die Modulation der ROS *in vivo* eine Assoziation zur Atherogenese besitzen²⁰⁵, sind die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls von Bedeutung. Obwohl bereits diskutiert die Rolle der Thrombozyten in der Regulation der Hämostase durch die endotheliale Hämostase beeinflusst wird¹³⁸, ist die Erforschung der *in-vivo* Bildung eines Thrombus unter dem Einfluss von NOX2 bzw. PON2 am Anfang.

Ein möglicher Forschungsansatz basiert auf der Grundlage, dass bekanntermaßen die Hämostase z.B. durch die verstärkte TF-Expression in arteriosklerotischen Läsionen zur Plaque-Thrombogenizität beiträgt^{206;207}, d.h. TF wirkt pro-atherogen und insbesondere im Komplex mit den Gerinnungsfaktoren FVIIa und FXa stimuliert er pro-atherogene Signalwege, die u. a. die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten an das Endothel sowie die Migration von glatten Muskelzellen induzieren^{208;209;210;211;212}.

Erste Ergebnisse beschreiben dabei in *in vitro* Modellen, wie dem Flusskammermodell, eine verringerte Kollagen-abhängige Thrombusbildung für NOX2^{-/-156} ebenso wie für PON2^{-/-}. Eine Übertragung auf TF-abhängige *in vivo* Modelle zur Betrachtung von Zell-Zell-Interaktion waren dabei mit dem *in vitro* Modell jedoch nicht vergleichbar¹⁸³ und weisen auf andere regulierenden Faktoren hin.

Daher ist ein zweiter möglicher Forschungsansatz die TF-unabhängige Erforschung der Thrombusbildung durch TF-unabhängige *in vivo* Modelle, z.B. durch Zugabe TF-inhibierender Substanzen, um die Ergebnisse für PON2 und NOX2 des *in vitro* Modells zu verifizieren. Neuere Studien zeigten ebenfalls dazu, dass die selektive Inhibierung von Thrombin oder FXa durch direkte orale Antikoagulantien, die zur Behandlung von Thrombosen und für die primäre oder sekundäre Thrombose-Prävention eingesetzt werden, in ApoE^{-/-} Mäusen einen Rückgang der Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Plaques sowie z. T. eine Verminderung von oxidativem Stress bewirkten^{213;214}.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Hinweise auf die durch PON2 und NOX2 regulierenden Redoxsignalwege und deren Einfluss auf die thrombozytäre Hämostase bzw. Bildung eines Thrombus, die möglicherweise neue therapeutische Ziele für anti-oxidative Interventionen darstellen könnten.

7 Zusammenfassung

Die Aktivierung von Thrombozyten ist für den hämostatischen Prozess von entscheidender Bedeutung und ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel um Thrombosen entgegenwirken zu können. Dabei spielt der Gehalt an Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle, da Redox-vermittelte Mechanismen durch erhöhte Bildung an ROS zu einem pro-thrombotischen Zustand beitragen und ein entzündliches Milieu verursachen. Paraoxonase-2 (PON2), ein anti-oxidatives Protein und NADPH-Oxidase-2 (NOX2), ein pro-oxidatives Protein, sind zentral in pathologische Prozesse des kardiovaskulären Systems involviert. Da die Hämostase maßgeblich zu kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt, wurde ein Einfluss beider Proteine auf die Regulation pathophysiologischer Prozesse über Redox-vermittelte Mechanismen im Gefäßsystem vermutet und in einer vorrangegangenen Dissertation für Endothelzellen untersucht und bestätigt.

In dieser vorliegenden Arbeit wurde erstmalig beschrieben, dass eine Defizienz von PON2 als auch von NOX2 direkt Einfluss auf die Redox-Kontrolle von Thrombozyten, ihre Aktivierbarkeit und die Interaktionen von Thrombozyten mit anderen Zellen zur Bildung eines Thrombus *in vitro* und *in vivo* nehmen.

Konfokale- und Elektronenmikroskopie beschrieben dabei erstmals die genaue Lokalisation von PON2 in Thrombozyten und durchflusszytometrische Untersuchungen deckten für PON2^{-/-}-Thrombozyten einen dauerhaft erhöhten intrazellulären ROS-Gehalt, sowie einen prokoagulatorischen Zustand und eine signifikant erhöhte Oberflächenpräsentation an P-Selektin im basalen Zustand *ex vivo* auf. Bei Zugabe eines Agonisten auf PON2^{-/-}-Thrombozyten reagierten diese hyporeaktiv auf die Funktionen der primären Hämostase *in vitro*. Zudem zeigten die Ergebnisse von PON2^{-/-}-Mäusen einen dominierenden Einfluss der thrombozytären Hämostase für die Bildung eines Thrombus *in vivo*.

Die durchflusszytometrischen Messungen für NOX2^{-/-}-Thrombozyten offenbarten einen anti-koagulatorischen Zustand, der mit einer signifikant erniedrigten Oberflächenpräsentation an P-Selektin im basalen Zustand *ex vivo* einhergeht. Durch die Zugabe eines Agonisten reagierten die NOX2^{-/-}-Thrombozyten hyperreaktiv auf die Funktionen der primären Hämostase *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* bei der Bildung eines Thrombus.

Zusätzlich konnte durch die Etablierung eines *in vitro* Modells in der Flusskammer sowohl für die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen und an eine Kollagen-beschichtete Oberfläche die Basis für weitere reziproke und nicht-reziproke Experimente geschaffen werden, die einen weiteren Zugewinn an Wissen ermöglichen.

Insgesamt wurden durch diese Arbeit zwei wichtige Proteine identifiziert, deren Einfluss gerade in Bezug auf die protektive Funktion von PON2 für kardiovaskuläre Erkrankungen neue Therapiestrategien ermöglicht.

8 Literaturverzeichnis

1. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact.* 2016;259(Pt B):51-62.
2. Ono R, Shiura H, Aburatani H, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal chromosome 6. *Genome Res.* 2003;13:1696-1705.
3. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1304-16.
4. Martinelli N, Consoli L, Girelli D, Grison E, Corrocher R, Olivieri O. Paraoxonases: Ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. *Advances in clinical chemistry.* 2013;59:65-100
5. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33(3):498-507.
6. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J.* 1953;53(1):117-124.
7. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 1953;53(1):110-117.
8. Draganov DI. Lactonases with organophosphatase activity: Structural and evolutionary perspectives. *Chemico-biological interactions.* 2010;187:370-372
9. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1239-47.
10. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys.* 2007;461(1):24-9.
11. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal n-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone. *Infection and immunity.* 2008;76:2512-2519

12. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(12):2052-2063.
13. Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Forstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24398-24403.
14. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation.* 2007;115(15):2055-2064.
15. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Forstermann U, Shabazian A, Grijalva V, Shih DM, Farias-Eisner R, Teiber JF, Reddy ST, Horke S. Pon3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 2012;19:1549-1560
16. Draganov DI. Human pon3, effects beyond the hdl: Clues from human pon3 transgenic mice. *Circulation research.* 2007;100:1104-1105
17. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. *J Lipids.* 2012;2012:342806.
18. Giordano G, Cole TB, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: A neuroprotective role? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;256(3):369-78.
19. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (pon1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33:498-507
20. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998;213(1-2):149-57.
21. Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Forstermann U, Teiber JF, Horke S. Paraoxonases-2 and -3 Are Important Defense Enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors due to Their Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Properties. *J Lipids.* 2012;2012:352857.

22. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44444-9.
23. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva V, Morvardi S, Clarke C, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(3):341-51.
24. Hagmann H, Kuczkowski A, Ruehl M, Lamkemeyer T, Brodesser S, Horke S, Dryer S, Schermer B, Benzing T, Brinkkoetter PT. Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *Faseb J.* 2014;28(4):1769-79.
25. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):29-63.
26. Witte I, Horke S. Assessment of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in endothelial cells. *Methods Enzymol.* 2011;489:127-46.
27. Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, Li H, Forstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: Pon2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis.* 2011;2:e112
28. Li H, Horke S, Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in pharmacological sciences.* 2013;34:313-319
29. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free radical biology & medicine.* 2013;61:473-501
30. Warburg O. Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigeelei. *Z Physiol Chem* 1908;57:1–16
31. Baldrige C, Gerard R. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1933;103:235–236
32. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol Cell Physiol* 1943;138:512–518.
33. Rossi F, Zatti M: Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 1964;20:21-23.
34. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86(5):494-501.

35. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285(2):R277-R297.
36. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004;122(4):339-52.
37. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.
38. Bedard K, Krause, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007;87:245–313
39. Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 1964;20:21–23
40. Banerjee, Ena R, Henderson WR. Defining the molecular role of gp91phox in the immune manifestation of acute allergic asthma using a preclinical murine model. *Clinical and molecular allergy* 2012;10
41. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005;65(1):16-27.
42. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):342-4.
43. van der Vliet A. NADPH oxidases in lung biology an pathology: Host defense enzymes, and more. *Free Radic Biol Med* 2007.
44. Sciaretta S, Yee D, Ammann P, Nagarjan N. Role of NADPH oxidase in the regulation of autophagy in cardiomyocytes. *Clinical Science* 2015 128(7):387-403
45. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007;49(4):717-27.
46. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006;71(2):216-25.
47. Tsutsui M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* 2004;11(2):41-8.
48. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:1620–1624.
49. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000;87:179–183

50. Quesada I M et al. Selective inactivation of NADPH oxidase 2 causes regression of vascularization and the size and stability of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* vol. 2015;242(2):469-75
51. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
52. McDonald RJ, Pan LC, St. George JA, Hyde DM, Ducore JM. Hydrogen peroxide induces DNA single strand breaks in respiratory epithelial cells: *Inflammation* 1993;17:715-22
53. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L. Biochemie, 6. Auflage, Springer-Spektrum Verlag 2007, Heidelberg
54. Kirkinezos I. G, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Developmental Biology.* 2001
55. Schmidt R.F. Physiologie des Menschen, Springer-Spektrum-Verlag 2007, Heidelberg
56. Friedovich I Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112
57. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG: Epidermal growth factor-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997;271:217-21
58. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359:938-949
59. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011;364:1746-1760
60. Gawaz MP. Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung ; 31 Tabellen. Thieme, Stuttgart 1999.
61. Mutschler E, Schaible H-G, Vaupel P, Thews G. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. völlig überarbeitete und erweiterte Aufl. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart 2007.
62. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor viia. *Blood reviews.* 2003;17
63. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *Journal of thrombosis and haemostasis* : 2007;5:661–669.
64. Hartwig J.H. The platelet: Form and function. *Semin Hematol.* 2006;43:94-100

65. White J.G, Clawson C.C. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol.* 1980;101:353-364
66. White JG. Disorders affecting megakaryocytes and platelets: Inherited conditions. Abgerufen von <https://clinicalgate.com/disorders-affecting-megakaryocytes-and-platelets-inherited-conditions/>
67. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie* 2015;35:60–72.
68. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten. *Der Internist* 2010; 51:1086, 1088-92, 1094.
69. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2005;31:381–392.
70. Jurk K, Kehrel BE. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2008; 133(1946):1130–1135.
71. Ramstrom S, O'Neill S, Dunne E, Kenny D. Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent. *Platelets* 2010;21:289–296
72. Kramer P. A, Ravi S, Chacko B, Johnson M.S, Darley-Usmar V.M. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox biology*, 2014;2:206–210.
73. Akkerman JW, Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca²⁺ secretion *Blood* 1981;57:956-966
74. Krötz F, Sohn H.J, Pohl U. Reactive Oxygen Species Players in the Platelet Game *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004;24:1988–1996
75. Begonja A.J, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswand B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates α IIb β 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway *Blood* 2005;106:2757-2760
76. Violi F, Pignatelli P. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment. *Thromb Haemost.* 2014;111(5):817-23.
77. Pastori D, Pignatelli P, Carnevale R, Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;120:50-5.
78. Dayal S, Wilson KM, Motto DG, Miller FJ, Jr., Chauhan AK, Lentz SR. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis. *Circulation.* 2013;127(12):1308-16.

79. Qiao J., Arthur J. F., Gardiner E. E., Andrews R. K., Zeng L., Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox biology*, 2017;14:126–130.
80. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 2009; 23: 225–229
81. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg*. 2012;114:275-285
82. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, Kassak P, Van Oerle R, Winckers K, Govers-Riemslog JW, Hamulyak K, Hackeng TM, Daemen MJ, ten Cate H, Spronk HM. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation*. 2010;122:821-830
83. Olie R.H, van der Meijden P, Ten Cate, H. The coagulation system in atherothrombosis: Implications for new therapeutic strategies. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2018;2(2):188–198.
84. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*. 2009;82:392-403
85. Pasma JJ, Posthuma JJ, Spronk HM. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J Thromb Haemost*. 2016;14:1908–16.
86. ten Cate H. Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis. *Thrombosis research*. 2012;129
87. Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Dohrmann M, Xia N, Li H, Spiecker L, Ruf W, Horke S. Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. *Blood*. 2018;131:2161-2172
88. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-b-containing lipoproteins: Anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem*. 2006; 281:29491-29500
89. Pollock JD; Williams DA; Gifford MA; Li LL; Du X; Fisherman J; Orkin SH; Doerschuk CM; Dinauer MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*. 1995; 9(2):202-209
90. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of pcr-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (hotshot). *BioTechniques*. 2000;29:52-54
91. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987;162:156–159

92. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*. 1997;245:154-160
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
94. Lottspeich F, Engels J.W. Bioanalytik; Spektrum-Springer Verlag, Heidelberg 2012
95. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227:680-685
96. Carl Zeiss AG. Das konfokale Prinzip. Abgerufen von <https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/confocal-microscopes/lsm-800-mat.html>
97. Lernhelfer. Das Elektronenmikroskop. Abgerufen von <https://www.lernhelfer.de/schuelerlexikon/biologie/artikel/elektronenmikroskop>
98. Oberländer J. PON2 abhängige Funktionen in murinen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen. Master-Thesis 2018
99. van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nature protocols*. 2008;3:1085-1091
100. Sobczak M, Dargatz J, Chrzanowska-Wodnicka M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *Journal of visualized experiments* 2010
101. Weimer S, Oertel K, Fuchsbauer H-L. A quenched fluorescent dipeptide for assaying dispa- and thermolysin-like proteases. *Analytical biochemistry* 2006;352:110–119.
102. Ristow M. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature Medicine*. 2014;20:709–711.
103. Shadel G.S., Horvath T.L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 2015;163:560–569.
104. Emmendorffer A., Hecht M., Lohmann-Matthes M.-L., Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of Immunological Methods* 1990;131:269 – 275
105. Kroegel C., Costabel U. Klinische Pneumologie; Thieme-Verlag, Stuttgart 2014
106. Laudano A.P., Doolittle R.F. Synthetic peptide derivatives that bind fibrinogen and prevent the polymerisation of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:3085-3089

107. Achyuthan K.E., Dobson J.V., Greenberg C.S. Gly-Pro-g-Pro modifies the glutamine residues in the CL- and γ -chains of fibrinogen: inhibition of transglutaminase cross-linking. *Biochim Biophys Acta* 1986;872:261-268
108. Frenette P. S., Denis C. V., Weiss L., Jurk K., Subbarao S., Kehrel, B., ... Wagner D. D. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 2000;191(8):1413–1422.
109. Subramaniam S., Jurk K., Hobohm L., Jäckel S., Saffarzadeh M., Schwierczek K., ... Ruf W. Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood*, 2017;129(16):2291–2302.
110. Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol* 1995;89:117-23
111. Da Prada M, Pletscher A. Accumulation of basic drugs in 5-hydroxytryptamine storage organelles of rabbit blood platelets *European J Pharmacol* 1975;32:179-85
112. Jäckel S, Kiouptsi K, Lillich M, Hendrikx T, Khandagale A, Kollar B, Hörmann N, Reiss C, Subramaniam S, Wilms E, Ebner K, Brühl MV, Rausch P, Baines JF, Haberichter S, Lämmle B, Binder CJ, Jurk K, Ruggeri ZM, Massberg S, Walter U, Ruf W, Reinhardt C.: Gut microbiota regulate hepatic von Willebrand factor synthesis and arterial thrombus formation via Toll-like receptor-2. *Blood*. 2017;130(4):542-553.
113. Lorez HP, Da Prada M, Rendu F, Pletscher A. Mepacrine, a tool for investigating the 5-hydroxytryptamine organelles of blood platelets by fluorescence microscopy *J Lab Clin Med* 1977;89(1):200-6
114. de Groot P.G., Sixma J.J. Platelet adhesion. *Br.J.Haematol*. 1990;75:308-312.
115. Fukuda K, Doggett T, Laurenzi I.J, Liddington R.C, Diacovo T.G. The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation *Nature Structural & Molecular Biology* 2005;12:152–159
116. Vermes I., et al. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995;184:39-51.
117. Shi J., Gilbert G.E. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid binding sites. *Blood* 2003;101:2628–2636
118. Dasgupta S. K., Abdel-Monem H., Niravath P., Le A., Bellera R. V., Langlois K., ... Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*, 2009;113(6):1332–1339.

119. Horn M, Bertling A, Brodde MF, Müller A, Roth J, Van Aken H, Jurk K, Heilmann C, Peters G, Kehrel BE. Human neutrophil alpha-defensins induce formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa. *J Thromb Haemost.* 2012;(4):647-61.
120. Gotru SK, Chen W, Kraft P, Becker IC, Wolf K, Stritt S, Zierler S, Hermanns HM, Rao D, Perraud AL, Schmitz C, Zahedi RP, Noy PJ, Tomlinson MG, Dandekar T, Matsushita M, Chubanov V, Gudermann T, Stoll G, Nieswandt B, Braun A. TRPM7 Kinase Controls Calcium Responses in Arterial Thrombosis and Stroke in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(2):344-352
121. Born, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194(4832):927-929
122. Harrison P., Mackie I., Mumford A., Briggs C., Liesner R., Winter M., Machin S., British H. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *British Journal of haematology* 2011;155(1):30-44.
123. Jackson S. P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007;109(12):5087-5095.
124. Steven S., Jurk K., Kopp M., Kröller-Schön S., Mikhed Y., Schwierczek K., ... Daiber A. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice. *British journal of pharmacology*, 2016;174(12):1620–1632.
125. Conant CG, Nevill JT, Zhou Z, Dong J-F, Schwartz MA, Ionescu-Zanetti C. Using well-plate microfluidic devices to conduct shear-based thrombosis assays. *Journal of laboratory automation* 2011;16:148–152.
126. BioFlux, Fluxion. Bringing physiological flow to live cell assays. 2009.
127. BioFlux, Fluxion. Viscosity- Understanding effects of viscosity in the BioFlux system 2009:2.
128. Spann AP, Campbell JE, Fitzgibbon SR, Rodriguez A, Cap AP, Blackburne LH, Shaqfeh ESG. The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. *Biophysical journal* 2016;111:577–588.
129. Reneman RS, Hoeks APG. Wall shear stress as measured in vivo: consequences for the design of the arterial system. *Medical & biological engineering & computing* 2008;46:499–507.
130. Fluxion. Platelet Adhesion and Aggregation: Assay protocol for physiological shear ranges 2009

131. Conant CG, Schwartz MA, Beecher JE, Rudoff RC, Ionescu-Zanetti C, Nevill JT. Well plate microfluidic system for investigation of dynamic platelet behavior under variable shear loads. *Biotechnology and bioengineering* 2011;108:2978–2987.
132. Ramstrom S, O'Neill S, Dunne E, Kenny D. Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent. *Platelets* 2010;21:289–296.
133. Macarak EJ, Howard PS. Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix proteins. *Journal of cellular physiology* 1983;116:76–86.
134. Heilshorn S. Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins. *Biomaterials* 2003;24:4245–4252.
135. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 1990;60(4):269-80.
136. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2011;9(4):779-89.
137. Wilms E. Einfluss des Darmmikrobioms auf arterielle Thrombusbildung und Zelladhäsion im Ischämie-Reperfusionmodell mesenterialer Venolen der Maus, Dissertation 2016
138. Ebert J. Die Rolle der Paraoxonase-2 in endothelialen Redox-Signalwegen und Entzündungsprozessen in der Blutgerinnung: Dissertation 2016.
139. Spiecker, L. Die Modulation der Hämatopoese durch das Enzym Paraoxonase-2. Dissertation 2018.
140. Kim K, Li J, Tseng A, Andrews RK, Cho J. NOX2 is critical for heterotypic neutrophil-platelet interactions during vascular inflammation. *Blood.* 2015;126(16):1952-64.
141. Khaspekova SG, Ziuriaev IT, Iakushkin VV, Naïmushin IA, Sirotkina OV, Zaitseva NO, Ruda MI, Mazurov AV. Mean platelet volume: interactions with platelet aggregation activity and glycoprotein IIb-IIIa and Ib expression levels. *Biomeditsinskaia khimiia* 2014;60:94–108.
142. Panova-Noeva M., Schulz A., Hermanns M. I., Grossmann V., Pefani E., Spronk H. M., Laubert-Reh D., Binder H., Beutel M., Pfeiffer N., Blankenberg S., Zeller T., Münzel T., Lackner K. J., Ten Cate H. & Wild P. S. Sex-Specific Differences in Genetic and Nongenetic Determinants of Mean Platelet Volume: Results from the Gutenberg Health Study. *Blood* 2016;127; 251-259

143. Delaney MK, Kim K, Estevez B, et al. Differential Roles of the NADPH-Oxidase 1 and 2 in Platelet Activation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(5):846-54.
144. Meitzler, Jennifer L et al. "NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology" *Antioxidants & redox signaling* 2014;20(17):2873-89.
145. Nauseef, W.M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases *Biochimica et biophysica acta* 2013;1840(2):757-67.
146. Wagner K., Perschil I., Fichter C. D., van der Laan M. Stepwise Assembly of Dimeric F₁F_o-ATP Synthase in Mitochondria Involves the Small F_o-Subunits k and i. *Molecular Biology of the Cell* 2010;21:1494-1504.
147. Horke S, Xiao J, Schutz EM, Kramer GL, Wilgenbus P, Witte I, Selbach M, Teiber JF. Novel paraoxonase 2-dependent mechanism mediating the biological effects of the pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule n-(3-oxo-dodecanoyl)-l-homoserine lactone. *Infection and immunity.* 2015;83:3369-3380
148. Marumo M, Suehiro A, Kakishita E, Groschner K, Wakabayashi I. Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca²⁺ entry. *Thrombosis research.* 2001;104:353-360
149. Del Principe D, Frega G, Savini I, Catani MV, Rossi A, Avigliano L. The plasma membrane redox system in human platelet functions and platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost.* 2009;101:284-289
150. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine.* 2002;8:1227-1234
151. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von willebrand factor. *Annual review of biochemistry.* 1998;67:395-424
152. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88:186-193
153. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 1991;266:7345-7352
154. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and p-selectin (gmp-140). *Blood.* 1992;80:143-152

155. Jurk K und Kehrel BE. Thrombozytensekretion. In Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Pötzsch, Bernd; Madlener, Katharina (Hrsg.) 2. Aufl., 2010; 67-72.
156. Walsh T G et al. The role of Nox1 and Nox2 in GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation *Redox biology*. 2013;12.023(2):178-86.
157. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 13576–83
158. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99:1293–304
159. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Advances in medicine* 2016;2016: 9152732.
160. Kattoor AJ1, Pothineni NVK1, Palagiri D1, Mehta JL2. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
161. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007;27:1368–1374
162. Levi M, ten Cate H, van der Poll T. Endothelium: Interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med*. 2002;30:220-224
163. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Stern DM, Schmidt AM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527–3561.
164. Greineder CF, Johnston IH, Villa CH, Gollomp K, Esmon CT, Cines DB, Poncz M, Muzykantov VR. ICAM-1-targeted thrombomodulin mitigates tissue factor-driven inflammatory thrombosis in a human endothelialized microfluidic model. *Blood advances* 2017;1:1452–1465.
165. Hayes V, Johnston I, Arepally GM, McKenzie SE, Cines DB, Rauova L, Poncz M. Endothelial antigen assembly leads to thrombotic complications in heparin-induced thrombocytopenia. *The Journal of clinical investigation* 2017;127:1090–1098.

166. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Mol Genet Metab.* 2006;89:368-373
167. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, Drummond GR Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009
168. Li H., Horke S., Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237:208–219
169. Chen S., Su Y., Wang J. ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell death & disease*, 2013;4(7):722.
170. Song Wu, Zongdong Li, Dmitri V. Gnatenko, Beibei Zhang, Lu Zhao, Lisa E. Malone, Nedialka Markova, Timothy J. Mantle, Natasha M. Nesbitt and Wadie F. Bahou: BLVRB redox mutation defines heme degradation in a metabolic pathway of enhanced thrombopoiesis in humans *Blood* 2016;128:699-709
171. Li J, Cai D, Yao X, Zhang Y, Chen L, Jing P, Wang L, Wang Y. Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through Attenuating Oxidative Stress and the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in a Mouse Model of d-Galactose-induced Aging. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(6).
172. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(221):221ra15.
173. Liu D, Liu A. Administration of vitamin E prevents thymocyte apoptosis in murine sarcoma S180 tumor bearing mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2012;58
174. Barthels, Monika et al.: Das Gerinnungskompodium, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart 2003
175. Tyurina YY, Serinkan FB, Tyurin VA, Kini V, Yalowich JC, Schroit AJ, Fadeel B, Kagan VE. Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation. *J Biol Chem.* 2004;279:6056-6064

176. Vatsyayan R, Kothari H, Pendurthi UR, Rao LV. 4-hydroxy-2-nonenal enhances tissue factor activity in human monocytic cells via p38 mitogen-activated protein kinase activation-dependent phosphatidylserine exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1601-1611
177. Davlouros P, Xanthopoulou I, Mparampoutis N, Giannopoulos G, Deftereos S, Alexopoulos D. Role of Calcium in Platelet Activation: Novel Insights and Pharmacological Implications. *Med Chem.* 2016;12(2):131-8.
178. Ejaife O, Agbani and Alastair W. Poole Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis *Blood* 2017 130:2171-2179
179. Heemskerk J. Regulation of Platelet Procoagulant Activity *Blood* 2015 126:SCI-33;
180. Roest M, Reininger A, Zwaginga JJ, King MR, Heemskerk JWM. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2011; 9:2322–2324.
181. Westein E, Witt S de, Lamers M, Cosemans JMEM, Heemskerk JWM. Monitoring in vitro thrombus formation with novel microfluidic devices. *Platelets* 2012; 23: 501–509
182. Kyungho Kim, Jing Li, Alan Tseng, Robert K. Andrews and Jaehyung Cho NOX2 is critical for heterotypic neutrophil-platelet interactions during vascular inflammation *Blood* 2015 126:1952-1964
183. Sonkar V.K, Kumar R, Jensen M, Wagner B.A, Sharathkumar A.A, Miller Jr F.J, Fasano M.B, Lentz S.R, Buettner G.R, Dayal S. Nox2 NADPH oxidase is dispensable for platelet activation or arterial thrombosis in mice *Blood Advances* 2019;3:1272-1284
184. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517–29.
185. Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1653–7.
186. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987;262:992–1000.
187. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1057-66.

188. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox biology*, 2015;6:260–271.
189. Cathcart M.K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:23–28
190. Horke S, Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Förstermann U, Xiao J, Kramer GL, Haines DC, Chowdhary PK, Haley RW, Teiber JF. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J.* 2010;426(1):73-83
191. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhöfer S, Krüger M, Li H, Förstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis. *Biochem J.* 2008;416(3):395-405
192. Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W., Wingler, K., Schmidt, H. H. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidants & redox signaling*, 2015;23(5):406–427.
193. Simanjuntak, Y., Liang, J. J., Chen, S. Y., Li, J. K., Lee, Y. L., Wu, H. C., & Lin, Y. L. Ebselen alleviates testicular pathology in mice with Zika virus infection and prevents its sexual transmission. *PLoS pathogens*, 2018;14(2): e1006854.
194. Greenhill, C Mechanism revealed for celastrol's effects on weight *Nature Reviews Endocrinology* volume 2018;14:626
195. Bassenge E, Schneider H.T, A. Daiber A. Oxidativer Stress und kardiovaskuläre Erkrankungen *Dtsch med Wochenschr* 2005;130(50):2904-2909
196. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin e supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:154-160
197. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Haukka JK, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, Heinonen OP. Effects of alpha tocopherol and beta carotene supplements on symptoms, progression, and prognosis of angina pectoris. *Heart.* 1998;79:454-458
198. Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of us male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine.* 2002;162:1472-1476

199. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1996;334:1156-1162
200. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin c intake and mortality among a sample of the united states population. *Epidemiology.* 1992;3:194-202
201. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin e consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med.* 1993;328:1444-1449
202. Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin e and vitamin c supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: The established populations for epidemiologic studies of the elderly. *The American journal of clinical nutrition.* 1996;64:190-196
203. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in cardiovascular therapy: Panacea or false hope? *Frontiers in cardiovascular medicine.* 2015;2:29
204. Asokan Devarajan, Feng Su, Victor Grijalva, Meghna Yalamanchi, Ashna Yalamanchi, Feng Gao, Hannah Trost, Josephine Nwokedi, Gina Farias-Eisner, Robin Farias-Eisner, Alan M. Fogelman & Srinivasa T Reddy Paraoxonase 2 overexpression inhibits tumor development in a mouse model of ovarian cancer *Cell Death & Disease* 2018;9(392)
205. Brandes RP, Schröder K. Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(5):513-8.
206. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;95:594-599
207. Ardissino D, Merlini PA, Bauer KA, Bramucci E, Ferrario M, Coppola R, Fetiveau R, Lucreziotti S, Rosenberg RD, Mannucci PM. Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques. *Blood.* 2001;98:2726-2729
208. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor x-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor viia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5255-5260

209. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor-factor viia-specific up-regulation of il-8 expression in mda-mb-231 cells is mediated by par-2 and results in increased cell migration. *Blood*. 2004;103:3029-3037
210. Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor viia complex. *Thromb Haemost*. 1997;78:1138-1141
211. Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*. 1999;163:5064-5069
212. Wang X, Gjernes E, Prydz H. Factor viia induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line. *J Biol Chem*. 2002;277:23620-23626
213. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in apoe-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2015;242:639-646
214. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, Kostakis A, Liapis CD. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein e-deficient mice : Dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovascular drugs and therapy. International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2012;26:367-374

9 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Spiecker L, Witte I, Ebert J, Petermann V, Schüler A, More P, Cabezas-Wallscheid N, Horke S, Pautz A, Daiber A, Kindler T, Kleinert H. Deficiency of anti-oxidative PON2 leads to changes in HSC functionality *J. of Cell Biology* in preparation

Vorträge:

Petermann V, Ebert J, Jurk K, Witte I, Horke S, Kleinert H. Differential roles of Paraoxonase-2 (PON2) and NADPH oxidase-2 (NOX2) in murine Platelets, International Society of Thrombotic and Haemostase (ISTH), Berlin, Deutschland, 8-13 Juli 2017.

Petermann V, Kleinert H, Jurk K. Paraoxonase-2 dependent redox control of platelet physiology, 13th International Meeting on Cholinesterases and 7th International Conference on Paraoxonases, Hradec Králové, Czech Republik, Spain, 9-14 September 2018.

Abstrakt:

Petermann V, Ebert J, Jurk K, Witte I, Horke S, Kleinert H. Differential roles of Paraoxonase-2 (PON2) and NADPH oxidase-2 (NOX2) in murine Platelets, International Society of Thrombotic and Haemostatse (ISTH), Berlin, Deutschland, 8-13 Juli 2017.

Petermann V, Jurk K, Kleinert H. Differential platelet phenotype and function of PON2- and NOX2-deficient mice, German Society of Thrombotic and Haemostase (GTH), Wien, Österreich, 20-23 Februar 2018

Petermann V, Kleinert H, Jurk K. Paraoxonase-2 dependent redox control of platelet physiology, 13th International Meeting on Cholinesterases and 7th International Conference on Paraoxonases, Hradec Králové, Czech Republik, Spain, 9-14 September 2018.

10 Danksagung

XXX

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Victoria Petermann
Geburtsdatum: 14.11.1986
Geburtsort: Wiesbaden-Dotzheim
Staatsangehörigkeit : Deutsch

Promotion

10/2015 – 06/2019 Promotion am Centrum für Thrombose und Hämostase und am Institut für Pharmakologie, Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege/ Prof. Dr. Hartmut Kleinert/ Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität (Fachbereich Chemie)

Hochschulstudium

10/2007-01/2015 Studium der Chemie (Bachelor und Master) an der Technischen Universität Darmstadt (Abschlussnote: 1,9)
07/2014-01/2015 Master-Thesis in der Arbeitsgruppe für physikalische Biochemie /Prof. Norbert A. Dencher / Technische Universität Darmstadt (Fachbereich Chemie); Thema: Analyse von Atmungskettenkomplexen und Membranen von Säugetiermitochondrien sowie der Lipidperoxidation

Schulbildung

07/1997-06/2007 Allgemeine Hochschulreife an der St. Ursula Schule Geisenheim (Note: 2,3)

Mitgliedschaften

01/2012 - heute Gesellschaft Deutscher Chemiker
01/2002 - heute Deutsche-Lebens-Rettungs-Gesellschaft

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	gut
Französisch	Grundkenntnisse

Auszeichnungen

07/2017	Young Investigator Award bei der ISTH 2017, Berlin
09/2016	Best Presentation Award am Science Day 2016, Mainz
02/2017-06/2019	TransMed Associate Fellow, Universitätsmedizin Mainz
03/2017-03/2018	Mentee der 10. Runde des Edith-Heischkel-Mentoring Programms

Softwarekompetenzen

GraphPadPrism
MS Office
ChemDraw
MestreNova

Hobbys und Interessen

Musicals
Schwimmen
Bogenschießen