

**Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
und Pharmakogenomik der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie, Experimentelle Therapie und
Toxikologie**

Die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in murinen Thrombozyten

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Spitzhüttl, Haito Konrad**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. Franziska Konrad

Tag der Disputation: 19.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 G-Protein-abhängige Signaltransduktion	1
1.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.2 G-Proteine	3
1.2 Thrombozyten.....	4
1.2.1 Entdeckung und Vorkommen.....	4
1.2.2 Funktion.....	5
1.2.3 Mediatoren von Thrombozyten	6
1.2.4 Thrombozyten und G-Proteine.....	7
1.2.5 Thrombozytenaktivierung über Stimulanzen	7
1.3 Aktivierungsmarker von Thrombozyten.....	9
1.3.1 Proteine der Zellmembran	9
1.3.2 α -Granula assoziierte Proteine	10
1.3.3 Mitochondriales Membranpotential	11
1.3.4 Phosphatidylserin-Freisetzung.....	11
1.3.5 Thrombozyten-Interaktion mit Leukozyten	12
2 Ziel dieser Arbeit.....	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Chemikalien.....	14
3.1.2 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien	15
3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien	17
3.1.4 Antikörper	18

3.1.5 Oligonukleotide.....	19
3.1.6 Laborgeräte und Software	20
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Mausezucht.....	21
3.2.2 Genotypisierung von Mäusen	22
3.2.3 Stimulanzien-Vorbereitung.....	25
3.2.4 PRP-Aufbereitung.....	25
3.2.5 Anpassung der Fluoreszenzspannung und Kompensations-kontrolle im Durchflusszytometer	25
3.2.6 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, Integrin α 5 und Integrin β 3 auf ruhenden Thrombozyten.....	26
3.2.7 Bestimmung der Degranulation von α -Granula mittels Oberflächenexpression von CD62P.....	27
3.2.8 Bestimmung der Aktivierung von α IIb β 3 mittels Bindung von JON/A an die Oberfläche von Thrombozyten.....	28
3.2.9 Bestimmung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie	29
3.2.10 Messung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi$ m) mittels TMRE-Fluoreszenzantwort.....	30
3.2.11 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten.....	31
3.2.12 Auswertung und Statistik	32
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, Integrin α 5 und Integrin β 3 auf ruhenden Thrombozyten.....	33
4.2 Degranulation von α -Granula in <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten, gekennzeichnet durch die Oberflächenexpression von CD62P	35

4.3 Bestimmung der Aktivierung von α IIb β 3 auf <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten, gekennzeichnet durch die Bindung von JON/A	38
4.4 Aktivierung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi_m$) von <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten	42
4.5 Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten	44
4.6 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten.....	47
5 Diskussion	50
5.1 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, α 5, β 3 auf ruhenden Thrombozyten.....	50
5.2 Bestimmung der Aktivierung von α IIb β 3, gekennzeichnet durch die Bindung von JON/A.....	51
5.3 Die Degranulation von α -Granula, gekennzeichnet durch die Oberflächenexpression von CD62P.....	55
5.4 Aktivierung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi_m$) der <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten.....	56
5.5 Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von <i>Gnai</i> -defizienten Thrombozyten	58
5.6 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten.....	59
5.7 Ausblick	61
6 Zusammenfassung	62
7 Quellen	63
8 Erklärung zum Eigenanteil.....	68
Danksagung	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Gai-Isoformen, Effektoren, korrelierenden Gene und Expressionsmuster.....	4
Tabelle 2: Chemikalien.....	14
Tabelle 3: Reagenzien.....	15
Tabelle 4: Kits.....	15
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien.....	17
Tabelle 7: Antikörper	18
Tabelle 8: Oligonukleotide für PCR.....	19
Tabelle 9: Laborgeräte	20
Tabelle 10: Software.....	20
Tabelle 11: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des genomischen Vorhandenseins des Pf4-Cre-Rekombinase-Transgens	22
Table 12: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion von globalem <i>Gnai3</i> -KO und WT	23
Tabelle 13: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen bei <i>Gnai2fl/fl</i>	23
Tabelle 14: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen bei <i>Gnai3fl/fl</i>	23
Tabelle 15: Thermocycler-Programm zur Detektion von Wildtyp- und globalen <i>Gnai3</i> -defizienten Mäusen sowie zur Detektion des genomischen Vorhandenseins des Pf4-Cre-Rekombinase-Transgens.....	24
Tabelle 16: Thermocycler-Programm zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen von <i>Gnai2fl/fl</i> und <i>Gnai3fl/fl</i>	24
Tabelle 17: Pipettierschema Oberflächenmarker.....	26

Tabelle 18: Pipettierschema CD62-Expression	27
Tabelle 19: Pipettierschema α IIb β 3-Vollblut.....	28
Tabelle 20: Pipettierschema α IIb β 3-PRP.....	29
Tabelle 21: Pipettierschema AnnexinV.....	30
Tabelle 22: Pipettierschema Membranpotential.....	31
Tabelle 23: Pipettierschema PNCs.....	32

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prinzip des Aktivierungs-/ Inaktivierungszyklus von G-Proteinen durch GPCR	2
Abb. 2: Expression verschiedener Oberflächenproteine in Ruhe	34
Abb. 3: Expression von CD62P nach Stimulation bzw. ohne Stimulation	36
Abb. 4: Bindung von JON/A nach bzw. ohne Stimulation in Vollblut.....	38
Abb. 5: Bindung von JON/A nach bzw. ohne Stimulation in PRP.....	40
Abb. 6: Depolarisierung der mitochondrialen Membran von Thrombozyten in PRP	42
Abb. 7: Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von Thrombozyten in PRP.....	45
Abb. 8: Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten	48

Abkürzungen

AC - Adenylatzyklase

ACD - Acid-Citrate-Dextrose

COX-1 - Cyclooxygenase-1

CRP – Collagen-related peptide

$\Delta\Psi_m$ - Mitochondriales Membranpotential

FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting

FCCP - Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon

GAP - GTPase-aktivierendes Protein

GEF- Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor

GP - Glykoprotein

GPCR - G-Protein-gekoppelter Rezeptor

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (Puffer)

KO - Knockout

PAR - Protease-aktivierter Rezeptor

PBS - Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline)

PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Pf4 Cre - Platelet Factor 4 Cre Recombinase

PFA - Paraformaldehyd

PRP - Platelet-Rich Plasma (Thrombozytenreiches Plasma)

PS - Phosphatidylserin

RGS-Proteine - Regulatoren der G-Protein-Signale

TMRE - Tetramethylrhodaminethylester

TxA2 - Thromboxan A2

U46619 - Thromboxan A2-Mimetikum

vWF - Von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 G-Protein-abhängige Signaltransduktion

Rezeptoren dienen als molekulare Strukturen, an die spezifische Signalmoleküle oder Mikroorganismen an Zellen binden können. Diese Rezeptormoleküle bestehen in der Regel aus spezialisierten Proteinen oder Proteinkomplexen, die eine passende Bindungsstelle für Liganden, wie kleine Moleküle oder Teile größerer Moleküle, aufweisen. Wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet, löst dies ein Signal aus, das über spezielle Mechanismen zur Signalweiterleitung und letztendlich zu zellulären Reaktionen führt, was als Signaltransduktion bezeichnet wird (Wootten et al. 2018; Uings and Farrow 2000).

Es gibt verschiedene Arten von Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren beeinflussen bei Aktivierung als Ionenkanäle das Membranpotential. Des Weiteren gibt es Rezeptortyrosinkinasen. Diese Transmembranproteine besitzen im zytosolischen Teil eine Tyrosinkinaseaktivität, die essentiell für die Signalweiterleitung in die Zelle ist. Zuletzt gibt es noch metabotrope Rezeptoren, die nach ihrer Aktivierung das Signal über sog. Second Messenger oder andere Intrazellulärtransmitter weiterleiten. Zu dieser Rezeptorfamilie gehören die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Uings and Farrow 2000; Hesch 1991).

1.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die klassische G-Protein-gekoppelte Signalweiterleitung erfolgt im Wesentlichen über drei Komponenten: (1) Den so genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR), (2) das heterotrimere G-Protein, das den Rezeptor mit (3) den zellulären Effektoren, wie Enzymen (z.B. Phospholipasen, Adenylylzyklen), Transportern (z.B. vesikuläre Transporter) oder Ionenkanälen (z.B. Kaliumkanäle) verbindet (Nürnberg et al. 2024). Durch die Bindung eines Agonisten wird der GPCR stimuliert. Agonisten umfassen ein breites Spektrum von Verbindungen wie Amine, Peptide, Proteine und auch verschiedene Zucker (Gudermann, Nürnberg, and Schultz 1995), die im Körper Funktionen wie z.B. Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren oder Hormone einnehmen (Nürnberg et al. 2024). Der

stimulierte GPCR wirkt nun auf das G-Protein (Abbildung 1). Das G-Protein besteht aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die β - und γ -Untereinheit sind fest miteinander verknüpft und bilden eine funktionelle Einheit (Offermanns 2003). Der GPCR wirkt auf das G-Protein als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) und katalysiert im G-Protein in der $G\alpha$ -Untereinheit den Austausch von GDP gegen GTP (Syrovatkina et al. 2016). Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit trennt sich von der $G\alpha$ -Untereinheit, und beide Komponenten beeinflussen anschließend getrennt die nachfolgenden Signalwege (Lambert 2008). Die Hydrolyse und Abspaltung eines Phosphats im GTP wird durch die eigene GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit induziert und der aktive Zustand des G-Proteins beendet. Dieser Prozess wird zusätzlich von Effektoren und Regulatoren reguliert (Nürnberg et al. 2024).

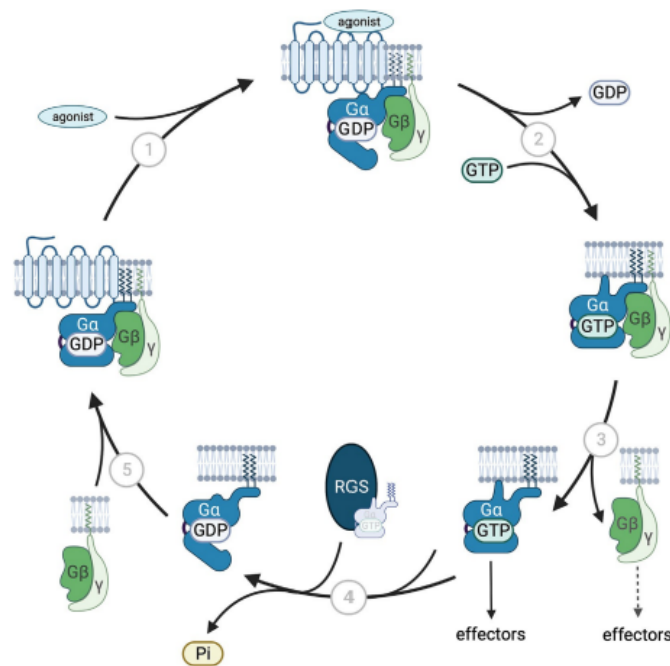


Abb. 1: Prinzip des Aktivierungs-/ Inaktivierungszyklus von G-Proteinen durch GPCR. Im kanonischen Signalweg werden G-Proteine durch die Bindung eines Agonisten an den GPCR aktiviert (Schritt 1). Dies katalysiert den Austausch von GDP gegen GTP in der $G\alpha$ -Untereinheit (Schritt 2), wodurch $G\alpha$ eine molekulare Umstrukturierung erfährt. GTP stabilisiert die $G\alpha$ -Untereinheit in einer aktiven Konformation. Dies führt zur Dissoziation von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ am inneren Bereich der Plasmamembran und zur Regulierung von Effektoren durch $G\alpha$ und/oder $G\beta\gamma$ (Schritt 3). Dies führt jedoch nicht unbedingt zu einer räumlichen Trennung des heterotrimeren G-Proteins. Die intrinsische GTPase-Funktion von $G\alpha$ bewirkt die Abspaltung des γ -Phosphats im GTP (Schritt 4). Diese GTPase-Aktivität ist jedoch im Allgemeinen zu langsam, um ein physiologisches Timing der Inaktivierung zu erreichen, auch wenn es innerhalb der verschiedenen Mitglieder der G-Protein-Familie Unterschiede in der Geschwindigkeit der Enzymaktivität gibt. Stattdessen wird eine angemessene zeitliche Kontrolle der $G\alpha$ -Inaktivierung durch Regulatoren der G-Protein-Signalübertragung (RGS-Proteine) gewährleistet. RGS-Proteine besitzen eine GAP-Aktivität (GTPase-aktivierendes Protein), die die intrinsische Inaktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit beschleunigt (Schritt 4). Infolge der GTP-Hydrolyse nimmt $G\alpha$ wieder seinen inaktiven Zustand an und kann sich wieder mit $G\beta\gamma$ assoziieren (Schritt 5). Dies ermöglicht einen erneuten Aktivierungszyklus, der durch den GPCR eingeleitet wird. Abbildung und Legende aus (Nürnberg et al. 2024).

Beim Menschen kommen mehr als 800 verschiedene agonistische G-Proteingekoppelte Rezeptoren vor. Diese bestehen aus sieben transmembranen (TM) helikalen Domänen, die durch je drei abwechselnde intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Syrovatkina et al. 2016). Mit etwa 450 ist der Großteil dieser als Sinnesrezeptoren für die Wahrnehmung von Geruch, Geschmack oder Licht zuständig. 350 weitere nehmen eine wichtige Rolle in der Kommunikation des menschlichen Körpers ein (Nürnberg et al. 2024). Außerdem können GPCRs verschiedene Arten von G-Proteinen aktivieren, was dazu beiträgt, eine Vielzahl von verschiedenen nachgeschalteten Signalwegen einzuleiten (Offermanns 2003).

1.1.2 G-Proteine

Bei den G-Proteinen gibt es ebenfalls eine große Variabilität der Untereinheiten. Es sind mindestens 20 $G\alpha$ -, 7 $G\beta$ - und 12 $G\gamma$ -Isoformen bekannt (Simon, Strathmann, and Gautam 1991; Tennakoon et al. 2021). Die Isoformen von $G\alpha$ sind in vier Familien unterteilt $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$. Allgemein tendieren Rezeptoren, die zur selben Familie von G-Proteinen gehören ähnliche zelluläre Effekte hervorzurufen (Offermanns 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten $G\alpha_i$ -Proteine sind jeweils von einem eigenen Gen codiert und werden in drei Isoformen unterteilt ($G\alpha_{i1-3}$) (Tabelle 1). Obwohl sich die Isoformen in ihrer Gensequenzidentität sehr ähneln (88%-94%) steuern sie sehr spezifisch verschiedene Signalwege. Zudem ist ihr Expressionslevel in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich (Nürnberg et al. 2024).

In der weiteren Effektor-Wirkung gibt es verschiedene gut definierte Signalwirkungen. Sowohl die $G\alpha_s$ - als auch die $G\alpha_i$ -Familien von G-Proteinen können die Aktivität von Adenylatcyclasen regulieren. $G\alpha_s$ aktiviert die Adenylatcyclase, um ATP in cyclisches AMP (cAMP) umzuwandeln. Ein erhöhter cAMP-Spiegel führt zur Aktivierung verschiedenster cAMP-regulierter Proteine. Auf der anderen Seite können $G\alpha_i$ -Proteine bestimmte Isoformen von Adenylatcyclasen hemmen, was zu einer Verringerung der intrazellulären cAMP-Spiegel führt (Syrovatkina et al. 2016).

Tabelle 1: Übersicht der $G\alpha_i$ -Isoformen, Effektoren, korrelierenden Gene und Expressionsmuster (Nürnberg et al. 2024; Offermanns 2003)

Familie	Isoform	Hauptsächliche Effektoren	Expressionslevel	Gen
G _i	G α_{i1}	AC↓(z.B. I,V,VI), GIRK↑, PLC β ↑	weit verbreitet	<i>Gnai1</i>
	G α_{i2}	AC↓(z.B. I,V,VI), GIRK↑, PLC β ↑, PI3K↑	ubiquitär	<i>Gnai2</i>
	G α_{i3}	AC↓(z.B. I,V,VI), GIRK↑, PLC β ↑, PI3K↑	weit verbreitet	<i>Gnai3</i>

AC - Adenylylcyclasen, GIRK - Kir3-Kaliumkanäle, PLC- Phospholipase C β , PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Entdeckung und Vorkommen

Blutplättchen oder Thrombozyten sind kleine, 1-4 μm große, kernlose Zellen. Ihre Anzahl beträgt 150.000-300.000 Zellen pro μl Blut (Gawaz 1999; Yeung, Li, and Holinstat 2018). Blutplättchen als eigenständige Blutbestandteile wurden erstmals im Jahr 1881 durch Bizzozero beschrieben (Gutmann, Joshi, and Mayr 2020). Bizzozero vermutete schon damals eine wichtige Funktion bei der Hämostase. Im Jahr 1906 führten histologische Studien sowie klinische Beobachtungen von Wright zur Erkenntnis, dass Blutplättchen aus Megakaryozyten, ihren Vorläuferzellen freigesetzt werden (Gutmann, Joshi, and Mayr 2020). Mittlerweile ist bekannt, dass sie ebenfalls in der Lunge, jedoch in viel geringeren Mengen produziert werden. Nach einer Lebenszeit von 5-10 Tagen (bei Mäusen kürzer) werden sie von der Milz und Leber abgebaut (Van Der Meijden and Heemskerk 2019; Yeung, Li, and Holinstat 2018).

1.2.2 Funktion

Thrombozyten fungieren in erster Linie als Hämostase- und Thrombose-regulatoren. In den Blutgefäßen befinden sich die Blutplättchen in einer komplexen, strömenden Umgebung. In dieser bewirken sowohl rheologische als auch hämodynamische Effekte eine unmittelbare Nähe der Blutplättchen zur Gefäßwand. Signale, die von gesunden, unbeschädigten Blutgefäßen erzeugt werden, sorgen dafür, dass sich die Blutplättchen in einem ruhenden Zustand befinden und so zirkulieren. Ohne diese Inhibition käme es zu einer Selbstaktivierung der Thrombozyten (Bye, Unsworth, and Gibbins 2016). Bei einer Verletzung werden die Thrombozyten aktiviert, was zur Adhäsion dieser an das Endothel und der Ausbildung eines Thrombus führt. Diese Reaktion erfolgt in mehreren Phasen, beginnend mit der Adhäsion an die subendotheliale extrazelluläre Matrix durch die anfängliche Interaktion der Matrix mit spezifischen Rezeptoren auf den Thrombozyten. In einem ersten Schritt bindet der GP1b/IX-Komplex an den Von-Willebrand-Faktor (vWF) und darauffolgend binden die GPIIb/IIIa- und α IIb β 3-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche an die Kollagenkomponente der extrazellulären Matrix. Diese erste Aktivierung führt zu einer Bindung an die Gefäßwand mit fester Adhäsion und zu einer Signaltransduktion innerhalb der Thrombozyten, sowie einer Formänderung durch Abflachung der ursprünglich runden/diskoiden Thrombozyten. Die aktivierten Thrombozyten im Thrombus fangen an, vermittelt durch den Integrin- α IIb β 3-Rezeptor weitere Thrombozyten aus dem Blutkreislauf aufzunehmen. Zusätzlich wird durch die Bildung sekundärer Signale über die Oxygenasen COX-1 und 12-LOX sowie durch Granula-Sekretion verschiedenster Moleküle eine positive Rückkopplung angeregt und dadurch weitere Plättchen aktiviert (Gawaz 1999; Holinstat 2017; Alan D Michelson 2019; Stegner, Klaus, and Nieswandt 2019).

1.2.3 Mediatoren von Thrombozyten

Thrombozyten enthalten drei Arten von Granula. Man geht davon aus, dass in jedem Plättchen etwa 4-6 dichte Granula enthalten sind. Die dichten Granula enthalten mehr als 200 kleine Moleküle, darunter Kalzium, ATP, ADP, 5-HT und Epinephrin. Nach den ersten Schritten der Thrombozytenaktivierung verschmelzen die dichten Granula mit der Plasmamembran des Thrombozyten und geben ihren Inhalt an den Extrazellulärraum ab. Die zweite Art von Granula sind die Alpha-Granula. Jeder Thrombozyt enthält zwischen 60 und 80 Alpha-Granula, die eine Reihe größerer Proteine (Integrine, P-Selectin, vWF, Fibrinogen, etc.) enthalten, die bei der Sekretion entweder an die Oberfläche des Blutplättchens oder in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Zuletzt gibt es noch die lysosomalen Granula, die mit den in ihr enthaltenden hydrolytischen Enzymen und Phosphatasen eine wichtige Rolle beim Proteinabbau spielen. Während viele der Granula-Bestandteile eine wichtige Rolle bei der positiven Rückkopplung im Thrombozytenaktivierungsprozess und bei der Rekrutierung neuer Thrombozyten in einen wachsenden Thrombus spielen, wirken andere Bestandteile als Signalsender an die umgebenden Blutzellen und das Endothel (Gawaz 1999; Holinstat 2017; Gogstad et al. 1982; Fritz, Radmacher, and Gaub 1994). Zum Beispiel verstärkt die Freisetzung von sekundären Mediatoren wie ADP und Thromboxan A₂ (TxA₂) die Reaktion der Thrombozyten. Auch die Exposition von Phosphatidylserin an der Oberfläche stark aktivierter Thrombozyten ermöglicht die Bildung des Prothrombinase-komplexes und die Katalysation von Prothrombin zu Thrombin (Bye, Unsworth, and Gibbins 2016). Die Fähigkeit des aktivierten Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Fibrinogen zu binden, ist das Schlüsselereignis, damit Thrombozyten aneinander haften und Aggregate bilden (Bye, Unsworth, and Gibbins 2016).

Dieser erste Schritt der Blutgerinnung ist als die primäre Hämostase definiert und ist für die Blutgerinnung unerlässlich. Kommt es zu einer Dysbalance in diesem System kann es zur Ausbildung arterieller Thrombosen kommen. Abgesehen von ihrer Rolle bei der Regulierung der Blutgerinnung im Gefäß spielen Thrombozyten nachweislich auch eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität, sowie bei der Regulation des Tumorwachstums und ihrer Ausbreitung

im Gefäßsystem, aber auch beim Ischämie-Reperfusionsschaden (Holinstat 2017).

1.2.4 Thrombozyten und G-Proteine

Die Oberfläche der Thrombozytenmembran wird durch eine Vielzahl von mobilen Transmembranrezeptoren bedeckt. Dies sind zum Beispiel Integrine ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, etc.), Proteine aus der Immunglobulin-Superfamilie (GPIb, GPVI, etc.) und auch G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren (P2Y1, P2Y12, PAR, TP, etc.). G-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in den Signalwegen für die Thrombozytenaktivierung. Agonisten wie z.B. Thrombin, sowie die Rückkopplungsmediatoren ADP und TxA2 beeinflussen über ihre jeweiligen Rezeptoren verschiedene G-Proteine (Broos et al. 2011; Gawaz 1999; Rivera et al. 2009; Stegner and Nieswandt 2011). Thrombozyten exprimieren $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$. Während $G\alpha_s$ die Prostazyklin-abhängige Thrombozytenhemmung vermittelt, indem es die Adenylatcyclase stimuliert, aktiviert $G\alpha_q$ die Phospholipase C, was zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium und zur Aktivierung von Proteinkinase C führt. $G\alpha_{12/13}$ könnten an Ereignissen beteiligt sein, die zu einer Veränderung der Thrombozytenform führen. $G\alpha_z$ ist in der Lage, die Adenylatcyclase zu hemmen. $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ unterdrücken ebenfalls die Bildung von cAMP, während die freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Phospholipase C β oder andere Signalmoleküle aktivieren können (Brass et al. 1997; Jantzen et al. 2001; Offermanns 2000).

1.2.5 Thrombozytenaktivierung über Stimulanzen

In Thrombozyten kann über verschiedenste Stimulanzen eine Vielzahl von Signalwegen ausgelöst werden. Während viele Substanzen extra-thrombozytär entstammen, werden andere Stimulanzen von den Thrombozyten selbst nach initialer Aktivierung sezerniert und so eine positive Rückkopplung bewirkt (Gawaz 1999; Van Der Meijden and Heemskerk 2019; Yeung, Li, and Holinstat 2018; Alan D Michelson 2019).

Im Nachfolgenden sollen die in dieser Arbeit zur Stimulation genutzten Substanzen wie ADP, CRP, Thrombin und das Thromboxananalog, U46619 sowie ihre Rezeptoren und Auswirkungen näher erläutert werden.

ADP und Thromboxan A₂ (TxA₂) führen zur Aktivierung sogenannter Purinozeptoren. ADP aktiviert die ADP-Rezeptoren P2Y₁₂ und P2Y₁, TxA₂ den TxA₂-Rezeptor (TP). P2Y₁₂ hemmt durch die G-Protein-Untereinheit G_{α_{i2}} die Adenylatcyclase, stimuliert jedoch die Phosphoinositid-3-Kinasen. P2Y₁ und TP signalisieren über G_{α_q}-Proteine. Dies bewirkt die Stimulation der Phospholipase C_β, was zu einer Freisetzung von Calcium ins Zytoplasma, zur Aktivierung der Proteinkinase C und zu weiteren nachgeschalteten Ereignissen führt. Thromboxan-Rezeptoren stimulieren zusätzlich G_{α_{12/13}}-Proteine, was zur Aktivierung der Rho-assoziierten Proteinkinase führt, die bei der Veränderung der Thrombozytenform beteiligt ist. Thrombin ist ein starker Thrombozytenagonist und aktiviert die G_{α_q}- und G_{α_{12/13}}-gekoppelten Rezeptoren PAR1 und PAR4 (PAR3 und PAR4 bei Mäusen). Dies bewirkt wieder die Stimulation der Phospholipase C_β über G_{α_q} und damit die Freisetzung von Calcium ins Zytoplasma, sowie über G_{α_{12/13}} die Aktivierung der Rho-assoziierten Proteinkinase. All die beschriebenen Signalwege führen letztendlich zur Integrin αIIbβ₃-Aktivierung, Granula Sekretion und Formänderung, was einer Aktivierung entspricht.

Die Aktivierung der Plättchen über Kollagen bzw. CRP wird durch den Adhäsionsrezeptor Integrin α₂β₁ und GPVI eingeleitet. Die Signalübertragung von α₂β₁ umfasst mehrere Regulatoren der kleinen G-Proteine, Kinasen der Src-Familie und Serin/Threonin-Proteinkinasen. GPVI induziert seinen Signalweg über Tyrosinkinasen (Kinasen der Src-Familie und Syk-Kinasen) was zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen und Phospholipase C_γ und zur Ca²⁺ Freisetzung in das Zytoplasma führt (Alan D Michelson 2019; Van Der Meijden and Heemskerk 2019; Yeung, Li, and Holinstat 2018).

1.3 Aktivierungsmarker von Thrombozyten

1.3.1 Proteine der Zellmembran

Auf Thrombozyten wird der GPIb/IX/V Komplex (CD42) permanent auf der Zellmembran exprimiert (über 25.000 Kopien/Thrombozyt). Durch die Bindung seiner primären Liganden vWF und Thrombin bewirkt dieser eine Aktivierung der Thrombozyten. Er besteht neben GPV und GPIX aus noch zwei weiteren transmembranen GPs (GPIb α , GPIb β). GPIb α , GPIb β , GPIX und GPV treten in einem Verhältnis von 2:2:2:1 auf (Rivera et al. 2000; Rivera et al. 2009). Diese GPs gehören alle zur Leucin-reichen Protein-Familie und entstehen durch die Expression unterschiedlicher Genprodukte. Der Thrombozytenrezeptor GPIX hat eine einzelne Leucin-reiche extrazelluläre Domäne, der intrazelluläre Teil ist jedoch viel kürzer (etwa 5 Reste). Es gibt viele Hinweise aus Studien mit transfizierten Zellen, dass sowohl GPIX als auch GPIb α , zusammen mit GPIb β , notwendig sind, um den funktionalen Komplex auf der Oberfläche der Thrombozyten stabil zu exprimieren. GPV besteht aus fünfzehn extrazellulären Leucin-reichen Wiederholungen und hat einen zytoplasmatischen Schwanz von 16 Aminosäureresten. GPV ist einzigartig in diesem Komplex, da er eine spezielle, durch Thrombin empfindliche Stelle besitzt, die sich direkt unterhalb der Leucin-reichen globulären Domäne befindet. Es ist nicht klar, ob GPV für die Expression und Funktion des Thrombozyten-komplexrezeptors notwendig ist, obwohl er einen nicht-kovalenten Komplex im Verhältnis 1:2 mit GPIb α /IX bildet (Rivera et al. 2000; Rivera et al. 2009).

Das Thrombozytenmembranprotein GPVI fungiert als physiologischer Kollagenrezeptor. Der extrazelluläre Bereich von GPVI enthält zwei Immunoglobulin-ähnliche Domänen und eine Mucin-ähnliche Serin/Threonin-reiche Region, dies lässt GPVI der gepaarten Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptorfamilie zuordnen. GPVI spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen. Es bildet auf der Oberfläche der Thrombozyten einen Komplex mit der Fc-Rezeptor (FcR) γ -Kette. Höchstwahrscheinlich besteht dieser aus zwei GPVI-Molekülen und einem Dimer der FcR γ -Kette. Diese dimerische Struktur

von GPVI ist erforderlich, um eine starke Bindung an Kollagen zu ermöglichen (Moroi and Jung 2004).

Des Weiteren exprimieren Thrombozyten auf ihrer Oberfläche fünf verschiedene Integrine, die Signale über die Zellmembran ins Zellinnere übertragen. Diese sind $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$, deren Hauptliganden Kollagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Fibrinogen sind (Janus-Bell et al. 2022). Integrin $\alpha IIb\beta 3$, ist das vorherrschende Integrin auf der Oberfläche von Thrombozyten und interagiert hauptsächlich mit Kollagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Fibrinogen. Es ermöglicht die Aggregation von Thrombozyten durch die Bindung an Fibrinogen und die damit einhergehende Vernetzung untereinander. Integrin $\alpha 5\beta 1$ fungiert als Rezeptor für Fibronectin. Es wurde festgestellt, dass in Thrombozyten $\alpha 5\beta 1$ zusammen mit $\alpha IIb\beta 3$ eine wesentliche Rolle bei der Bindung an Fibronectin unter Bedingungen mit Scherströmung spielt. Integrin $\alpha v\beta 3$ interagiert mit mehreren Liganden, wie zum Beispiel Vitronectin oder Fibronectin (Benito-Jardón et al. 2017; Hermann et al. 1999; Janus-Bell et al. 2022).

1.3.2 α -Granula assoziierte Proteine

Integrin $\alpha IIb\beta 3$ ist besonders in Blutplättchen und ihren Vorläuferzellen exprimiert (Bennett 2005). Dort spielt es wie oben erwähnt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Funktionen der Blutplättchen, wie der Blutgerinnung. In Ruhe befindet sich das Integrin $\alpha IIb\beta 3$ in einer inaktiven Form. Wenn es jedoch durch bestimmte Signale aktiviert wird, ändert es seine Struktur, sodass sein Ligand, Fibrinogen besser binden kann. Diese Bindung führt zur Bildung von Integrin-Gruppen und löst eine Signalkaskade innerhalb der Zelle aus (outside-in signalling), welche wiederum wichtige Funktionen, wie Formänderung, Aggregation, Kontraktion des primären Blutgerinnsels und Festigung des Thrombus, initiiert. Die Regulation dieser Signale erfordert die Zusammenarbeit vieler verschiedener Proteine, die mit Integrin $\alpha IIb\beta 3$ im Inneren der Zelle interagieren (Huang et al. 2019). Alle hier verwendeten Stimulatoren für Thrombozyten (ADP, TxA₂, Kollagen und Thrombin) führen zur Aktivierung von Integrin $\alpha IIb\beta 3$ (Zou et al. 2022), welches mittels des spezifischen Antikörpers

Anti-JON/A nachgewiesen werden kann. Bei Aktivierung unter anderem auch durch diese Stimulatoren kommt es zur Verschmelzung von α -Granula mit der Zellmembran. Die α -Granula enthalten unter anderem auch weitere Integrin α IIb β 3-Rezeptoren. Über die Zunahme an zusätzlich exponiertem aktivem Integrin α IIb β 3 kann man Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten ziehen (Harrison and Cramer 1993).

P-Selektin ist ein Zelladhäsionsmolekül von Blutplättchen und Endothelzellen, das in sekretorischen Granula gespeichert wird. Bei Thrombozyten wird es in α -Granula gespeichert. Nach Aktivierung wird P-Selektin auf der Plasmamembran exprimiert. Nach der Expression auf der Zelloberfläche vermittelt es sowohl bei Endothelzellen als auch bei Thrombozyten die Adhäsion von Leukozyten an diesen (André 2004; Berger, Hartwell, and Wagner 1998).

1.3.3 Mitochondriales Membranpotential

Adenosintriphosphat (ATP) ist die wichtigste Energiequelle für den Stoffwechsel. Die Mitochondrien liefern den Großteil dieses ATP durch einen Prozess, der als oxidative Phosphorylierung bekannt ist. Dieser Prozess beinhaltet den aktiven Transfer von positiv geladenen Protonen durch die innere Mitochondrienmembran, was zu einer internen negativen Nettoladung führt. Diese wird als mitochondriales Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$) bezeichnet. Der Protonengradient wird dann von der ATP-Synthase genutzt, um ATP durch Fusion von Adenosindiphosphat und freiem Phosphat zu erzeugen. Die negative Nettoladung eines gesunden Mitochondriums liegt bei etwa -180 mV, was durch Anfärben der Zellen mit positiv geladenen Farbstoffen, wie TMRE, nachgewiesen werden kann (Crowley, Christensen, and Waterhouse 2016).

1.3.4 Phosphatidylserin-Freisetzung

Phosphatidylserin (PS) ist ein Phospholipid mit negativer Ladung, das sich nach dem Flüssig-Mosaik-Modell normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Es spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Zellfunktionen. Die verstärkte Freisetzung von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran der Thrombozyten ist ein wichtiger Teil der normalen Gerinnungsreaktion von Blutplättchen. Die Präsenz von Phosphatidylserin bietet eine negativ geladene

Oberfläche, die essenziell für die Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren ist. Außerdem führt, falls diese Asymmetrie der Lipiddoppelschicht verloren geht, dieses Signal zur Einleitung der Apoptose und ist damit ein initiales Signal der Apoptose der betroffenen Zelle. Es dient vor allem Makrophagen als Signal, um diese apoptotischen Zellen über spezifische Phosphatidylserin-Rezeptoren zu erkennen und zu beseitigen (Čopič, Dieudonné, and Lenoir 2023; Tait, Smith, and Wood 1999; Ramstrom et al. 2010; Schroit and Zwaal 1991; Miyanishi et al. 2007).

1.3.5 Thrombozyten-Interaktion mit Leukozyten

Die Plättchen-Leukozyten-Interaktion ist ein wichtiger Prozess, der durch den Austausch von verschiedenen Signalen zwischen Blutplättchen und verschiedenen Arten von weißen Blutkörperchen charakterisiert ist. Dieser Prozess verknüpft zwei grundlegende pathophysiologische Ereignisse miteinander: die Atherothrombose und entzündliche Immunreaktionen (Totani and Evangelista 2010). Wenn diese Interaktion zum Beispiel bei einer Verletzung des Endothelgewebes von Blutgefäßen stattfindet, tragen die Blutplättchen durch die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten, wie Neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Entzündungsreaktion und Verengung der Blutgefäße bei. Neben ihrer physiologischen Funktion können diese Reaktionen ebenfalls zur Verschlimmerung von Arteriosklerose und für die Instabilität von Plaques sorgen. Darüber hinaus können die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten eine entscheidende Rolle bei der Regulierung einer Vielzahl von Reaktionen des Immunsystems spielen und tragen maßgeblich zum Ischämie-Reperfusionsschaden bei (Granja et al. 2022; Totani and Evangelista 2010).

2 Ziel dieser Arbeit

Weltweit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit steigender Tendenz eine der Haupttodesursachen (Khodadi 2020). In Deutschland sind sie für 40% der Todesfälle verantwortlich (Robert Koch Institut 15.06.2023). Thrombozyten spielen hierbei eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Koronarthrombose und der Atherogenese mit den daraus resultierenden Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall (Chatterjee et al. 2017; Khodadi 2020).

Im kardiovaskulären System haben $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ ähnliche, aber auch gegensätzliche Funktionen. Die Blutungszeit nach der Filterpapiermethode ist bei globalem und Plättchen-spezifischem Fehlen (KO) von $G\alpha_{i2}$ verlängert, während die Blutungszeit beim Fehlen von $G\alpha_{i3}$ kaum beeinflusst wird ((Devanathan et al. 2015) und unveröffentlicht). Bei der Induktion eines kardialen Infarkts bei Mäusen führt ein globaler Mangel an $G\alpha_{i2}$ zu einer erhöhten Infarktgröße, während ein Mangel an $G\alpha_{i3}$ einen protektiven Effekt auf die Größe des Infarkts aufweist (Köhler et al. 2014). Im Gegensatz zum globalen KO zeigt der Plättchen-spezifische KO von $G\alpha_{i2}$ einen schützenden Effekt bei einem kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden (Devanathan et al. 2015). Bei $G\alpha_{i3}$ ist der protektive Effekt bei globalem und Plättchen-spezifischem KO identisch (unveröffentlicht).

Ziel dieser Arbeit ist es die Funktion von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Thrombozyten genauer zu untersuchen und letztendlich zu verstehen. Hierfür soll die basale Expression verschiedener Oberflächenproteine, die Expression von Integrin $\alpha IIb\beta 3$ und CD62P nach Aktivierung mit verschiedenen Substanzen, die Beeinflussung des Membranpotentials in Mitochondrien nach Aktivierung, sowie die Induktion der Apoptose der isolierten Plättchen und die thromboinflammatorische Assoziation von Blutplättchen mit Leukozyten in Vollblut analysiert werden. Hierfür sollen Mäuse mit einem Plättchen-spezifischen KO von $G\alpha_{i2}$, einem globalen und Plättchen-spezifischen KO von $G\alpha_{i3}$, sowie mit einem Plättchen-spezifischen Fehlen von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ im Vergleich zu Geschwisterkontrolltieren untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller	Ort
ADP	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
ADP	Chrono-Log	Havertown, PA, USA
CaCl ₂	MERCK	Darmstadt, Germany
CaCl ₂ 2H ₂ O	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
CRP	CambCol laboratories	Cambridgeshire, UK
α-D-Glucose-Monohydrat	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
FCCP	abcam	Cambridge, UK
HEPES	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
Ionomycin	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
NaCl	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
NaN ₃	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth	Karlsruhe, Germany
Proteinase K	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
RNase-Free Water	QIAGEN	Hilden, Germany
U41675	ENZO	Farmingdale, NY, USA
Thrombin	Roche Diagnostics	Mannheim, Germany
Trinatriumcitrat-Dihydrat	MERCK	Darmstadt, Germany
Zitronensäure-Monohydrat	Carl Roth	Karlsruhe, Germany

3.1.2 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Reagenzien

Name	Hersteller	Ort
BD FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate	BD Biosciences	San Jose, California, USA
DirectPCR (Tail)	VIAGEN Biotech	Los Angeles, CA, USA

Tabelle 4: Kits

Name	Hersteller	Ort
Multiplex PCR Kit	QIAGEN	Hilden, Germany
QIAxcel DNA Kits	QIAGEN	Hilden, Germany
Taq PCR Master Mix Kit	QIAGEN	Hilden, Germany
TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	abcam	Cambridge, UK

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Ort
BD Plastipak 1ml	BD Biosciences	San Jose, California, USA
BD Microlance 3	BD Biosciences	San Jose, California, USA
Eppendorf Tubes 3810X	Eppendorf	Hamburg, Germany
FACS Tubes	BD Biosciences	Heidelberg, Germany
Falcon Tubes, 15 ml/ 50 ml	BD Biosciences	Heidelberg, Germany
Haematocrit capillaries 75mm/75µl	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Germany
PCR 8er-SoftStrips	Biozym Biotech Trading	Vienna, Austria
Pipette tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Germany

3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Konzentration	Inhalt	Hersteller
	2.5%	Trinatriumcitrat-Dihydrat	
Acid-Citrate-Dextrose-Buffer (ACD)	1.4%	Zitronensäure-Monohydrat	
	2%	α -D-Glucose-Monohydrat	
		ddH ₂ O	
	10mM	HEPES	
Binding-Puffer	140 mM	NaCl	
	2.5mM	CaCl ₂ 2H ₂ O	
	pH 7.4		
Citrat 9NC in S Monovette	0.106mol/l		Sarstedt
PBS ⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)			Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
PBS ⁻ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline. Modified, without CaCl ₂ and MgCl ₂)			Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
	1%	Paraformaldehyd (PFA)	
Zellfixierungspuffer	0,1%	NaN ₃	
		PBS+	

3.1.4 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Herkunft	Klon	Hersteller
AnnexinV	FITC			Immunotools
Rat IgG2b, κ IsotypeCtrl	APC	Ratte	RTK4530	BioLegend
CD42b	Dylight 649	Ratte	Xia.G5	Emfret Analytics
CD42b	FITC	Ratte	Xia.G7	Emfret Analytics
CD45	APC	Ratte	30-F11	Biolegend
CD62P	FITC	Ratte	Wug.E9	Emfret Analytics
Rat IgG IsotypeCtrl	Dylight 649	Ratte		Emfret Analytics
Rat IgG IsotypeCtrl	FITC	Ratte		Emfret Analytics
GPV	FITC	Ratte	Gon.G6	Emfret Analytics
GPVI	FITC	Ratte	JAQ1	Emfret Analytics
GPIX	FITC	Ratte	Xia.B4	Emfret Analytics
Integrin α IIb β 3	PE	Ratte	Jon/A	Emfret Analytics
Integrin α 5	FITC	Ratte	Tap.A12	Emfret Analytics
Integrin β 3	FITC	Ratte	Luc.H11	Emfret Analytics
Ly6G	PE	Ratte	1A8	BioLegend
Rat IgG IsotypeCtrl	PE	Ratte		Emfret Analytics
Rat IgG2a, κ IsotypeCtrl	PE	Ratte	RTK2758	BioLegend

3.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH bezogen.

Tabelle 8: Oligonukleotide für PCR

Zielstruktur	c [μ M]	Sequenz
<i>Gnai3</i> _Pr8 (wt)	10	5' GTGGCCAAAGATCCGAACGAA 3'
<i>Gnai3</i> _Pr9 (wt+ko)	10	5' TTCATGCTTTTCATGCATTCGGTTC 3'
<i>Gnai3</i> _Pr10 (ko)	10	5' TGCCGAGAAAGTATCCATCAT 3'
<i>Gnai</i> _3loxPr_Int-F	10	5'-TAGCAGTTGTCATGGCTACC-3'
<i>Gnai3</i> _loxPr_EX7-R	10	5'-ATGCTGTCAAACAATTTTCATG-3'
IPC Reverse	10	5'-GTCAGTCGAGTGACAGTTT-3'
IPC Forward	10	5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'
Pf4-CrePr for	10	5'-CCCATACAGCACACCTTTTG-3'
Pf4-CrePr rev	10	5'-TGCACAGTCAGCAGGTT-3'
<i>Primer 22</i>	10	5' GGCTATGATCCCAAACCTCCCCG 3'
<i>Primer 23</i>	10	5' GGAGCCTGGACTTTGCTTCTGACC 3'

3.1.6 Laborgeräte und Software

Tabelle 9: Laborgeräte

Name	Hersteller	Ort
BP221S Scale	SARTORIUS	Goettingen, Germany
FACS Canto II	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
Heidolph Reax 2000	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Germany
QIAxcel	QIAGEN	Hilden, Germany
Scil VET abc Plus+	HORIBA Medical	Oberursel, Germany
Thermomixer comfort/ Thermomixer R	Eppendorf	Hamburg, Germany
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf	Hamburg, Germany

Tabelle 10: Software

Name	Hersteller	Ort
BD FACSDiva Software	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
CorelDraw	Corel Corporation	Ottawa, Ontario, Kanada
Excel	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
FlowJo	FlowJo LLC, Becton Dickinson	Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 10	GraphStats Technologies	Atlanta, USA
QIAxcel ScreenGel	QIAGEN	Hilden, Germany

3.2 Methoden

3.2.1 Mausezucht

Die für die Experimente verwendeten Mäuse wurden gemäß den nationalen Richtlinien für die Tierpflege unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen entweder in offenen oder in isoliert belüfteten Käfigen (IVCs) in der Tierhaltung "Pharmakologie/Toxikologie" der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen gehalten. Alle Tierversuche wurden nach den geltenden Gesetzen und den Vorschriften des Regierungspräsidium Tübingen durchgeführt (Genehmigungen PH01/22M und PH01/20M). Alle Blutentnahmen wurden unter Vollnarkose vollzogen. Das Blut wurde von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer, Dr. Madhumita Chatterjee, Dr. Veronika Leiss oder Sandra Schwegmann entnommen. Mäuse beiderlei Geschlechts im Alter von acht bis 22 Wochen wurden für die Experimente verwendet.

Die Erzeugung und grundlegende phänotypische Charakterisierung von Mäusen mit einem globalen Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins ($Gnai3^{-/-}$), sowie deren Zucht auf einen C57BL/6N-Hintergrund wurden an anderer Stelle detailliert beschrieben (Gohla et al. 2007; Jiang et al. 2002). Entsprechende Geschwister-Wildtyp-Mäuse wurden als Kontrollen verwendet ($Gnai3^{+/+}$). Die Erzeugung von $Gnai2^{fl/fl}$ -Mäusen (Plummer et al. 2012) und $Gnai3^{fl/fl}$ -Mäusen (Beer-Hammer et al. 2018) wurde ebenfalls an anderer Stelle dokumentiert. $Gnai2/i3^{fl/fl}$ -Mäuse wurden durch Kreuzung dieser beiden Stämme generiert. Die Pf4-Cre-transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase spezifisch in Megakaryozyten und Blutplättchen exprimiert, wurde freundlicherweise von Radek Skoda vom Department of Biomedicine, Experimental Hematology, am Universitätsspital Basel zur Verfügung gestellt (Tiedt et al. 2007). Diese Mauslinie wurde jeweils mit $Gnai2^{fl/fl}$ -Mäusen, $Gnai3^{fl/fl}$ -Mäusen und $Gnai2/i3^{fl/fl}$ -Mäusen gekreuzt, um $Gnai2^{fl/fl}$ Pf4-Cre⁺, $Gnai3^{fl/fl}$ / Pf4-Cre⁺, $Gnai2/i3^{fl/fl}$ / Pf4-Cre⁺ Tiere zu erzeugen. Pf4-Cre-negative Geschwistertiere ($Gnai2^{fl/fl}$ / Pf4-Cre⁻, $Gnai3^{fl/fl}$ / Pf4-Cre⁻, $Gnai2/i3^{fl/fl}$ / Pf4-Cre⁻) dienten als Kontrollen.

3.2.2 Genotypisierung von Mäusen

Die Mäuse wurden im Alter von drei Wochen mittels Ohrstanzen markiert und das gewonnene Gewebe wurde zur Genotypisierung verwendet. Zur Validierung des ersten Ergebnisses wurden nach Durchführung der Experimente Proben der Mausschwänze genommen, um eine weitere Genotypisierung der jeweiligen Mäuse durchzuführen. Zur Genotypisierung wurde zunächst eine Gewebe-Lyse durchgeführt, um DNA zu erhalten, die dann für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet wurde. Hierzu wurden die Biopsien der Ohren/Schwänzchen in 100 µL DirectPCR Lysis Reagenz mit 5 µL Proteinase K (1 mg/ml) für 4 Stunden bei Ohrstanzen und 6 Stunden bei Schwänzchen bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 20 Minuten bei 95°C inaktiviert. Darauffolgend wurden die PCR-Ansätze pipettiert. Hierfür wurde entweder ein Multiplex PCR Plus Kit oder ein Taq PCR Master Mix Kit verwendet. Zusätzlich wurden entsprechende Primer, RNase-freies Wasser und die DNA-Proben hinzugefügt. In Tabelle 11 - Tabelle 16 sind die entsprechenden Reagenzien, Primer, Volumen und Thermocycler-Programme aufgeführt. Durch dieses Verfahren konnte das Vorhandensein oder Fehlen der *Gnai2*, *Gnai3*, der loxP-Stellen und des Pf4-Cre-Rekombinase-Transgen detektiert werden. Die PCR wurde mit einem Thermocycler durchgeführt und die Proben wurden mit einem QIAxcel Gerät und der QIAxcel ScreenGel Software analysiert.

Tabelle 11: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des genomischen Vorhandenseins des Pf4-Cre-Rekombinase-Transgens

Pf4-Cre	Volumen pro Reaktionsansatz [µl]
Multiplex PCR Plus Kit	12,5
Pf4-CrePr for (10 µM)	0,75
Pf4-CrePr rev (10 µM)	0,75
IPC Forward (10 µM)	0,25
IPC Reverse (10 µM)	0,25
RNase free water	9,5
DNA lysate	1

Table 12: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion von globalem *Gnai3*-KO und WT

<i>Gnai3</i>	Volumen pro Reaktionsansatz [μl]
Multiplex PCR Plus Kit	12,5
<i>Gnai3</i> _Pr8 (wt)	0,5
<i>Gnai3</i> _Pr9 (wt+ko)	0,5
<i>Gnai3</i> _Pr10 (ko)	0,5
RNAse free water	10
DNA lysate	1

Tabelle 13: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen bei *Gnai2*^{fl/fl}

<i>Gnai2</i> ^{fl/fl}	Volumen pro Reaktionsansatz [μl]
Taq PCR Master Mix Kit	12,5
Primer 22	0,5
Primer 23	0,5
RNAse freies Wasser	10,5
DNA lysate	1

Tabelle 14: Reagenzien und Volumina pro Reaktion zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen bei *Gnai3*^{fl/fl}

<i>Gnai3</i> ^{fl/fl}	Volumen pro Reaktionsansatz [μl]
Taq PCR Master Mix Kit	12,5
<i>Gnai_3loxPr_Int-F</i>	0,5
<i>Gnai3_loxPr_EX7-R</i>	0,5
RNAse freies Wasser	10,5
DNA lysate	1

Tabelle 15: Thermocycler-Programm zur Detektion von Wildtyp- und globalen *Gnai3*-defizienten Mäusen sowie zur Detektion des genomischen Vorhandenseins des Pf4-Cre-Rekombinase-Transgens

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Schritte	Zyklen
95	15:00	Initiale Denaturierung	
94	0:30	Denaturierung	
60	1:30	Primerhybridisierung	32 x
72	1:30	Elongation	
72	10:00	Endgültige Elongation	
8	Haltezeit		

Tabelle 16: Thermocycler-Programm zur Detektion des Vorhandenseins oder Fehlens der loxP-Stellen von *Gnai2*^{fl/fl} und *Gnai3*^{fl/fl}

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Schritte	Zyklen
95	15:00	Initiale Denaturierung	
94	0:30	Denaturierung	
60	1:30	Primerhybridisierung	32 x
72	1:30	Elongation	
72	10:00	Endgültige Elongation	
8	Haltezeit		

3.2.3 Stimulanzen-Vorbereitung

Für alle verwendeten Stimulanzen wurde vor dem jeweiligen Experiment eine Vorverdünnung mit PBS+Ca²⁺ vorbereitet. CRP (Lagerkonzentration 2,5 mg/mL) wurde auf 50 µg/mL, ADP (Lagerkonzentration 1 mM) auf 100 µM, U46619 (Lagerkonzentration 30 mM) auf 30 µM und Thrombin (Lagerkonzentration 20 U/ml) auf 1 U/ml verdünnt.

3.2.4 PRP-Aufbereitung

Um PRP aus Vollblut zu gewinnen, wurde venöses Blut aus dem retroorbitalen Plexus der tief narkotisierten Mäuse in einem Verhältnis von 1:4 mit ACD-Antikoagulans entnommen. In weiteren Schritten wurde das Blut zuerst bei 260xg ohne Bremse für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Folgend wurde großzügig die gelbliche PRP-Schicht zusammen mit der dünnen milchigen Schicht, die den Erythrozyten aufliegt in einem separaten Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Dies wurde wiederum bei 50xg ohne Bremse für 5 Minuten zentrifugiert. Das PRP konnte nun vorsichtig abpipettiert werden. In diesem Schritt musste extrem darauf geachtet werden, keine Erythrozyten oder andere Zellen mit abzapfen, um reines PRP zu erhalten. Für die Zellkonzentrationsmessung wurden 10 µl PRP in einem Verhältnis von 1:10 in PBS verdünnt und die Anzahl der Thrombozyten mit Scil VET abc Plus+ gezählt. Um eine konstante Thrombozytenzahl in einem konstanten Volumen zu erhalten, wurde das PRP mit PBS+Ca²⁺ mit 1 mM zusätzlich addiertem CaCl₂ so verdünnt, dass man 10⁶ Thrombozyten in 5 µl PRP erhielt.

3.2.5 Anpassung der Fluoreszenzspannung und Kompensationskontrolle im Durchflusszytometer

Um für die Auswertung ein optimales Fluoreszenzsignal für jede Färbung zu erhalten, wurde zunächst für jeden Versuch, jeweils eine Probe mit der Isotyp-Kontrolle korrespondierend für jedes im Experiment verwendete Fluorophor gemessen. Hierfür wurde die gleiche Konzentration wie für den nachfolgend verwendeten Antikörper eingesetzt. Mit diesen Isotyp-Kontrollen wurde so für jeden Parameter die optimale Fluoreszenzspannung ausgewählt.

Da in verschiedenen Experimenten Antikörper verwendet wurden, bei denen die Wellenlängenbereiche der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe überlappen, wurde zu Beginn des Experimentes eine Kompensationskontrolle nach dem Protokoll der FACSDiva Software eingelesen. Nach der Kalibrierung mit einzeln gefärbten Proben berechnet die BD FACSDiva-Software automatisch eine Kompensation, die falsch positive Signale ausgleicht.

3.2.6 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 3$ auf ruhenden Thrombozyten

Um die Expression von GPV, GPVI, GPIX, Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 3$ auf ruhenden Thrombozyten zu untersuchen, wurde venöses Blut aus dem retroorbitalen Plexus von Mäusen in ACD-Antikoagulans (im Verhältnis 1:4) entnommen. Dieses Blut wurde anschließend 1:50 mit PBS+Ca²⁺ verdünnt. In fünf FACS-Röhrchen wurden 5 μ l anti-CD42b-Dylight 649, sowie jeweils GPV-FITC, GPVI-FITC, GPIX-FITC, Integrin $\alpha 5$ -FITC oder Integrin $\beta 3$ -FITC vorgelegt. Die Röhrchen wurden dann mit 15 μ l PBS+Ca²⁺ auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l gebracht. Anschließend wurden 25 μ l des verdünnten Bluts hinzugefügt und vorsichtig durch leichtes Schwenken gemischt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 17 aufgeführt. Die Proben wurden dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 μ l PBS+Ca²⁺ hinzugefügt und unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Dabei wurde auf die CD42b⁺ Thrombozytenpopulation getaget.

Diese Färbung wurde gemeinsam mit den Färbungen zum Nachweis der Degranulation der α -Granula durchgeführt (3.2.7 und 3.2.8.1).

Tabelle 17: Pipettierschema Oberflächenmarker: Endvolumen 50 μ l

Aktivierungs- zustand	Vollblut 1:50 verdünnt	Antikörper	Anti- CD42b Dylight 649	PBS+Ca²⁺
Resting	25 μ l	anti-GPV- / anti-GPVI- / anti-GPIX- / anti-integrin $\alpha 5$ - / anti-integrin $\beta 3$ -FITC	5 μ l	15 μ l

3.2.7 Bestimmung der Degranulation von α -Granula mittels Oberflächenexpression von CD62P

Um die Expression von CD62P auf Thrombozyten in Ruhe und bei Aktivierung zu messen wurde venöses Blut in ACD-Antikoagulans (1:4) aus dem retroorbitalen Plexus der Mäuse entnommen. Dieses Blut wurde 1:50 mit PBS+Ca²⁺ verdünnt. In jedem FACS-Röhrchen wurden zunächst jeweils 5 μ l anti-CD62P-FITC und anti-CD42b-Dylight 649 vorgelegt. Je nach Stimulanz-Medium wurden darauffolgend 5 μ l PBS+Ca²⁺, ADP (10 μ M)[Sigma], CRP (5 μ g/ml) oder U46619 (3 μ M) hinzugefügt und mit 10 μ l PBS+Ca²⁺ auf ein Volumen von 25 μ l gebracht. Als letzten Schritt wurden 25 μ l des verdünnten Blutes hinzugefügt und vorsichtig durch ein leichtes Schwenken durchmischt. Das Pipettierschema ist der Tabelle 18 zu entnehmen. Die Inkubationszeit der Ansätze betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 μ l PBS+Ca²⁺ zugegeben und unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Hierbei wurde auf die CD42b⁺ Thrombozytenpopulation gegatet.

Tabelle 18: Pipettierschema CD62-Expression: Endvolumen 50 μ l

Aktivierungs- zustand	Vollblut 1:50 verdünnt	ADP oder CRP oder U46619	anti- CD62P- FITC	anti- CD42b Dylight 649	PBS+Ca₂⁺
Resting	25 μ l	-	5 μ l	5 μ l	15 μ l
ADP/CRP/U46619	25 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	10 μ l

3.2.8 Bestimmung der Aktivierung von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mittels Bindung von JON/A an die Oberfläche von Thrombozyten

3.2.8.1 Expression von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf Thrombozyten in Vollblut

Um die Expression von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mittels JON/A auf Thrombozyten in Ruhe und bei Aktivierung in Vollblut zu messen, wurde venöses Blut in ACD-Antikoagulans (1:4) aus dem retroorbitalen Plexus der Mäuse entnommen. Dieses Blut wurde 1:50 mit PBS+Ca²⁺ verdünnt. In jedem FACS-Röhrchen wurden zunächst 5 μl anti-JON/A-PE und 5 μl anti-CD42b-Dylight 649 vorgelegt. Je nach Stimulanz-Medium wurden außerdem 5 μl PBS+Ca²⁺, ADP (10 μM) [Sigma], CRP (5 $\mu\text{g/ml}$) oder U46619 (3 μM) hinzugefügt und mit 10 μl PBS+Ca²⁺ auf ein Volumen von 25 μl gebracht. Abschließend wurden 25 μl des verdünnten Blutes hinzugefügt und vorsichtig durch ein leichtes Schwenken durchmischt. Das Pipettierschema ist der Tabelle 19 zu entnehmen. Die Proben inkubierten für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 μl PBS+Ca²⁺ zugegeben und unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Hierbei wurde auf die CD42b⁺ Thrombozytenpopulation gegaselt.

Tabelle 19: Pipettierschema $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ - Vollblut: Endvolumen 50 μl

Aktivierungs- zustand	Vollblut 1:50 verdünnt	ADP oder CRP oder U46619	anti- JON/A- PE	anti- CD42b Dylight 649	PBS+Ca₂⁺
Resting	25 μl	-	5 μl	5 μl	15 μl
ADP/CRP/U46619	25 μl	5 μl	5 μl	5 μl	10 μl

3.2.8.2 Expression von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf Thrombozyten in PRP

Um die Expression von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mittels JON/A auf Thrombozyten in Ruhe und bei Aktivierung in PRP zu untersuchen, wurden in allen FACS-Röhrchen jeweils 5 μl anti-JON/A-PE vorgelegt. Je nach Stimulanz-

Medium wurden 10 µl PBS+Ca²⁺ mit zusätzlich 1 mM Ca²⁺, ADP (10 µM) [Sigma], CRP (5 µg/ml) oder Thrombin (0,1U/ml) hinzugefügt und mit 80 µl PBS+Ca²⁺ mit zusätzlich 1 mM Ca²⁺, auf ein Volumen von 95 µl gebracht. Zuletzt wurden 5 µl des verdünnten PRPs (10⁶ Thrombozyten) hinzu pipettiert und durch leichtes Schwenken durchmischt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 20 aufgeführt. Die Proben inkubierten für 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 µl PBS+Ca²⁺ hinzugefügt. Die Proben wurden unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen.

Tabelle 20: Pipettierschema αIIbβ3 - PRP: Endvolumen 100 µl

Aktivierungs- zustand	PRP (10⁶ Thrombozyten)	ADP oder CRP oder Thrombin	anti- JON/A-PE	PBS+Ca²⁺ (mit zusätzlich 1 mM Ca²⁺)
Resting	5 µl	-	5 µl	90 µl
ADP/CRP/Thrombin	5 µl	10 µl	5 µl	80 µl

3.2.9 Bestimmung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie

Dieser Versuch wurde zusammen mit 3.2.8.2 und 3.2.10 durchgeführt.

Die Externalisierung von Phosphatidylserin nach Aktivierung wurde durch die Anbindung von AnnexinV gemessen. Hierfür wurden je nach Stimulanz-Medium 10 µl PBS+Ca²⁺ mit 1 mM zusätzlich addiertem CaCl₂, 10 µl ADP (10 µM) [Sigma], 10 µl CRP (5 µg/ml), 10 µl Thrombin (0,1U/ml) oder 0,7 µl Ionomycin (10µM) (+9,3µl PBS+Ca²⁺) hinzugefügt und mit 80 µl PBS+Ca²⁺ mit zusätzlich 1 mM CaCl₂, auf ein Volumen von 90 µl gebracht. Anschließend wurden 5 µl des verdünnten PRP hinzugegeben und durch leichtes Schwenken durchmischt. Die erste Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden 5 µl AnnexinV-FITC zugefügt und die Proben inkubierten für weitere 30 Minuten bei gleichen Bedingungen. Das Pipettierschema ist in

Tabelle 21 aufgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 μl Binding Buffer zugegeben und unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Ionomycin diente als positive Kontrolle.

Tabelle 21: Pipettierschema AnnexinV: Endvolumen 100 μl

Aktivierungs- zustand	PRP (10^6 Thrombo- zyten)	ADP oder CRP oder Thrombin	Iono- mycin	AnnexinV- FITC	PBS+Ca²⁺ (mit zusätzlich 1 mM addiertem CaCl ₂)
Resting	5 μl	-	-	5 μl	90 μl
ADP/CRP/ Thrombin	5 μl	10 μl	-	5 μl	80 μl
Ionomycin	5 μl	-	10 μl	5 μl	80 μl

3.2.10 Messung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi\text{m}$) mittels TMRE-Fluoreszenzantwort

Um die durch Aktivierung verursachte Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi\text{m}$) zu untersuchen, wurden je nach Stimulanz-Medium 10 μl PBS+Ca²⁺ mit zusätzlich 1 mM Ca²⁺, 10 μl ADP (10 μM)[Sigma], 10 μl CRP (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 μl Thrombin (0,1 U/ml), 2 μl FCCP (10 μM)(+ 8 μl PBS+Ca²⁺) oder 0,7 μl Ionomycin (10 μM) (+ 9,3 μl PBS+Ca²⁺) vorgelegt und mit 81 μl PBS+Ca²⁺ mit zusätzlich 1 mM CaCl₂, auf ein Volumen von 91 μl gebracht. Als nächstes wurden 5 μl des verdünnten PRP hinzu pipettiert und durch leichtes Schwenken durchmischt. Die Proben inkubierten für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Inkubationszeit wurden 4 μl TMRE (0,2 μM) beigefügt und die Proben inkubierten für weitere 30 Minuten bei gleichen Bedingungen. Das Pipettierschema ist der Tabelle 22 zu entnehmen. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Probe 300 μl PBS+Ca²⁺ zugegeben und unmittelbar mit einem FACS

Canto II Durchflusszytometer gemessen. FCCP (Abcam) diente als positive Kontrolle.

Tabelle 22: Pipettierschema Membranpotential: Endvolumen 100 µl

Aktivierungs- zustand	PRP (10 ⁶ Thrombo- zyten)	ADP oder CRP oder Thrombin	FCCP	Iono- mycin	TMRE	PBS+Ca²⁺ (mit zusätzlich 1 mM Ca ²⁺)
Resting	5 µl	-	-	-	4 µl	91 µl
ADP/CRP/ Thrombin	5 µl	10 µl	-	-	4 µl	81 µl
FCCP	5 µl	-	2 µl	-	4 µl	89 µl
Ionomycin	5 µl	-	-	0,7 µl	4 µl	90,3 µl

3.2.11 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten

Um die thromboinflammatorische Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten (PNCs) zu messen, wurde venöses Blut in Citrat-Antikoagulans (1:10) aus dem retroorbitalen Plexus der Mäuse entnommen. In jedem FACS-Röhrchen wurde, je nach Stimulanz-Medium, 10 µl PBS+Ca²⁺, 10 µl ADP (10 µM)[Chrono-Log], 10 µl CRP (5 µg/ml) oder 10 µl Thrombin (0,1 U/ml) mit einem Master-Mix, bestehend aus je 1 µl anti-CD45-APC, anti-Ly6G-PE und anti-CD42b-FITC, vorgelegt. Zu guter Letzt wurden 87 µl Vollblut hinzugefügt und durch leichtes Schwenken der Röhrchen durchmischt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 23 aufgeführt. Die Ansätze inkubierten für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Nach der Inkubation wurde mit 2 ml BD-Lysing Buffer 1x lysiert, bis die Lyse zu optisch klar umschlug (meist 10-20 Sekunden). Die Proben wurden nun bei 300xg für 5 Minuten, bei 22°C, mit Bremse zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. In einem zweiten Schritt wurden die Proben mit 2 ml PBS ohne

Calcium gewaschen, sofort wieder bei 300xg für 5 Minuten, bei 22°C, mit Bremse zentrifugiert und anschließend der Überstand wieder verworfen. Anschließend wurden die Proben mit 300 µl Zellfixierungspuffer resuspendiert und unmittelbar mit einem FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Hierbei wurde auf die CD45⁺ Leukozytenpopulation gegatet.

Tabelle 23: Pipettierschema PNCs: Endvolumen 100 µl

Aktivierungs- zustand	Vollblut	Antikörper-Mix anti-CD45-APC + anti-Ly6G-PE + anti-CD42b-FITC 1:1:1	ADP oder CRP oder Thrombin	PBS+Ca²⁺
Resting	87 µl	3 µl	-	10 µl
ADP/CRP/Thrombin	87 µl	3 µl	10 µl	-

3.2.12 Auswertung und Statistik

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Alle Werte wurden als arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler aufgeführt. Outliers wurden mit dem ROUT-Test und einem Q von 2% aus der Auswertung ausgeschlossen. Zum Vergleich der Gruppen wurde eine Twoway-ANOVA durchgeführt. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 3$ auf ruhenden Thrombozyten

Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Glykoproteine (GP), die zwar unterschiedlichen Rezeptorfamilien zugeordnet werden, aber alle entscheidend für die Aktivierung der Thrombozyten sind.

Aus dem GPIb/IX/V Komplex (CD42) wurde GPIb bzw. CD42b als Marker für Thrombozyten verwendet, da dieser stets auf Thrombozyten exprimiert wird (Rivera et al. 2000). Die Expressierung von GPV und GPIX wurde hingegen in den einzelnen Mausstämmen untersucht und entsprechend verglichen. Das Thrombozytenmembranprotein GPVI ist durch seine Funktion als physiologischer Kollagenrezeptor ebenfalls für die Aktivierung unerlässlich und deshalb von Interesse (Moroi and Jung 2004).

Die untersuchten Integrine $\alpha 5$ und Integrin $\beta 3$ sind Untereinheiten verschiedener Rezeptoren. Integrin $\alpha 5$ kommt in Integrin $\alpha 5\beta 1$ vor und Integrin $\beta 3$ in Integrin $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$. Die Funktionsweise dieser Rezeptoren wurden bereits in 1.3 beschrieben (Benito-Jardón et al. 2017; Hermann et al. 1999; Janus-Bell et al. 2022).

Bei der Expression der Glykoproteine GPV, GPVI, GPIX und Integrine $\alpha 5$ und $\beta 3$ auf der Oberfläche von Blutplättchen in venösem Blut aus *Gnai2^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen, *Gnai3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen und *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen zu ihrer jeweiligen Pf4Cre⁻-Kontrollgruppe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 2). Lediglich die Expression von $\beta 3$ auf Plättchen von *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen war signifikant erhöht (Abb. 2 C).

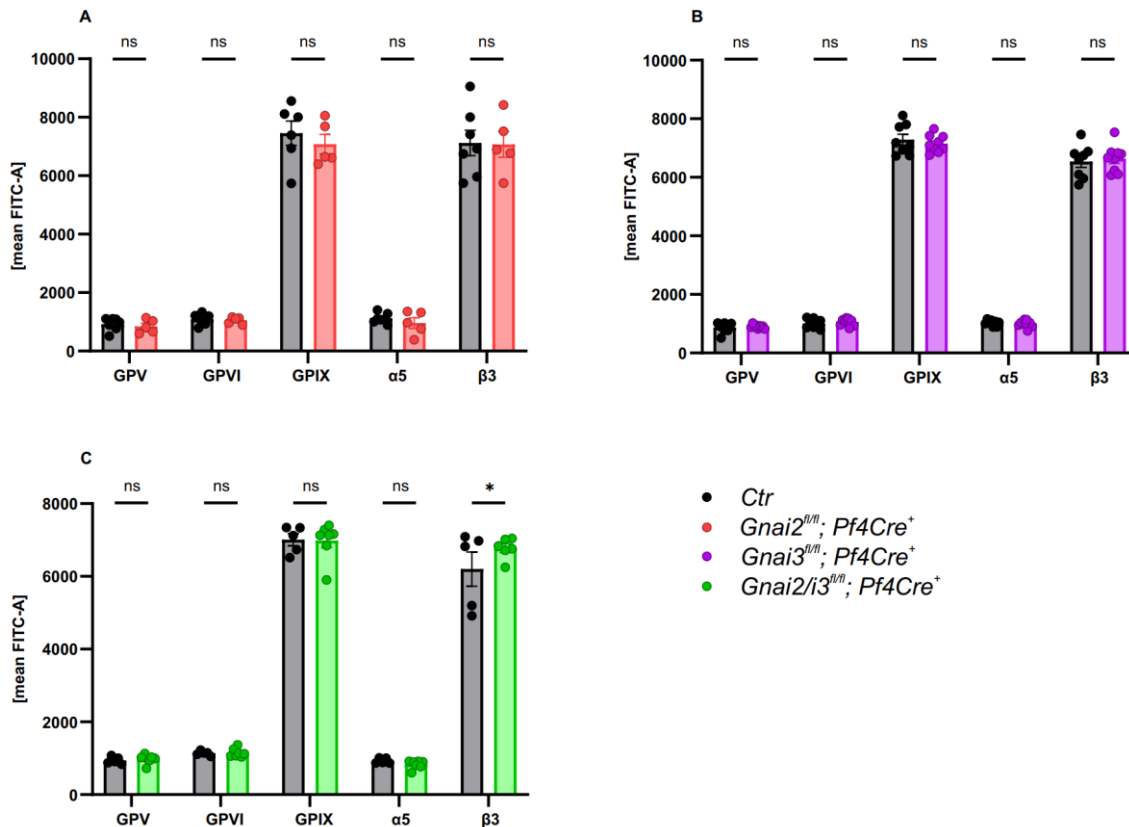


Abb. 2: Expression verschiedener Oberflächenproteine in Ruhe. Venöses Blut von A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* und C) *Gnai2/i3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Pf4Cre⁻ Kontrollgruppe wurde auf die Expression von GPV, GPVI, GPIX, α5 und β3 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq P > 0.05, * \triangleq P ≤ 0.05.

In *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*-Mäusen (Abb. 2 A) wurde die Expression von GPV auf Blutplättchen mit einer mittleren Fluoreszenz von 846 im Vergleich zu 924 in der Kontrollgruppe gemessen. Bei GPVI war diese mit 1084 in den Kontrollzellen und 1053 in den *Gnai2*-defizienten Zellen höher. Bei der Expression von GPIX konnte eine mittlere Fluoreszenz von 7456 in der Kontrolle und 7077 bei Gen-Defizienz gemessen werden. α5 wurde in seiner Expression mit 1118 in der Kontrolle und 959 in den *Gnai2*-defizienten Blutplättchen gemessen. Bei der Expression von β3 in *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*-Plättchen konnte ebenfalls keine Signifikanz von 7068 zu 7121 in der Kontrolle beobachtet werden.

Bei Thrombozyten von *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*-Mäusen (Abb. 2 B) wurde eine mittlere Fluoreszenz für die Expression von GPV mit 866 in der Kontrollgruppe und 903

auf den *Gnai3*-defizienten Zellen gemessen. Die Expression von GPVI in den defizienten Zellen war mit 1060 etwas höher als mit 1005 in der Kontrollgruppe. Bezüglich der GPIX-Expression wurde wie auch in den *Gnai2^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Plättchen eine deutlich höhere Fluoreszenz festgestellt. Diese betrug 7283 in den Kontroll- und 7151 in den *Gnai3*-defizienten-Thrombozyten. Hinsichtlich der α 5-Expression in *Gnai3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺ Mäusen konnte ebenfalls keine signifikante Abweichung, mit 1030 in der Kontrollgruppe und 1000 in den *Gnai3*-defizienten Thrombozyten festgestellt werden. Die β 3-Expression betrug 6538 in der Kontrollgruppe und 6635 in den *Gnai3*-defizienten-Thrombozyten.

In *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Thrombozyten (Abb. 2 C) wurde die Expression von GPV mit einer mittleren Fluoreszenz von 939 in den Kontrollzellen und 972 auf den doppel-defizienten Plättchen bestimmt. Bei GPVI lag diese bei 1135 in der Kontrolle und 1150 in den Thrombozyten mit *Gnai2/3*-Defizienz. Bei der Expression von GPIX konnte eine Fluoreszenz von 7011 in der Kontrolle und 6980 in *Gnai2/3*-defizienten Blutplättchen gemessen werden. Hinsichtlich der α 5-Expression in *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺ Mäusen konnte ebenfalls keine signifikante Abweichung, mit 927 in der Kontrolle und 830 in den *Gnai2/3*-defizienten Blutplättchen, festgestellt werden. Bei der Expression von β 3 in Thrombozyten der *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäuse wurden Werte von 6771 zu 6200 in der Kontrolle gemessen. Dies erbrachte in der Auswertung eine statistische Signifikanz von $P \leq 0.05$.

4.2 Degranulation von α -Granula in *Gnai*-defizienten Thrombozyten, gekennzeichnet durch die Oberflächenexpression von CD62P

P-Selektin (CD62P) ist ein Zelladhäsionsmolekül von Blutplättchen und Endothelzellen, das in Thrombozyten in α -Granula gespeichert wird. Nach Aktivierung wird P-Selektin auf der Plasmamembran exprimiert. Die erhöhte Expression von CD62P auf der Zellmembran ist ein Marker für stimulierte oder aktivierte Blutplättchen (Wasiluk 2004).

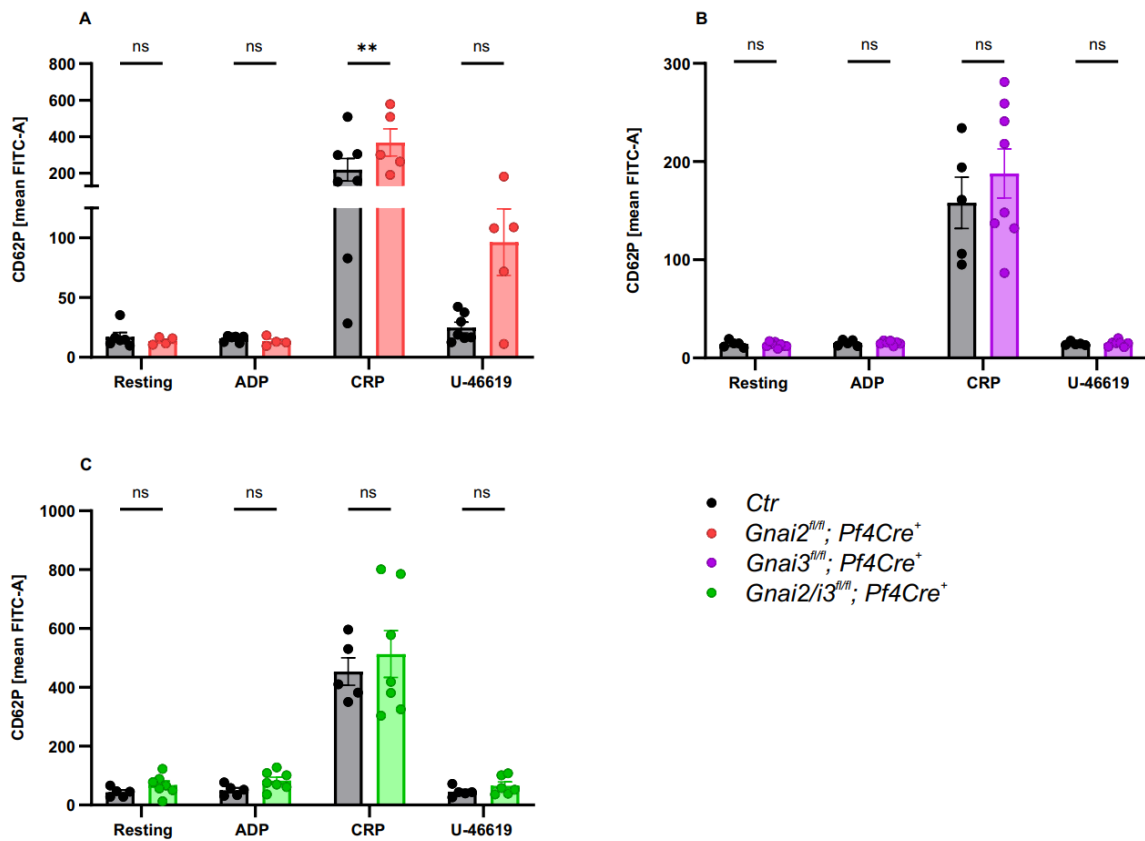


Abb. 3: Expression von CD62P nach Stimulation bzw. ohne Stimulation auf Thrombozyten von A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* und C) *Gnai2/i3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq $P > 0.05$, ** \triangleq $P \leq 0.01$.

Beim Vergleich der Expression von P-Selektin auf Blutplättchen aus *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*-Mäusen zu ihrer Kontrollgruppe (Abb. 3 A), konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Ruhe als auch bei Aktivierung mit ADP und U46619 festgestellt werden. Bei CRP lag hingegen eine Signifikanz vor. Der Mittelwert der Fluoreszenz war in Ruhe bei der Kontrollgruppe 17 zu 13,6 in *Gnai2*-defizienten Blutplättchen. Bei ADP konnte in der Kontrolle mit 15,6 zu 13,3 ein leicht höherer Wert ermittelt werden. Nach der Stimulation mit CRP wurde eine signifikant höhere Expression von CD62P auf Zellen mit *Gnai2*-Defizienz als in der Kontrollgruppe festgestellt. Diese hat sich von 219,6 zu 368,2 fast verdoppelt. Bei U46619 konnte diese Erhöhung bei *Gnai2*-Defizienz ebenfalls festgestellt werden. Sie betrug 24,8 in der Kontrolle und 96,4 in den Plättchen der Thrombozyten-spezifischen *Gnai2*-defizienten Mäuse. Diese Erhöhung wurde jedoch nicht als signifikant erkannt. Allgemein konnte bei der Stimulation mit CRP

und U46619 ein Anstieg der Expression festgestellt werden. Bei ADP war diese nicht feststellbar.

Beim Vergleich der Expression von P-Selektin in Thrombozyten aus *Gnai3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen zu ihrer Kontrollgruppe (Abb. 3 B), konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Ruhe als auch bei Aktivierung festgestellt werden. Der Mittelwert der Fluoreszenz war in Ruhe bei der Kontrollgruppe 14,2 zu 13,4 bei Defizienz. Bei ADP lag dieser bei 15,4 in *Gnai3*-defizienten Blutplättchen und 15,2 bei den Kontrolltieren. Nach der Stimulation mit CRP konnte wieder ein deutlicher Anstieg der CD62P-Expression im Vergleich zum Resting festgestellt werden. Dieser ist mit 158 zu 187 jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $G\alpha_{i3}$ -Defizienz leicht, aber nicht signifikant erhöht. Bei U46619 wurden wieder ähnliche Werte von 14,8 in Thrombozyten der Plättchen-spezifischen *Gnai3*-defizienten Mäusen und 14,2 in Kontrolltieren, im Vergleich zum Ruhezustand gemessen.

Beim Vergleich der P-Selektin-Expression zwischen den *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen und ihrer Kontrollgruppe (Abb. 3 C), konnte kein signifikanter Unterschied sowohl im Ruhezustand als auch nach Aktivierung festgestellt werden. Die mittlere Fluoreszenzintensität betrug im Ruhezustand 42,9 in Kontrollzellen und 68 bei *Gnai2/i3*-Defizienz. Unter der ADP-Stimulation waren diese Werte mit 50,4 in der Kontrolle bzw. 82,8 bei *Gnai2/i3*-Defizienz im Vergleich zum Ruhezustand leicht erhöht, jedoch nicht signifikant verschieden voneinander. Eine deutliche Erhöhung der CD62P-Expression im Vergleich zum Ruhezustand wurde bei der CRP-Stimulation beobachtet. Der Wert stieg auf 453 in den Kontrollzellen und 513 in Thrombozyten mit *Gnai2/i3*-Defizienz. Bei Vergleich dieser beiden Werte konnte keine Signifikanz ermittelt werden. Ähnliche Werte zum Ruhezustand wurden unter U46619-Stimulation mit 45 in der Kontrolle und 65,5 bei Defizienz gemessen. Generell konnte bei Thrombozyten der *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäuse eine etwas höhere Expression von CD62P, als bei den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden.

4.3 Bestimmung der Aktivierung von α IIb β 3 auf *Gnai*-defizienten Thrombozyten, gekennzeichnet durch die Bindung von JON/A

JON/A ist ein Antikörperklon, der ausschließlich an aktives Integrin α IIb β 3 bindet. Über die Zunahme an zusätzlich exponiertem aktivem Integrin α IIb β 3 kann man Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten ziehen (Harrison and Cramer 1993).

Die Bindung von JON/A wurde in Vollblut und in PRP untersucht.

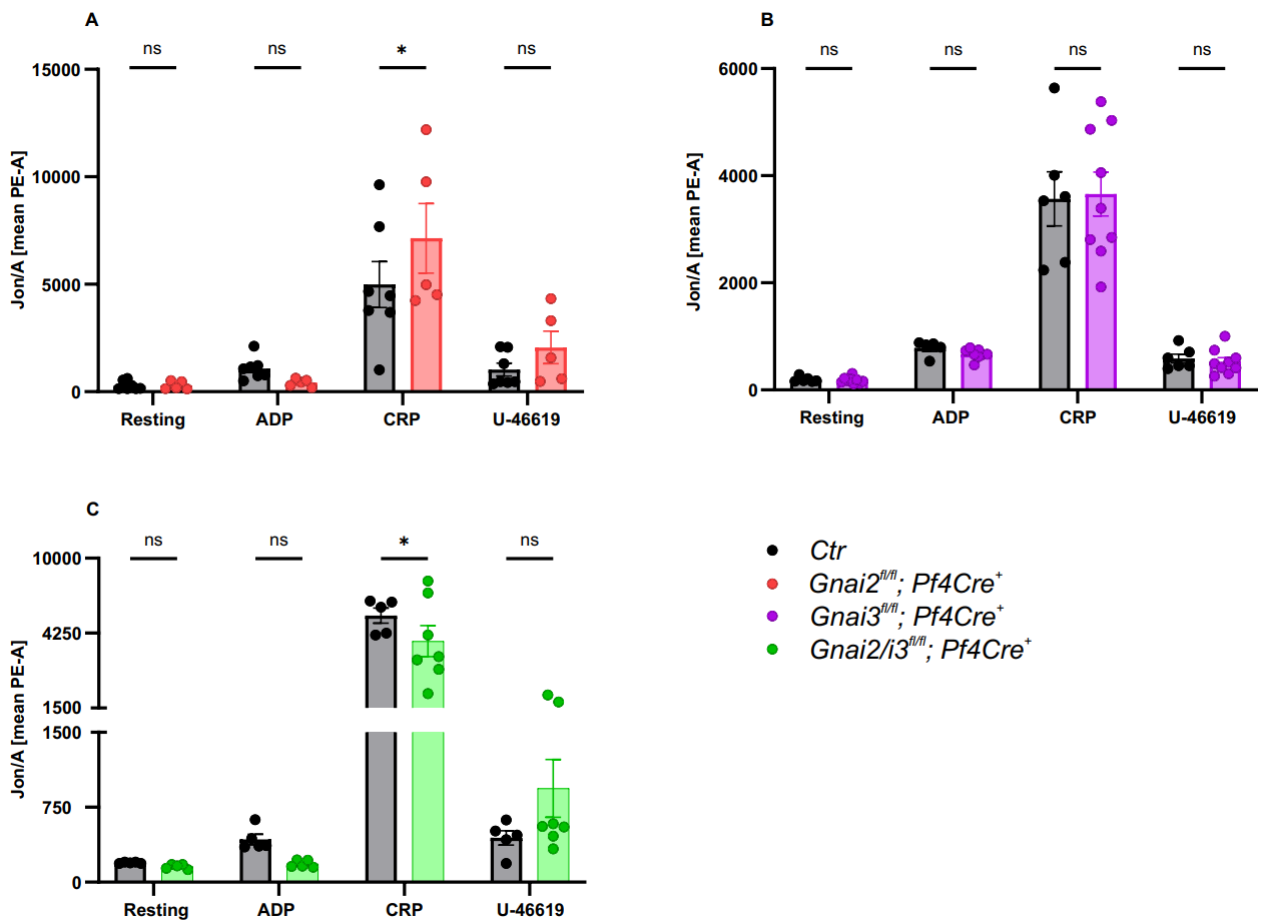


Abb. 4: Bindung von JON/A nach Stimulation bzw. ohne Stimulation in Vollblut von A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* und C) *Gnai2/i3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq P > 0.05, * \triangleq P.

In Vollblut wiesen Thrombozyten von *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*-Mäusen und ihre Kontrollzellen (Abb. 4 A) nach der Stimulation mit CRP eine Signifikanz auf. Es

konnten ebenfalls Unterschiede in der $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung nach ADP und U46619 Stimulation gemessen werden, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwiesen. Im Ruhezustand konnten die Werte mit 292,4 in der Kontrollgruppe und 286 bei Plättchen mit *Gnai2*-Defizienz festgehalten werden. Bei ADP wurde in der Kontrolle mit 1086,6 ein mehr als doppelt so hoher Wert, als mit 418,2 in Thrombozyten Plättchen-spezifischer *Gnai2*-defizienten Mäusen gemessen. Bei CRP konnte wie bereits erwähnt eine statistische Signifikanz ermittelt werden. Die gemessene $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung war mit dem Fehlen von $\text{G}\alpha_{i2}$ mit 7141,4 höher als in den entsprechenden Kontrollzellen mit 4993,6. Bei der Stimulation mit U46619 war diese in *Gnai2*-defizienten Thrombozyten mit 2061,4 ebenfalls höher als mit 1030 in der Kontrollgruppe.

Zwischen Plättchen aus *Gnai3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen und ihrer Kontrollgruppe (Abb. 4 B) hatten sich keine Unterschiede zwischen diesen herausgestellt. Im Ruhezustand wurde eine mittlere Fluoreszenz von 194 in Kontrolltieren und 182,2 bei Tieren mit *Gnai3*-defizienten Thrombozyten ermittelt. Nach der Stimulation mit ADP war diese mit 782,8 in der Kontrolle und 668,8 bei Thrombozyten mit Fehlen von $\text{G}\alpha_{i3}$ höher. Bei CRP konnten Werte mit 3567 in Kontrollzellen und 3656,2 bei *Gnai3*-Defizienz ermittelt werden. Das Level der Expression war bei U46619 mit 587,7 bei Kontrollzellen und 526,8 mit *Gnai3*-defizienten Plättchen wieder etwas geringer aber recht identisch.

Beim Fehlen des *Gnai2* und *Gnai3* Gens in Thrombozyten bei *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen (Abb. 4 C) konnte wie auch beim alleinigen Fehlen von *Gnai2* ein Unterschied zwischen Kontrolle und *Gnai2/i3*-Defizienz nach der Stimulation mit CRP festgestellt werden. Im Ruhezustand lagen die Werte bei 156,4 zu 194,4 in der Kontrolle. Bei ADP konnte wie bei *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Tieren ein niedriger Wert mit 182,4 in Plättchen-spezifischer *Gnai2/i3*-Defizienz im Vergleich zu 428,4 in den Kontroll-Tieren bestimmt werden. Bei CRP war die statistische Signifikanz mit einem $P \leq 0.05$ durch einen Wert von 5293,9 in Thrombozyten mit *Gnai2/i3*-Defizienz und 6740,6 in Kontrollzellen gegeben. Wie bei dem alleinigen Fehlen von $\text{G}\alpha_{i2}$ oder $\text{G}\alpha_{i3}$ konnte nach U46619 Stimulation ebenfalls ein Anstieg der JON/A-Bindung mit 939,4 zu 444 beim doppelten Fehlen dieser beiden Proteine gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden.

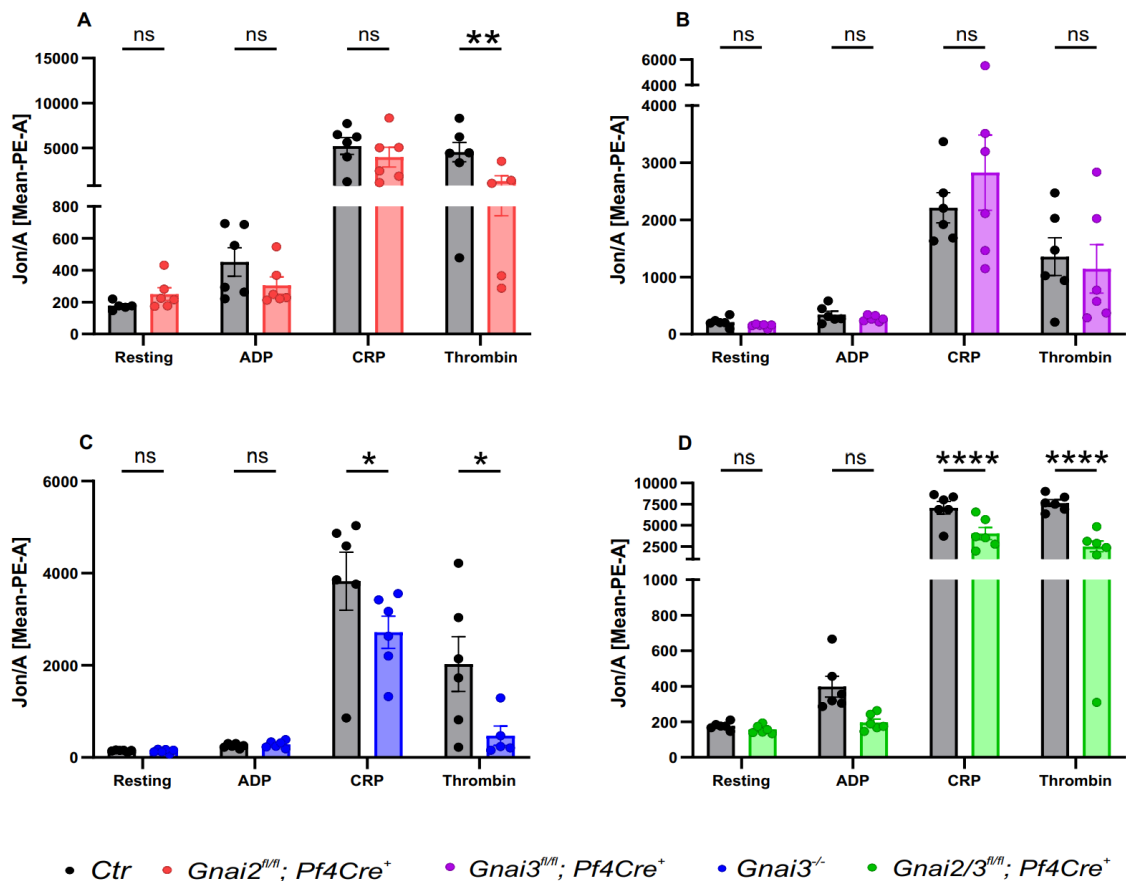


Abb. 5: Bindung von JON/A nach Stimulation bzw. ohne Stimulation in PRP von A) *Gnai2^{fl/fl}*, *Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}*, *Pf4Cre⁺*, C) *Gnai3^{-/-}* und D) *Gnai2/i3^{fl/fl}*, *Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq $P > 0.05$, * \triangleq $P \leq 0.05$, ** \triangleq $P \leq 0.01$, * \triangleq $P \leq 0.001$, **** \triangleq $P \leq 0.0001$.**

Bei der α IIb β 3-Aktivierung auf Plättchen von *Gnai2^{fl/fl}*; *Pf4Cre⁺*-Mäusen und ihrer Kontrollgruppe (Abb. 5 A) gemessen in PRP konnten keine signifikanten Unterschiede bei Ruhe oder bei mit ADP oder CRP stimulierten Thrombozyten festgestellt werden. Bei Thrombin hingegen war die Bindung von JON/A in *Gnai2*-defizienten Thrombozyten mit einem P von ≤ 0.01 signifikant geringer. Im Ruhezustand betrug die ermittelte Mittelwerte der Fluoreszenzantwort 177.6 in der Kontrolle und 250,7 bei *Gnai2*-Defizienz. Bei der Stimulation mit ADP kam es allgemein zu einem Anstieg von aktiviertem α IIb β 3, diese fiel jedoch mit 304,3 zu 452,1 bei den *Gnai2*-defizienten Thrombozyten geringer aus. Bei CRP war der Anstieg der Aktivierung um ein Vielfaches höher. In der Kontrolle war er auch dieses Mal mit 3983,2 zu 5222,5 höher. Die verringerte Aktivierung der Thrombozyten bei Plättchen-spezifischen *Gnai2*-defizienten-Mäusen war wie

bereits erwähnt bei der Stimulation mit Thrombin signifikant geringer. Bei Kontrollzellen wurde eine mittlere Floreszenz von 4548,2 und 1327,2 mit *Gnai2*-Defizienz gemessen.

Beim Vergleich zwischen Plättchen von *Gnai3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen und ihren Kontrollzellen (Abb. 5 B) konnten keine Unterschiede in der Bindung von JON/A festgestellt werden. Unter Ruhe konnte die α IIb β 3-Aktivierung in der Kontrolle mit 211,9 und bei Plättchen-spezifischer *Gnai3*-Defizienz mit 150,1 gemessen werden. Der Anstieg unter ADP-Stimulation erreichte bei Kontrollzellen 342,5 und bei Thrombozyten mit Defizienz 274,3. Bei der JON/A-Bindung unter CRP wurde bei defizienten Plättchen mit 2827 ein höherer Wert als in der Kontrolle mit 2213,2 festgestellt. Bei Thrombin hingegen war sie in der Kontrolle wiederum mit 1357,2 höher als bei Thrombozyten der *Gnai3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen mit 1143,5.

Zwischen *Gnai3^{-/-}* und den entsprechenden *Gnai3^{+/+}* Tieren (Abb. 5 c) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Bindung von JON/A auf ihren Thrombozyten, von $P \leq 0.05$ bei der Stimulation mit CRP und von $P \leq 0.01$ bei Thrombin, festgestellt werden. In Ruhe und bei der Stimulation mit ADP wurde jedoch kein Unterschied festgestellt. Die gemessenen Werte lagen im Mittel im Ruhezustand in der Kontrolle bei 146,3 und bei *Gnai3*-Defizienz bei 137,5. Bei ADP konnten sie mit 251,5 bei Kontrollzellen und 282,3 beim Fehlen von $G\alpha_{i3}$ festgestellt werden. Bei CRP lag dieser bei der Kontrolle mit 3827,5 signifikant höher als mit 2717,7 bei Thrombozyten *Gnai3*-defizienter-Tiere. Bei Thrombin war eine noch größere Differenz von 2027,7 in der Kontrolle zu 473,4 bei *Gnai3*-Defizienz festzustellen.

Bei Thrombozyten von *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen und ihrer Kontrollgruppe (Abb. 5 D) konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Stimulation mit CRP und Thrombin festgestellt werden. Die statistische Auswertung ergab beides mal ein $P \leq 0.0001$. In Ruhe und bei Stimulation mit ADP wurde kein Unterschied festgestellt. In Ruhe waren die ermittelten Werte mit 176,8 bei Zellen der Kontrolltiere zu 156,5 bei *Gnai2/i3*-Defizienz recht identisch. Bei der ADP-Stimulation wurde eine geringere α IIb β 3-Aktivierung in *Gnai2/i3*-defizienten Tieren mit 196,8 zu 397,8 in der Kontrolle festgestellt. Diese war

jedoch noch nicht statistisch signifikant. Bei CRP konnte die geringere Expression bei der Kontrollgruppe mit 4033,3 zu 7079 bei *Gnai2/i3*-Defizienz gemessen werden. Bei Thrombin fiel die Differenz mit 7636,5 in der Kontrolle zu 2508,2 noch deutlicher aus.

4.4 Aktivierung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\Psi_m$) von *Gnai*-defizienten Thrombozyten

Das Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) von Mitochondrien kann durch das Anfärben der Zellen mit positiv geladenen Farbstoffen wie Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) nachgewiesen werden. TMRE emittiert eine rote Fluoreszenz, die mit Hilfe von Durchflusszytometrie erkannt werden kann. Anhand der TMRE-Fluoreszenz lässt sich feststellen, ob die Mitochondrien einer Zelle ein hohes oder niedriges $\Delta\Psi_m$ aufweisen (Crowley, Christensen, and Waterhouse 2016).

Die durch Aktivierung verursachte Depolarisierung der mitochondrialen Membran, dargestellt als TMRE-Fluoreszenzantwort, ist statistisch in keinem Mausstamm mit *Gnai2*- oder *Gnai3*-Defizienz unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Alle Werte befinden sich auch etwa auf demselben Niveau. Nur bei der Kontrolle mit FCCP lässt sich wie erwartet bei allen Mäusen ein drastischer Abfall der Fluoreszenzantwort beobachten.

Im Ruhezustand konnte bei *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Plättchen (Abb. 6 A) eine Fluoreszenzantwort von 323 gemessen werden. Bei der korrespondierenden Kontrollgruppe konnte diese mit 318,5 detektiert werden. Nach der Stimulation mit ADP waren diese leicht höher mit 341 bei *Gnai2*-Defizienz und 328,2 in den Plättchen der Kontrolltiere. Bei der Stimulation mit CRP wurden leicht niedrigere Werte als im Ruhezustand mit 262 bei Plättchen mit Defizienz und 290,5 in der Kontrolle ermittelt. Thrombin brachte eine mittlere Fluoreszenzantwort von 313 in der Kontrollgruppe und 298,3 beim Fehlen von $G\alpha_{i2}$. FCCP brachte das Membranpotential auf ein Niveau, bei dem Werte von 23,1 in der Kontrolle und 23,5 bei *Gnai2*-Defizienz gemessen wurden. Der Apoptose-Induktor Ionomycin brachte große Schwankungen der gemessenen Einzelwerte mit sich und es

stellten sich Mittelwerte von 334,3 bei Kontrollzellen und 295,8 bei Thrombozyten von Plättchen-spezifischen *Gnai2*-defizienten Mäusen ein.

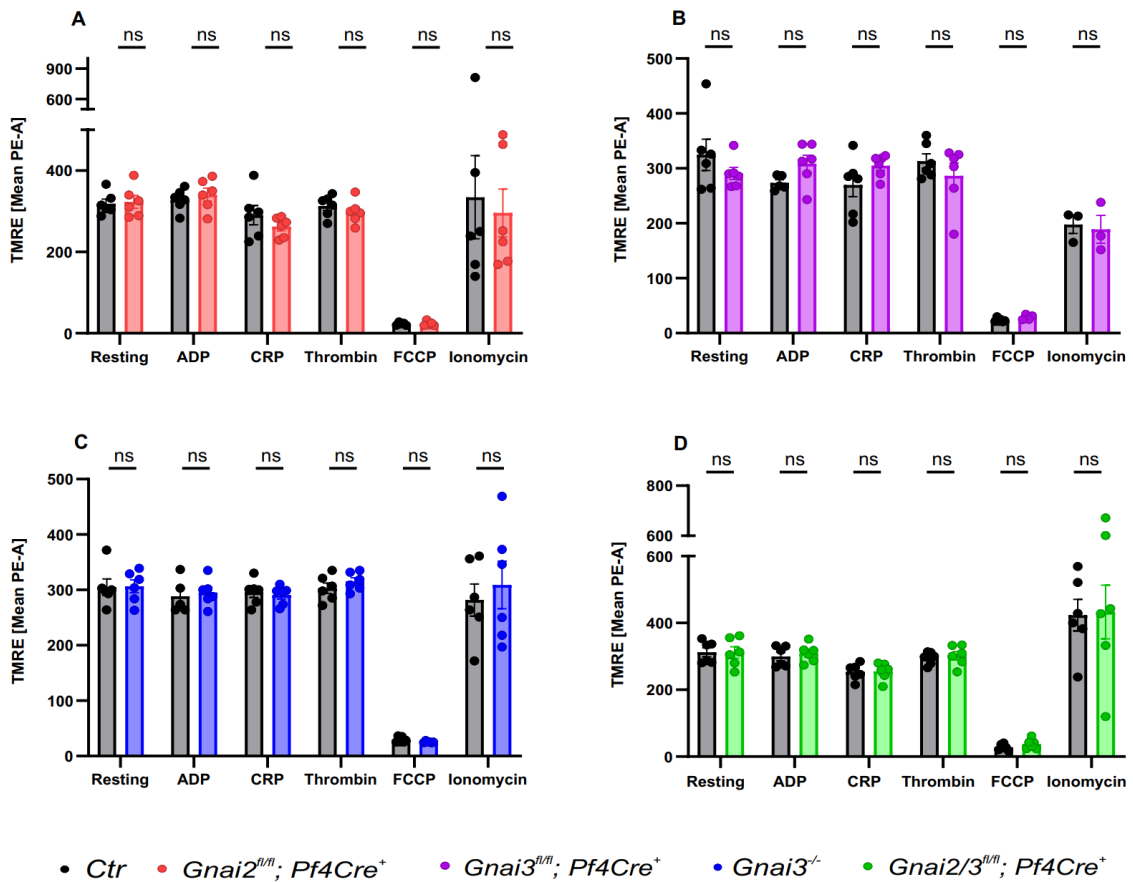


Abb. 6: Depolarisierung der mitochondrialen Membran von Thrombozyten in PRP von A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, C) *Gnai3^{-/-}* und D) *Gnai2/3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq P > 0.05.

Betrachtet man Plättchen aus *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Tieren (Abb. 6 B) sieht man ähnliche Ergebnisse. Ohne Stimulation konnte ein Mittelwert von 324,7 in Thrombozyten von Kontrolltieren und 290,8 bei *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Plättchen gemessen werden. Bei der Stimulation mit ADP stellte sich ein Wert von 273,6 in der Kontrolle und 308,5 bei *Gnai3*-Defizienz ein. Bei CRP waren diese Werte mit 269,7 in der Kontrolle und 304,8 in *Gnai3*-defizienten Thrombozyten recht identisch. Bei Thrombin erhielten wir einen Mittelwert von 313,2 in der Kontrolle und 286,3 bei *Gnai3*-Defizienz. Bei der Stimulation mit FCCP senkten sich erneut die gemessenen Werte der Thrombozyten auf 23,5 bei Kontrolltieren und 28,9

bei *Gnai3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Tieren ab. Unter Zugabe von Ionomycin erhielten wir Werte von 197,7 in der Kontrolle und 189 mit *Gnai3*-Defizienz.

Im globalen KO von *Gnai3* (Abb. 6 C) erhielten wir im Ruhezustand eine Fluoreszenzantwort von 305 in der Kontrollgruppe und 306,3 bei *Gnai3*-Defizienz. Bei Stimulation mit ADP und CRP waren diese Werte etwas geringer. ADP ergab bei Kontrolltieren einen Mittelwert von 288,4 und 295 bei *Gnai3*-KO. Bei der Inkubation mit CRP stellten sich Werte von 295,8 in der Kontrolle und 290,5 bei *Gnai3*-Defizienz ein. Bei Thrombin war der Mittelwert, mit 303 in der Kontrolle und 315,2 beim Fehlen von $G\alpha_{i3}$, etwas höher. FCCP senkt die Werte wieder auf 29,4 in der Kontrolle und 25,5 bei *Gnai3*-Defizienz. Ionomycin ergibt mit einer recht großen Streuung einen Durchschnittswert von 281,8 in der Kontrolle und 308,8 mit *Gnai3*-Defizienz.

Thrombozyten der *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Mäuse (Abb. 6 D) zeigten in Ruhe eine TMRE-Fluoreszenzantwort von 311,5. Ihre Kontrollgruppe ergab hierbei einen Wert von 312,3. Die Zugabe von ADP brachte einen Wert von 299,5 in der Kontrolle und 309,3 bei Thrombozyten mit *Gnai2/i3*-Defizienz. Die Durchschnittswerte nach CRP-Stimulation fielen wiederum etwas geringer mit 253,5 in der Kontrolle und 255,3 bei *Gnai2/i3*-defizienten-Plättchen aus. Thrombin führte in Kontrollplättchen zu Werten von 294,8 und 302,3 bei *Gnai2/i3*-Defizienz. Ein Abfall der TMRE-Fluoreszenzantwort auf 28,2 in der Kontrolle und 37,5 bei Fehlen von $G\alpha_{i2/i3}$ wurde durch FCCP ausgelöst. Ionomycin brachte erhöhte Werte von 423,3 in der Kontrollgruppe und 432,8 bei *Gnai2/i3*-Defizienz mit einer erhöhten Streuung mit sich.

4.5 Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von *Gnai*-defizienten Thrombozyten

Die Freisetzung von Phosphatidylserin (PS) während der Apoptose kann mit Hilfe von AnnexinV detektiert werden. AnnexinV bindet mit sehr hoher Affinität an anionische Phospholipide und damit an Phosphatidylserin. AnnexinV dient somit

als Apoptosemarker und kann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Ramstrom et al. 2010; Tait, Smith, and Wood 1999).

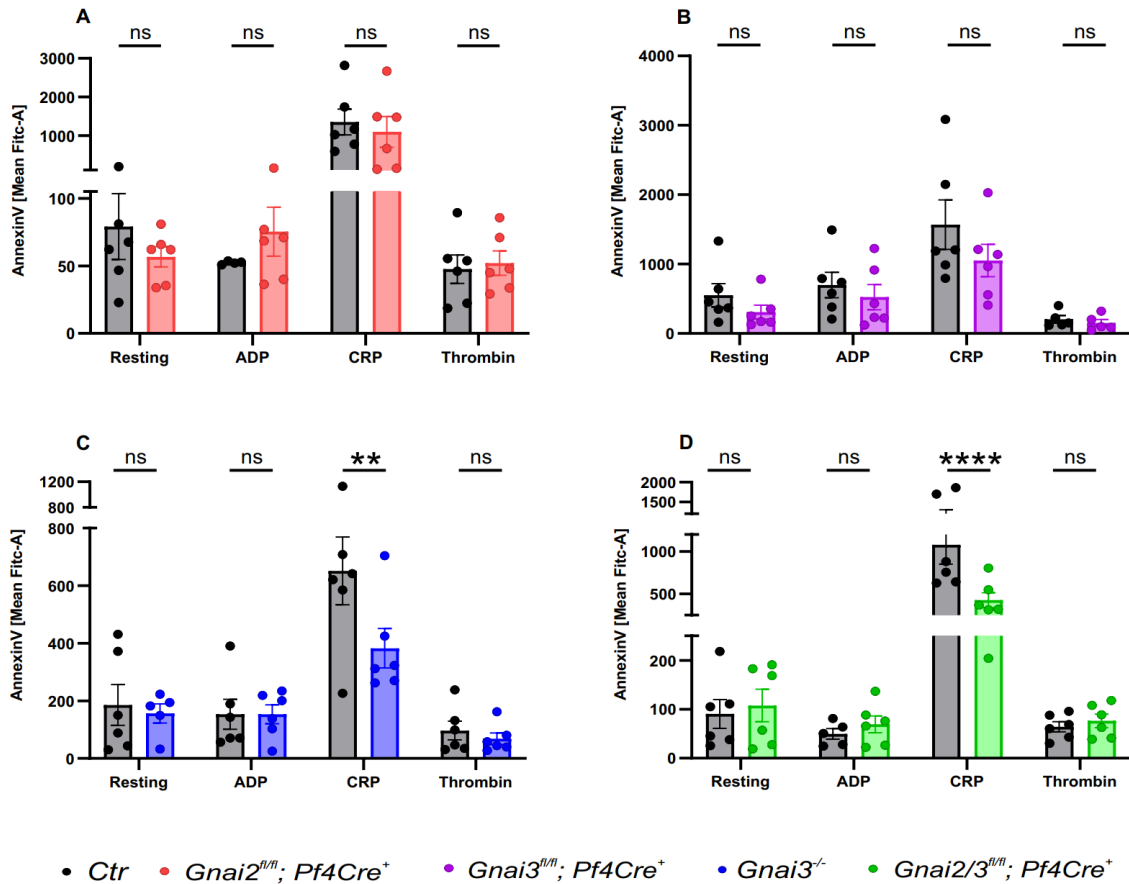


Abb. 7: Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von Thrombozyten in PRP aus A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, C) *Gnai3^{-/-}* und D) *Gnai2/3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq $P > 0.05$, ** \triangleq $P \leq 0.01$, ** \triangleq $P \leq 0.0001$.**

In allen Mausstämmen lässt sich ein in etwa gleiches Niveau der AnnexinV-Bindung an Thrombozyten in Ruhe, nach Stimulation mit ADP und nach Stimulation mit Thrombin erkennen. Die Zugabe von CRP hingegen bewirkt einen deutlichen Anstieg der Phosphatidylserin Freisetzung.

Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Plättchen (Abb. 7 A) zeigen in der Fluoreszenzantwort der AnnexinV-Bindung unter Ruhe einen Wert von 56,7 und in der Kontrollgruppe liegt dieser bei 79,1. Nach ADP-Stimulation liegt der Mittelwert in der

Kontrollgruppe bei 52,3 und 75,3 bei Plättchen mit *Gnai2*-Defizienz. Bei CRP kommt es zu einem deutlichen Anstieg der AnnexinV-Bindung auf 1353 bei Plättchen aus Kontrolltieren und 1095,3 bei *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Plättchen. Dieser Unterschied zwischen Kontrolle und *Gnai2*-Defizienz ist jedoch aufgrund der Streuung statistisch nicht signifikant. Unter Thrombin liegen die gemessenen Werte in der Kontrolle bei 47,6 und bei 52,1 ohne Gα₁₂.

Beim Vergleich der Thrombozyten der *Gnai3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Mäuse mit ihren Kontrolltieren (Abb. 7 B) lassen sich erneut keine Signifikanzen erkennen. In Ruhe konnte eine Antwort von 550,5 in der Kontrollgruppe und 307,8 bei *Gnai3*-Defizienz gemessen werden. Unter Zugabe von ADP stieg der Wert in der Kontrolle auf 698,1 und 524,7 bei Plättchen-spezifischer *Gnai3*-Defizienz an. Nach Stimulation mit CRP kommt es zu einem Anstieg auf 1568,5 in der Kontrollgruppe und 1051,3 bei *Gnai3*-defizienten-Plättchen. Hier ist eine geringere Phosphatidylserin Freisetzung im KO zu erkennen, die allerdings statistisch nicht signifikant ist. Unter Thrombin wurden die geringsten Werte mit 204,4 in der Kontrolle und 152,2 mit *Gnai3*-Defizienz gemessen.

Bei der Gegenüberstellung von Plättchen globaler *Gnai3*-KO-Mäuse (*Gnai3*^{-/-}) zu Plättchen von *Gnai3*-Kontroll-Mäusen (*Gnai3*^{+/+}) (Abb. 7 C) konnte ein signifikanter Unterschied in der AnnexinV-Bindung nach der Stimulation mit CRP festgestellt werden. Im Ruhezustand war der durchschnittlich gemessene Wert bei Kontrollzellen 185,8 und 156,2 bei *Gnai3*-Defizienz. Unter dem Einfluss der ADP-Stimulation konnten zwischen Kontrolle und Defizienz fast identische Werte mit 153,3 zu 153,4 ermittelt werden. Die Inkubation mit CRP bewirkte ein Anstieg der Fluoreszenzantwort auf 651,7 in der Kontrolle und 382,7 mit *Gnai3*-Defizienz. Die Differenz konnte mit einem $P \leq 0.01$ ermittelt werden. Unter Thrombin wurden wieder die geringsten Werte mit 96,9 bei Kontrollmäusen und 68,7 bei Fehlen von Gα₁₃ gemessen.

Die AnnexinV-Bindung an Thrombozyten der *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Mäuse (Abb. 7 D) bewirkte eine gemessene durchschnittliche Fluoreszenzantwort unter Ruhe von 107,8. In der Kontrollgruppe lag diese bei 90,5. Nach der Stimulation mit ADP verringerte sie sich auf 49,7 in der Kontrolle und 69,3 bei *Gnai2/3*-Defizienz. Bei

der Inkubation mit CRP konnte zwischen Kontrolle und *Gnai2/i3*-defizienten Plättchen eine statistische Signifikanz mit einem $P \leq 0.0001$ ermittelt werden. Die Werte lagen bei der Kontrolle bei 1078,5 und bei defizienten-Plättchen mit 426,5 um mehr als die Hälfte geringer. Thrombin erbrachte Werte von 64,4 in der Kontrolle und 76,3 bei *Gnai2/i3*-Defizienz.

4.6 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten

CD45 ist eine Rezeptorprotein-Tyrosinphosphatase, die ausschließlich auf allen Zellen des blutbildenden Systems vorkommt (Rheinländer, Schraven, and Bommhardt 2018). Durch diese Eigenschaft können wir mit einem Antikörper gegen dieses Protein im Durchflusszytometer Leukozyten markieren und gaten. Der Ly6G/Ly6C-Marker dient zur Identifizierung von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Untergruppen von Monozyten/Makrophagen, wobei verhältnismäßig Neutrophile in der absoluten Mehrheit sind (Rose, Misharin, and Perlman 2012). Durch die spezifische Expression dieser Proteine ist es uns möglich eine Differenzierung der Bildung von Plättchen-Neutrophil-Komplexen (PNCs) dieser Zellgruppen vorzunehmen.

In allen Mausstämmen lässt sich ein in etwa gleiches Niveau der Komplexbildung zwischen Thrombozyten und Neutrophilen in Ruhe, unter der Stimulation mit ADP, unter der Stimulation mit Thrombin und unter der Stimulation mit U46619 messen. Unter der Zugabe von CRP lässt sich ein Anstieg der Komplexbildung erkennen, der beim Fehlen von *Gnai2* nicht ganz so deutlich ausfällt.

Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Plättchen (Abb. 8 A) zeigen in Ruhe eine Komplexbildung mit Ly6G⁺-Zellen von 1,9%, in der Kontrollgruppe liegt dieser bei 1,6%. Unter ADP-Stimulation liegt der Anteil in der Kontrollgruppe bei 2,1% und 2,4% bei Plättchen mit *Gnai2*-Defizienz. Bei CRP kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Komplexbildung auf 88,5% bei Kontrolltieren und 70,6% bei *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen. Dieser Unterschied zwischen Kontrolle und *Gnai2*-Defizienz ist mit einem $P \leq 0.0001$ signifikant. Bei Thrombin liegen die gemessenen Werte in der

Kontrolle bei 2,3% und 1,9% ohne $G\alpha_{i2}$. U46619 bewirkt ebenfalls keinen Anstieg der Komplexbildung mit 1,9% in der Kontrolle und 2,1% bei Thrombozyten mit *Gnai2*-Defizienz.

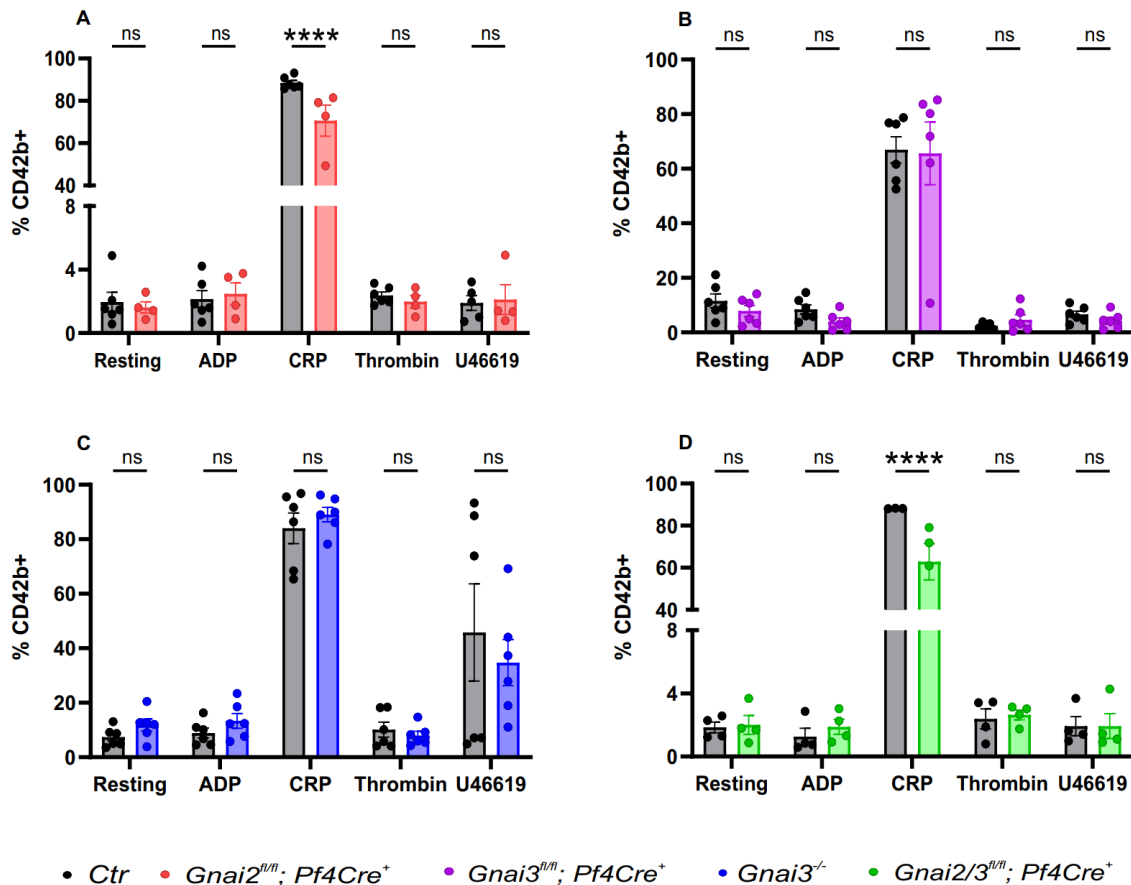


Abb. 8: Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten von A) *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, B) *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺*, C) *Gnai3^{-/-}* und D) *Gnai2/i3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Sternchen kennzeichnen die statistische Signifikanz: ns \triangleq $P > 0.05$, **** \triangleq $P \leq 0.0001$.

Beim Vergleich der *Gnai3^{fl/fl}; Pf4Cre⁺* Plättchen mit ihrer Kontrollgruppe (Abb. 8 B) lassen sich keine Signifikanzen erkennen. In Ruhe konnten PNCs von 11,6% in der Kontrollgruppe und 7,8% bei *Gnai3*-Defizienz gemessen werden. Unter Zugabe von ADP wurde der Wert in der Kontrolle mit 8,4% und 4% bei Plättchenspezifischer *Gnai3*-Defizienz ermittelt. Der Anstieg nach CRP-Stimulation auf 66,9% in der Kontrollgruppe und 65,6% bei Vollblut von *Gnai3*-defizienten-Mäusen ist die Komplexbildung auf einem etwa gleichen Niveau zu erkennen. Unter Thrombin wurden wieder geringere Werte mit 2,4% in der Kontrolle und 2%

mit *Gnai3*-Defizienz gemessen. U46619 kann ebenfalls kein Anstieg der Komplexbildung mit 6,6% in der Kontrolle und 4,3% bei Thrombozyten mit Gendefizienz bewirken.

Bei der Gegenüberstellung globaler *Gnai3*-KO-Mäuse (*Gnai3*^{-/-}) zu *Gnai3*-Kontroll-Mäusen (*Gnai3*^{+/+}) (Abb. 8 C) konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied in der Komplexbildung mit Gendefizienz und Kontrolle festgestellt werden. Allerdings war das Level der Komplexbildung unter CRP-Einfluss etwas höher und auch nach der Stimulation mit U46619 konnte ein Anstieg der PNC-Bildung beobachtet werden. Im Ruhezustand war der durchschnittlich ermittelte Wert in der Kontrollgruppe 7,4% und 11,8% bei *Gnai3*-Defizienz. Unter dem Einfluss von ADP bildeten sich in der Kontrollgruppe 8,9% und bei globalem Fehlen von $G\alpha_{i3}$ 13,3% PNCs. Die Inkubation mit CRP bewirkte eine Komplexbildung von 84% in der Kontrolle und 89% mit *Gnai3*-Defizienz. Unter Thrombin wurden wieder Werte auf dem Niveau in Ruhe mit 10,1% bei Kontrollmäusen und 8% bei Fehlen von $G\alpha_{i3}$ gemessen. Das Thromboxanalog U46619 bewirkte bei globaler *Gnai3*-Defizienz eine Komplexbildung von 35% allerdings auch bei der entsprechenden Kontrolle einen noch höheren Anstieg der PNC-Bildung von 45%. Trotz dieser Differenz konnte wegen der doch verglichen größeren Streuung keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Die Komplexbildung der Thrombozyten der *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Mäuse mit Neutrophilen (Abb. 8 D) verhält sich recht ähnlich, zu der von *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺ Mäusen. Unter ruhenden Konditionen bildeten sich 2% PNCs. In der Kontrollgruppe waren es 1,8%. Nach der Stimulation mit ADP bildeten sich 1,3% PNCs in der Kontrolle und 1,9% bei *Gnai2/3*-Defizienz. CRP bewirkt wiederholt eine starke Komplexbildung von 88,1% in der Kontrollgruppe und bei *Gnai2/i3*-defizienten Plättchen von 62,8%. Diese Differenz zeigte eine statistische Signifikanz von $P \leq 0.0001$. Thrombin erbrachte Werte von 2,4% in der Kontrolle und 2% bei *Gnai2/i3*-Defizienz. Bei U46619 waren diese mit 1,9% in der Kontrolle und bei den Gen-defizienten Plättchen identisch.

5 Diskussion

5.1 Oberflächenexpression von GPV, GPVI, GPIX, $\alpha 5$, $\beta 3$ auf ruhenden Thrombozyten

Die Untersuchung der Expressionslevel der Oberflächenproteine GPV, GPVI, GPIX, $\alpha 5$ und $\beta 3$ zeigte nur bei der Expression von $\beta 3$ in *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen eine statistische Signifikanz. Diese ist jedoch auf zwei etwas niedrigere Einzelwerte in der Kontrollgruppe zurückzuführen, die statistisch durch ein zu kleines N nicht als Ausreißer erkannt wurden. Vor der statistischen Vergleichsanalyse der *Gnai2/i3^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäuse hat sich ebenfalls ein Wert auf diesem Fluoreszenzniveau befunden, der jedoch als Ausreißer ermittelt und dementsprechend nicht mehr in die weitere Analyse mit einbezogen wurde.

GPV und GPIX liegen auf der Zellmembran im GPIb/IX/V Komplex mit durchschnittlich 36.000 Molekülen pro Thrombozyten vor. Das Verhältnis von GPV zu GPIX ist 1:2 (Zeiler, Moser, and Mann 2014). In der Theorie müssten sich also doppelt so viele GPIX Antikörper wie GPV Antikörper an die Thrombozyten binden. Bei GPV war die Fluoreszenzantwort bei Werten zwischen 846 und 972. Bei GPIX lag sie zwischen 6980 und 7456. Damit war ihre Antwort etwa 7- bis 8-mal höher. Dies kann verschiedenste Gründe haben. Neben unterschiedlich guter Bindungsaffinität oder Fluoreszenz der Antikörper ist ebenfalls möglich, dass der CD42b Antikörper, der ebenfalls an den GPIb/IX/V Komplex bindet, einen Einfluss auf die Bindung der in der Probe ebenfalls vorhandenen Antikörper hat. Letztendlich sind dies nur Spekulationen und es wurde kein Unterschied des Expressionslevels dieser beiden Membranproteine beim Fehlen von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ festgestellt. Das Expressionslevel von GPV und GPIX in globalem $G\alpha_{i3}$ und plättchenspezifischem $G\alpha_{i2}$ wurde ebenfalls schon von Devanathan et al. untersucht, wobei auch keine Unterschiede durch $G\alpha_i$ -Defizienzen festgestellt wurden (Devanathan et al. 2015).

GPVI ist mit 19.700 Proteinkopien etwas weniger als GPV in/auf Thrombozyten vertreten (Zeiler, Moser, and Mann 2014). Dennoch konnte ein etwas größerer Fluoreszenzwert gemessen werden. Dies unterstützt zusätzlich die Hypothese der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, könnte allerdings auch dem

unterschiedlichen Verhältnis zwischen Expression auf der Zellmembran und der Speicherung in weiteren Zellbestandteilen liegen. Aber auch bei GPVI konnten keine Differenzen der einzelnen $G\alpha_{i2/i3}$ -Defizienzen und ihren Kontrollgruppen, und einer damit einhergehenden unterschiedlichen Bindungsfähigkeit an Kollagen detektiert werden.

Das Protein $\alpha 5$ ist Teil des Integrins $\alpha 5\beta 1$ und übernimmt damit eine Aufgabe bei der Bindung an Fibronectin (Huang et al. 2019). Dies ist ein sehr wichtiger Schritt bei der Ausbildung des weißen Thrombus und damit ein Schlüsselschritt bei der Blutgerinnung. $\beta 3$ ist Teil der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$, die in etwa in einem Verhältnis von 1:200, mit etwa 130.000 $\beta 3$ -Einheiten pro Thrombozyt vorkommen. Diese sind ebenfalls bei der Bindung an Fibronectin beteiligt (Zeiler, Moser, and Mann 2014). Diese wichtige Funktion konnte somit, als Ansatz der verlängerten Blutungszeit beim Fehlen von *Gnai2* mit diesem Experiment widerlegt werden.

Devanathan et al. untersuchten ebenfalls die Expression von GPV, GPVI, GPIX und $\beta 3$ auf Thrombozyten von *Gnai3*^{-/-} Mäusen, sowie die Expression von GPV, GPIX und $\beta 3$ auf Thrombozyten von *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen. Ihre Resultate decken sich mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen (Devanathan et al. 2015).

5.2 Bestimmung der Aktivierung von $\alpha IIb\beta 3$, gekennzeichnet durch die Bindung von JON/A

Die Expression von aktiviertem $\alpha IIb\beta 3$ wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen getestet. Zum einen wurden die Thrombozyten von *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen, *Gnai3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen, globalen *Gnai3*^{-/-} Mäusen und *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen aus PRP und die Thrombozyten von *Gnai2*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen, *Gnai3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen und *Gnai2/i3*^{fl/fl}; Pf4Cre⁺-Mäusen aus dem Vollblut untersucht. Diese wurden jeweils mit ihren korrespondierenden WT-Zellen verglichen. In den beiden Versuchsansätzen kam es zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Thrombozyten von *Gnai2^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen wurden bereits bei Devanathan et al. untersucht (Devanathan et al. 2015). In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten kam es in beiden Fällen (Vollblut und PRP) durch die Inkubation mit ADP im WT im Vergleich zum Ruhezustand zu einem Anstieg von aktiviertem α IIb β 3 auf Thrombozyten. Der Anstieg von aktiviertem α IIb β 3 spiegelt den Aktivierungsgrad der Thrombozyten wieder. Im KO war dieser Anstieg nur sehr schwach. Dies wurde ebenfalls von Devanathan et al. beschrieben (Devanathan et al. 2015). Der Unterschied der JON/A-Bindung zwischen *Gnai2*-Defizienz und Kontrolle lässt sich in unserem Fall statistisch leider nicht bestätigen. ADP aktiviert Plättchen, wie bereits beschrieben über die P2Y12- und P2Y1-Rezeptoren. Der P2Y12 ist an G α _{i2} gekoppelt. Die Aktivierung kann also nicht wie gewohnt über diesen stattfinden und es kommt zu einer geringeren Sekretion der α -Granula und dem Übergang von bereits exprimierten inaktiven α IIb β 3 in aktives α IIb β 3. Dieses Phänomen könnte mit ein Grund für die verlängerte Blutungszeit bei *Gnai2^{fl/fl}*; Pf4Cre⁺-Mäusen sein (Devanathan et al. 2015). Bei einem Fehlen von G α _{i3} ist die Expression von aktiviertem α IIb β 3 zwischen WT und KO identisch. Es kommt bei dem globalen (wie auch bei Devanathan et al. beschrieben) und bei der Plättchen-spezifischen *Gnai3*-Defizienz zu einem Anstieg der Expression (Devanathan et al. 2015). Allerdings ist bei dem Mausstamm mit dem Plättchen-spezifischen KO die Bindung von JON/A allgemein etwas geringer. Dies zeigt die genetische Variabilität zwischen den Mausstämmen auf, obwohl die Megakaryozyten und damit die Thrombozyten theoretisch das gleiche genetische Material tragen sollten. Bei dem doppelten KO von G α _{i2} und G α _{i3} reagierten die Thrombozyten wie nach ADP-Stimulation von singulären G α _{i2} KO. Die Aktivierung der Thrombozyten ist wie beschrieben nicht über den P2Y12-Rezeptor möglich. Zwischen den Thrombozyten in PRP und verdünntem Vollblut war im Ruhezustand und nach ADP-Stimulation kein Unterschied zu erkennen.

Betrachtet man die Aktivierung unter CRP kommt es zu Unterschieden zwischen den verschiedenen Kontrolltieren und den jeweiligen genetischen Defizienzen, sowie zwischen den einzelnen Stämmen untereinander. In PRP konnte man keinen Unterschied in der Expression von aktiviertem α IIb β 3 bei G α _{i2} im Vergleich

zum WT erkennen. In Vollblut hingegen konnte nach Aktivierung eine höhere Expression gemessen werden. Dies ist womöglich auf weitere im PRP nicht mehr vorhandene Blutbestandteile, wahrscheinlicher aber auf die große Streuung der Einzelwerte zurückzuführen. Um diesen Unterschied zu bestätigen bzw. auszuräumen, müsste man noch weitere Tiere untersuchen. Bei Devanathan et al. wurde unter CRP ebenfalls ein starker Anstieg beschrieben (Devanathan et al. 2015). Jedoch war bei Gen-Defizienz die JON/A-Bindung geringer als bei der Kontrollgruppe (Devanathan et al. 2015). Dies stützt die These, dass für genauere Ergebnisse die N-Zahl bei einer großen Streuung erhöht werden muss. Die Versuchsansätze in dieser Arbeit brachten ebenfalls bei PRP eine zur Kontrolle identische und in Vollblut höhere gemessene JON/A-Bindung. Dies kann vielfältige Gründe haben. Über die unterschiedliche Inkubationszeit, die Messung in PRP bzw. Vollblut und isolierten Thrombozyten (Devanathan) oder auch eine etwas andere Durchführung. Bei einer Plättchen-spezifischen Defizienz von $G\alpha_{i3}$ in PRP ist, zwar nicht statistisch bestätigt, aber ebenfalls eine stärkere Aktivierung als in der Kontrolle zu erkennen. Im Vollblut ist sie allerdings wieder auf demselben Niveau. Bei Tieren mit globaler Defizienz von $G\alpha_{i3}$ wurde nur das PRP untersucht. Die Plättchen exprimierten im Gegensatz zum Plättchen-spezifischen KO nach Stimulation mit CRP weniger aktiviertes $\alpha IIb\beta 3$ auf ihrer Oberfläche als ihre korrespondierenden WT-Plättchen. Die Streuung ist in etwa identisch und bewegt sich auf zwei unterschiedlichen Expressionsniveaus, was auf eine Auswirkung des Fehlens von $G\alpha_{i3}$ bei globalem KO schließen lässt. Devanathan et al. konnte ebenfalls diesen leichten Unterschied zwischen globaler $G\alpha_{i3}$ -Defizienz und Kontrollgruppe feststellen (Devanathan et al. 2015). Interessanterweise konnten auch in weiteren funktionellen Untersuchungen, die von Patrick Rieker mit Thrombozyten aus globalem und Plättchen-spezifischem KO durchgeführt wurden, Unterschiede in mitochondrialen Funktionen der Plättchen festgestellt werden (Patrick Rieker, 2023). Daher sollte in Zukunft die Stimulation mit CRP auf die Aktivierbarkeit von $\alpha IIb\beta 3$ detaillierter und auch in Vollblut untersucht werden. Bei Plättchen-spezifischer Defizienz von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ führte das Fehlen beider Proteine zu einer deutlich schwächeren Bindung von JON/A bzw. einer $\alpha IIb\beta 3$ -Aktivierung der

Thrombozyten. Nachdem die geringere Aktivierung nun auch bei globaler Defizienz zu beobachten war, liegt die Vermutung nahe, dass dies auf das Fehlen von $G\alpha_{i3}$ zurückzuführen ist. Wieso diese im Plättchen-spezifischen KO nicht ausgeprägt ist, lässt sich im Moment nicht klären. Eine Hypothese wäre, dass in dieser Mauslinie das Fehlen dieses Proteins über andere Signalwege, eventuell ausgelöst durch das alleinige Fehlen in Megakaryozyten/Plättchen, teilweise kompensiert wird.

Die Wirkung von Thrombin auf die Aktivierung von $\alpha IIb\beta 3$ wurde nur in PRP untersucht. Diese ergab recht eindeutige Ergebnisse. In allen untersuchten Thrombozyten mit *Gnai2*- und / oder *Gnai3*-Defizienz war die Expression von aktiviertem $\alpha IIb\beta 3$ nicht so hoch wie in den Kontrollgruppen. Dieser leichte Unterschied wurde ebenfalls von Devanathan et al. in globalen *Gnai3*^{-/-} und *Gnai2*^{fl/fl}; *Pf4Cre*⁺ beschrieben (Devanathan et al. 2015). Bei Plättchen-spezifischer *Gnai3*-Defizienz konnte der Unterschied zum WT nicht beobachtet werden, was die Hypothese stützt, dass dort das Fehlen von $G\alpha_{i3}$ besser kompensiert wird.

Das Thromboxanalog U46619 erzeugte eine in etwa gleich starke Aktivierung von $\alpha IIb\beta 3$ wie ADP. Allerdings gab es keine Unterschiede zwischen Kontrolle und den einzelnen Mäusen mit *Gnai2* und/ oder *Gnai3*-Defizienzen. $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ haben folgernd keinen Einfluss auf den Aktivierungsweg von U46619 (vgl. Devanathan et al.).

Die schwächere Aktivierung der Plättchen aller Mausstämme durch die verschiedenen Stimulanzen kann ein Grund für die geringeren Gewebsschädigungen nach einem induzierten Herzinfarkt oder Schlaganfall sein, da wie bei Devanathan et al. beschrieben frühe Schritte der Aktivierung ausschlaggebend für das Ausmaß der Gewebsschädigung sind (Devanathan et al. 2015).

5.3 Die Degranulation von α -Granula, gekennzeichnet durch die Oberflächenexpression von CD62P

Die Veränderung der Expression von P-Selektin auf der Zellmembran der Thrombozyten nach Stimulation sollte sich in der Theorie ähnlich bis gleich, wie die von α IIb β 3 verhalten. Beide sind in den α -Granula enthalten und werden nach Aktivierung vermehrt auf der Zellmembran exprimiert. Allerdings bindet JON/A nur an aktiviertes α IIb β 3. Da CD62P wie α IIb β 3 parallel in Vollblut mit den gleichen Tieren und Stimulanzen untersucht wurde, lässt sich vergleichen, ob in der Theorie nach der Exozytose von α -Granula die CD62P-Anzahl, zur aktivierten Form von α IIb β 3 im Verhältnis steht. In vorangegangenen Studien wurde die Anzahl, die sich von gewissen Proteinkopien in murinen Plättchen befinden untersucht. Von α IIb β 3 befinden sich in etwa 120.000 Kopien in einem Thrombozyten. Bei P-Selektin liegt die Anzahl bei 42.200 und ist damit etwa drei Mal weniger vorhanden (Zeiler, Moser, and Mann 2014). Außerdem wird P-Selektin bei ruhenden Plättchen so gut wie nicht auf der Zellmembran exprimiert und nur nach Aktivierung durch die α -Granula freigegeben (Berger, Hartwell, and Wagner 1998).

Wie zu erwarten konnte im Ruhezustand in Plättchen-spezifischen Einzel- und Doppel-KO eine sehr geringe P-Selektin Expression gemessen werden. Nach der Aktivierung mit ADP würde man im WT und dem alleinigen Fehlen von $G\alpha_{i3}$ einen Anstieg in der Expression erwarten. Dieser war jedoch nicht zu messen bzw. nur minimal. Bei $G\alpha_{i2}$ -Defizienz befanden sich die Werte auf demselben Niveau wie die Kontrollen, wie bereits beschrieben (Devanathan et al. 2015). Interessanterweise war die P-Selektin Expression auf $Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre^{+}$ -Plättchen höher als auf WT-Zellen. Allerdings war dies ebenfalls schon im Ruhezustand zu beobachten.

Bei der Stimulation mit CRP konnte ein deutlicher Anstieg der CD62P Expression beobachtet werden. Hierbei ist die Verteilung der Einzelwerte in etwa mit denen von JON/A zu vergleichen. Bei den $Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre^{+}$ -Tieren wurde eine statistisch signifikant höhere Expression als in der Kontrolle gemessen. Dies könnte wie schon bei JON/A beschrieben vielfältige Gründe haben. In diesem Fall vermutlich an den zwei niedrigeren Einzelwerten in der Kontrollgruppe und

dies deckt sich auch nicht mit den Ergebnissen von Devanathan et al. (Devanathan et al. 2015). Nach meiner Vermutung ist dies wie bereits erwähnt ein Phänomen der erhöhten Streuung. Bei *Gnai2/i3*-Defizienz lässt sich im Verhältnis zum WT eine leicht höhere Expression als bei JON/A erkennen. Allerdings sind die Streuung und die Verteilung der Einzelwerte recht identisch. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Aktivierungsreaktion in den Proben bei zeitgleicher Durchführung, identisch stark abgelaufen ist.

Nach Aktivierung mit U46619 konnte keine stärkere Expression von P-Selektin und auch statistisch kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mäusen mit $G\alpha_{i2}$ - und/oder $G\alpha_{i3}$ -Defizienz festgestellt werden. Nur die Thrombozyten mit dem singulären Fehlen von $G\alpha_{i2}$ exprimierten etwa vier Mal so viel P-Selektin wie die korrespondierenden WT-Zellen. Bei JON/A und P-Selektin konnte insgesamt eine etwas stärkere Expression in Vollblut, als bei den korrespondierenden WT-Zellen beobachtet werden. Wenn wir die Reaktion in PRP mit JON/A betrachten, konnte diese Veränderung jedoch nicht beobachtet werden. Auch in den Experimenten von Devanathan et al. konnte insbesondere die höhere CD62P Expression bei *Gnai2^{fl/fl}; Pf4Cre+* Tieren nach U-46619 Stimulation nicht beobachtet werden (Devanathan et al. 2015).

5.4 Aktivierung der Depolarisierung der mitochondrialen Membran ($\Delta\psi_m$) der *Gnai*-defizienten Thrombozyten

Der positiv geladene Farbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) zeigt durch die Intensität seiner Färbung die Höhe des mitochondrialen Membranpotentials an (Crowley, Christensen, and Waterhouse 2016). Die Energieversorgung der Mitochondrien hängt von einem chemiosmotischen Gradienten ab, der über ihre innere Membran aufrechterhalten wird. Dieser Gradient, auch bekannt als protonenmotorische Kraft, entsteht durch drei Enzymkomplexe, die während der Elektronentransportkette Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum pumpen. Die protonenmotorische Kraft besteht aus zwei Komponenten: 1. dem Membranpotential und 2. dem pH-Gradienten. Das Membranpotential, das durch

die Bewegung von positiven Ladungen über die innere Membran entsteht, trägt dabei den größten Teil der Energie mit etwa 150 mV. Deshalb kann das mitochondriale Membranpotential als praktischer Indikator für den Energiezustand der Mitochondrien verwendet werden (Mathur 2000; Skárka and Ostádal 2002).

Veränderungen im Membranpotential der Mitochondrien sind entscheidend für den Übergang zwischen Zelleben und Zelltod, obwohl noch unklar ist, ob diese Veränderungen die primäre Ursache oder eine sekundäre Folge sind. Im normalen Zellbetrieb ist die Aufrechterhaltung des Membranpotentials essenziell für die ATP-Synthese, die über die Atmungskette läuft. Das Membranpotential liefert auch durch den Ca^{2+} -Uniporter die treibende Kraft für die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien. Es wird angenommen, dass das Ca^{2+} -Signal in den Mitochondrien die ATP-Produktion anregt, um auf einen erhöhten Energiebedarf der Zelle zu reagieren (Hansford and Zorov 1998).

Die große Bedeutung dieses Vorgangs in der Zelle ergibt ebenfalls ein großes Interesse, ob es Unterschiede in diesem bei Fehlen der einzelnen $\text{G}\alpha_i$ Proteine gibt. Jedoch konnten keine Unterschiede sowohl bei *Gnai2^{fl/fl};Pf4Cre⁺*, *Gnai3^{fl/fl};Pf4Cre⁺*, *Gnai3^{-/-}*, *Gnai2/3^{fl/fl};Pf4Cre⁺* und ihren jeweiligen Kontrollen festgestellt werden. Nach Inkubation mit den Stimulanzen ADP, CRP und Thrombin konnte nicht nur kein Unterschied zwischen Kontrolle und Gen-Defizienz festgestellt werden, auch waren bei der Fluoreszenzantwort im Verhältnis zum Ruhezustand nur minimale Schwankungen feststellbar. FCCP wirkte als Positivkontrolle und bewirkte immer einen Abfall des Membranpotentials. Ionomycin als Initiator der Apoptose ergab eine große Schwankung der Einzelwerte, wobei auch keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen und ihren Kontrollen erkannt werden konnten. Letztendlich konnten keine Auswirkungen durch das Plättchen-spezifische Fehlen von $\text{G}\alpha_{i2}$, $\text{G}\alpha_{i3}$ oder von $\text{G}\alpha_{i2/i3}$, sowie des globalen Fehlens von $\text{G}\alpha_{i3}$ auf das mitochondriale Membranpotential festgestellt werden.

5.5 Aktivierung der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bindung von AnnexinV) an der Oberfläche von *Gnai*-defizienten Thrombozyten

Mit der Bindung von AnnexinV an Thrombozyten wird die Phosphatidylserin-Menge auf der äußeren Zellmembran nachgewiesen. Phosphatidylserin ist ein negativ geladenes Phospholipid, das sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befindet und eine wichtige Rolle bei verschiedenen Zellfunktionen spielt (Schroit and Zwaal 1991; Tait, Smith, and Wood 1999; Ramstrom et al. 2010). Bei Thrombozyten wird Phosphatidylserin im Aktivierungszustand verstärkt auf die äußere Zellmembran freigesetzt, was ein wesentlicher Teil der normalen Gerinnungsreaktion ist. Die Präsenz von Phosphatidylserin auf der Außenseite bietet eine negativ geladene Oberfläche, die essenziell für die Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren ist. Vor allem aber signalisiert die externe Präsenz von Phosphatidylserin den Beginn der Apoptose. Erkennen Makrophagen die betroffenen Zellen über spezifische Phosphatidylserin-Rezeptoren beseitigen sie diese (Schroit and Zwaal 1991; Tait, Smith, and Wood 1999; Ramstrom et al. 2010).

Die Untersuchung der Phosphatidylserin-Menge auf der Zelloberfläche von *Gnai*-defizienten Thrombozyten, abhängig von ihrem Aktivierungszustand, gibt Rückschlüsse auf die Rolle von $G\alpha_i$ in dem Prozess der Apoptose, um damit deren Einfluss auf die Blutgerinnung besser verstehen und mögliche Störungen in diesen Prozessen identifizieren zu können (Schroit and Zwaal 1991; Tait, Smith, and Wood 1999; Ramstrom et al. 2010).

Bei allen untersuchten Thrombozyten der *Gnai*-defizienten Mausstämme war die Menge an extrazellulärem Phosphatidylserin unter Stimulation und unter Ruhezustand identisch. Interessanterweise war nach Inkubation mit Thrombin das Level von externalisiertem Phosphatidylserin etwas geringer als unter Ruhebedingungen. Nach diesen Ergebnissen müsste Thrombin in Bezug auf die Apoptose einen protektiven Effekt auf die Thrombozyten haben.

Im Widerspruch hierzu gibt es Veröffentlichungen, bei denen eine Inkubation von murinen Plättchen mit Thrombin zu einem Anstieg der Phosphatidylserinmenge auf der äußeren Zellmembran führt (Cao et al. 2017). In dieser Arbeit wurde

ebenfalls ein Anstieg des extrazellulären Phosphatidylserins unter CRP-Einfluss beschrieben. Dies konnte auch bei uns festgestellt werden. Bei Plättchen-spezifischem Fehlen von $G\alpha_{i2}$ konnte kein Unterschied in der AnnexinV Bindung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Jedoch bei $G\alpha_{i3}$ -Defizienz wurde ein Unterschied zwischen globalem KO und Plättchen-spezifischem KO festgestellt. Bei Plättchen-spezifischem KO war die Phosphatidylserin-Menge bereits geringer als in der Kontrolle, dies konnte jedoch nicht statistisch bestätigt werden. Bei globalem KO war dieser Unterschied ausgeprägter und es konnte eine statistisch signifikant geringere Menge von Phosphatidylserin nach CRP-Stimulation festgestellt werden. Das Fehlen von *Gnai3* hat also einen protektiven Effekt auf die Phosphatidylserinfreisetzung von Thrombozyten und damit auf die Einleitung der Apoptose. Dieses Phänomen könnte durch die länger vitalen Thrombozyten auch einen Einfluss auf die geringere Gewebsschädigung nach einem induzierten Herzinfarkt oder Schlaganfall, wie bei Devanathan et al. 2015 beschrieben, sein (Devanathan et al. 2015).

Bei Plättchen-spezifischem Fehlen von *Gnai2/3* war der Unterschied zwischen Gen-Defizienz und Kontrolle noch einmal stärker ausgeprägt. Dies lässt die Vermutung nahe, dass $G\alpha_{i2}$ bei einer $G\alpha_{i3}$ -Defizienz dies etwas kompensiert, was bei einem Doppel-KO nicht mehr möglich ist.

5.6 Charakterisierung der thromboinflammatorischen Assoziation von Thrombozyten mit Leukozyten

Die Ausbildung von Komplexen zwischen Leukozyten und Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen. Letztendlich sind sie für die Rekrutierung verschiedenster Entzündungszellen und der Verengung der Blutgefäße zuständig. Eine Fehlregulation dieses Prozesses könnte eine überschießende Entzündungsreaktion und damit einhergehende größere Gewebsschädigung nach sich ziehen (Granja et al. 2022).

In allen Mausstämmen bilden sich in Ruhe und mit ADP, Thrombin und U-46619 eine gleiche Anzahl an Komplexen zwischen Plättchen mit Gen-Defizienz und den jeweiligen Neutrophilen. Unter Ruhebedingungen und unter Stimulation mit ADP und Thrombin sind die Werte ebenfalls vergleichbar. Die Stimulation mit U-46619 in Blut von *Gnai3*^{-/-} Tieren erbrachte einen Anstieg der Komplexbildung auf etwa 40% der vorhandenen neutrophilen Granulozyten. Eine Erklärung hierfür kann ein gewisser genetischer Unterschied, der phänotypisch unterschiedliche Reaktionen zwischen den einzelnen Mausstämmen hervorbringt, sein. CRP erbrachte bei *Gnai2*- und kombiniert mit *Gnai3*-Defizienz eine unterschiedliche Komplexbildung zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Während bei alleiniger *Gnai3*-Defizienz Plättchen-spezifisch und global kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen war, konnten im Blut von Mäusen mit singulärem als auch mit *Gnai3* kombinierter Plättchen-spezifischer *Gnai2*-Defizienz eine geringere Komplexbildung als in der Kontrolle festgestellt werden. $G\alpha_{i2}$ muss also eine Rolle bei der Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten spielen.

Beim Vergleich der PNC-Bildung unserer Versuchsreihe nach Aktivierung mit Untersuchungen, die zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (Köhler et al. 2024), konnte jedoch bei nahezu identischem Versuchsaufbau keine erhöhte PNC-Bildung nach Aktivierung mit ADP, auch in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Trotz aufwendiger Fehlersuche konnten wir die Ursache hierfür nicht finden. Daher muss dieses Experiment wiederholt werden, um die Rolle von $G\alpha_{i2}$ bei der Bildung von PNCs nach Aktivierung mit CRP genauer zu untersuchen. Falls nach Behebung der fehlenden PNC-Bildung nach ADP-Aktivierung das Phänomen der geringeren PNC-Bildung nach CRP-Stimulation von Plättchen mit $G\alpha_{i2}$ -Defizienz besteht, ist dies von großem wissenschaftlichen Interesse, da dies eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt nach kardialem Ischämie-Reperfusionsschaden bei Plättchen-spezifischer $G\alpha_{i2}$ -Defizienz ist (Devanathan et al. 2015). Allerdings lässt sich hiermit nicht der protektive Effekt von globalem und Plättchen-spezifischer $G\alpha_{i3}$ -Defizienz erklären.

5.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit erbrachte Hinweise, dass $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -abhängige Signalwege auch bei der Aktivierung von Blutplättchen durch andere Stimuli, wie CRP oder Thrombin involviert sind. Damit ist die weitere Erforschung der Rolle von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in diesen Signalwegen notwendig. Zum einen sollte die PNC-Bildung genauer betrachtet werden, da diese bei einer *Gnai2*-Defizienz unter CRP-Stimulation reduziert war, obwohl nach dem Stand der Wissenschaft $G\alpha_i$ keinen direkten Einfluss in der Signalweiterleitung von CRP hat. Zunächst muss jedoch noch geklärt werden, warum die Stimulation mit ADP keine PNC-Bildung hervorrief.

Der Übergang der Thrombozyten in den Zustand der Apoptose könnte wie vermutet ebenfalls eine große Rolle bei der Gewebsschädigung nach induziertem Herzinfarkt oder Schlaganfällen sein. Hier ist vor allem auch interessant, den Unterschied zwischen globaler und Plättchen-spezifischer *Gnai3*-Defizienz mit weiteren Apoptosemarkern (z.B. über Annexin V, Caspase 3 Aktivierung oder Cytochrome c Freisetzung (Leytin, Gyulkhandanyan, and Freedman 2019)) und auch mit weiteren Stimulanzen wie z.B. mit LPS, Fibronectin, HSP70, Histone H3/H4 und HMGB1 genauer zu untersuchen (Ebermeyer et al. 2021; NaveenKumar et al. 2023).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Gewebsschädigung könnte die Entstehung von Sauerstoffradikalen nach Aktivierung sein. Die Entstehung dieser Radikale sollte an isolierten Plättchen untersucht werden. Ebenfalls noch völlig unklar ist, ob $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ eine Rolle beim Übergang in die Ferroptose spielen. Diese kann mittels Hemin-Stimulation induziert werden (NaveenKumar et al. 2023).

Die Rolle von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Thrombozyten ist ein wissenschaftlich und medizinisch hoch interessantes Thema, das noch viel Forschungspotential birgt. Es sollten in Zukunft weitere Experimente und Studien erfolgen, um die zellulären Vorgänge besser zu verstehen und damit einen Nutzen für die Menschheit aus diesen Erkenntnissen zu ziehen.

6 Zusammenfassung

G-Proteine nehmen eine zentrale Rolle in der interzellulären Kommunikation im menschlichen Körper ein. Die Funktion dieser Kommunikationsmechanismen ist von besonderem wissenschaftlichen als auch medizinischem Interesse. In dieser Arbeit wurde die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in Thrombozyten mit Hilfe von Mäusen mit Plättchen-spezifischer *Gnai3*-, globaler *Gnai3*-, Plättchen-spezifischer *Gnai2*- und *Gnai2/i3*-Defizienz, sowie korrespondierenden Kontrolltieren untersucht.

Zunächst wurde die Expression der Oberflächenproteine GPV GPVI GPIX, α_5 und β_3 auf ruhenden Thrombozyten analysiert. Um den Grad der Aktivierung der Thrombozyten zu bestimmen, wurde der Anstieg der CD62P-Expression und JON/A-Bindung nach Aktivierung mit verschiedenen Substanzen (ADP, CRP, Thrombin und U46619) betrachtet. Das Mitochondriale Membranpotential ist der grundlegende Schlüssel für die Energiegewinnung in der Zelle und wurde mit dem Farbstoff TMRE, der Änderungen dieses Potentials anzeigt, detektiert. Je nach Aktivierungsgrad gehen die Thrombozyten unterschiedlich schnell in den Zustand des geregelten Zelltods. AnnexinV fungiert hierbei als Apoptosemarker, der an externalisiertes Phosphatidylserin bindet. Zuletzt wurde noch die Komplexbildung zwischen *Gnai*-defizienten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten nach Aktivierung bestimmt.

Beim Betrachten der Expression der Oberflächenproteine in Ruhe konnten keine Unterschiede zwischen Thrombozyten mit und ohne *Gnai2*-, *Gnai3*- oder *Gnai2/i3*-Defizienz festgestellt werden. Bei einer $G\alpha_{i2}$ -Defizienz ist eine geringere CD62P- und JON/A-Bindung nach Aktivierung mit ADP zu registrieren. Nach CRP- und Thrombin-Aktivierung konnten in *Gnai3*-defizienten Thrombozyten ebenfalls geringere Mengen an aktiviertem $\alpha_{IIb}\beta_3$ festgestellt werden. Bei der Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials wurden keinerlei Auswirkungen der *Gnai2*- und/oder *Gnai3*-Defizienz registriert. Bei der Einleitung der Apoptose, zeigte eine *Gnai3*-Defizienz einen protektiven Effekt. Die Komplexbildung zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten zeigte nur bei *Gnai2*-Defizienz der Thrombozyten eine geringere Anzahl nach CRP-Aktivierung.

7 Quellen

- Alan D Michelson, Marco Cattaneo, , Andrew Frelinger, , and Peter Newman. 2019. *Platelets* (Elsevier Science & Technology).
- André, P. 2004. 'P-selectin in haemostasis', *Br J Haematol*, 126: 298-306.
- Beer-Hammer, Sandra, Sze, Stephanie, Veronika Leiss, Isabel, Ana Novakovic, Roland, Kirsten Bucher, Chengfang Chen, Kun Ni, Wibke Singer, Csaba Harasztosi, Thomas Schimmang, Ulrike Zimmermann, Klaus Pfeffer, Lutz Birnbaumer, Andrew Forge, Mireille Montcouquiol, Marlies Knipper, Bernd Nürnberg, and Lukas Rüttiger. 2018. 'Gai Proteins are Indispensable for Hearing', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47: 1509-32.
- Benito-Jardón, M., S. Klapproth, LLuch I. Gimeno, T. Petzold, M. Bharadwaj, D. J. Müller, G. Zuchtriegel, C. A. Reichel, and M. Costell. 2017. 'The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes', *Elife*, 6.
- Bennett, J. S. 2005. 'Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3', *J Clin Invest*, 115: 3363-9.
- Berger, G., D. W. Hartwell, and D. D. Wagner. 1998. 'P-Selectin and platelet clearance', *Blood*, 92: 4446-52.
- Brass, L. F., D. R. Manning, K. Cichowski, and C. S. Abrams. 1997. 'Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond', *Thromb Haemost*, 78: 581-9.
- Broos, K., H. B. Feys, S. F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke, and H. Deckmyn. 2011. 'Platelets at work in primary hemostasis', *Blood Rev*, 25: 155-67.
- Bye, A. P., A. J. Unsworth, and J. M. Gibbins. 2016. 'Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14: 918-30.
- Cao, H., R. Bissinger, A. T. Umbach, M. Gawaz, and F. Lang. 2017. 'Effect of Bexarotene on Platelet Activation and Apoptosis', *Cell Physiol Biochem*, 42: 838-47.
- Chatterjee, M., D. Rath, J. Schlotterbeck, J. Rheinlaender, B. Walker-Allgaier, N. Alnagar, M. Zdanyte, I. Müller, O. Borst, T. Geisler, T. E. Schäffer, M. Lämmerhofer, and M. Gawaz. 2017. 'Regulation of oxidized platelet lipidome: implications for coronary artery disease', *Eur Heart J*, 38: 1993-2005.
- Čopič, Alenka, Thibaud Dieudonné, and Guillaume Lenoir. 2023. 'Phosphatidylserine transport in cell life and death', *Current Opinion in Cell Biology*, 83: 102192.
- Crowley, L. C., M. E. Christensen, and N. J. Waterhouse. 2016. 'Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining', *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- Devanathan, Vasudharani, Ina Hagedorn, David Köhler, Katja Pexa, Deya Cherpokova, Peter Kraft, Madhurendra Singh, Peter Rosenberger, Guido Stoll, Lutz Birnbaumer, Roland P. Piekorz, Sandra Beer-Hammer, Bernhard Nieswandt, and Bernd Nürnberg. 2015. 'Platelet G ₁₂ protein G₁₂ is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ

- damage in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 6491-96.
- Ebermeyer, T., F. Cognasse, P. Berthelot, P. Mismetti, O. Garraud, and H. Hamzeh-Cognasse. 2021. 'Platelet Innate Immune Receptors and TLRs: A Double-Edged Sword', *Int J Mol Sci*, 22.
- Fritz, M., M. Radmacher, and H. E. Gaub. 1994. 'Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy', *Biophys J*, 66: 1328-34.
- Gawaz, Meinrad. 1999. *Das Blutblättchen* (Georg Thieme Verlag).
- Gogstad, G. O., I. Hagen, R. Korsmo, and N. O. Solum. 1982. 'Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelet alpha-granules', *Biochim Biophys Acta*, 702: 81-9.
- Gohla, Antje, Karinna Klement, Roland P. Piekorz, Katja Pexa, Stephan Vom Dahl, Karsten Spicher, Vladyslav Dreval, Dieter Häussinger, Lutz Birnbaumer, and Bernd Nürnberg. 2007. 'An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G α_3 in the antiautophagic action of insulin in the liver', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 3003-08.
- Granja, Tiago F., David Köhler, Veronika Leiss, Claudia Eggstein, Bernd Nürnberg, Peter Rosenberger, and Sandra Beer-Hammer. 2022. 'Platelets and the Cybernetic Regulation of Ischemic Inflammatory Responses through PNC Formation Regulated by Extracellular Nucleotide Metabolism and Signaling', *Cells*, 11: 3009.
- Gudermann, T., B. Nürnberg, and G. Schultz. 1995. 'Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function', *J Mol Med (Berl)*, 73: 51-63.
- Gutmann, C., A. Joshi, and M. Mayr. 2020. 'Platelet "-omics" in health and cardiovascular disease', *Atherosclerosis*, 307: 87-96.
- Hansford, R. G., and D. Zorov. 1998. 'Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation', *Mol Cell Biochem*, 184: 359-69.
- Harrison, P., and E. M. Cramer. 1993. 'Platelet alpha-granules', *Blood Rev*, 7: 52-62.
- Hermann, P., M. Armant, E. Brown, M. Rubio, H. Ishihara, D. Ulrich, R. G. Caspary, F. P. Lindberg, R. Armitage, C. Maliszewski, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. 'The Vitronectin Receptor and its Associated CD47 Molecule Mediates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes by Interaction with Soluble CD23', *The Journal of Cell Biology*, 144: 767-75.
- Hesch, R. D. 1991. 'Classification of cell receptors', *Curr Top Pathol*, 83: 13-51.
- Holinstat, Michael. 2017. 'Normal platelet function', *Cancer and Metastasis Reviews*, 36: 195-98.
- Huang, Jiansong, Xia Li, Xiaofeng Shi, Mark Zhu, Jinghan Wang, Shujuan Huang, Xin Huang, Huafeng Wang, Ling Li, Huan Deng, Yulan Zhou, Jianhua Mao, Zhangbiao Long, Zhixin Ma, Wenle Ye, Jiajia Pan, Xiaodong Xi, and Jie Jin. 2019. 'Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting', *Journal of Hematology & Oncology*, 12.

- Jantzen, Hans-Michael, David S. Milstone, Laurent Gousset, Pamela B. Conley, and Richard M. Mortensen. 2001. 'Impaired activation of murine platelets lacking Gai2', *Journal of Clinical Investigation*, 108: 477-83.
- Janus-Bell, Emily, Alexandra Yakusheva, Cyril Scandola, Nicolas Receveur, Usman Muhammad Ahmed, Clarisse Mouriaux, Catherine Bourdon, Cécile Loubière, Anita Eckly, Yotis A. Senis, Mikhail A. Panteleev, Christian Gachet, and Pierre H. Mangin. 2022. 'Characterization of the Role of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis', *Thrombosis and Haemostasis*, 122: 767-76.
- Jiang, M., K. Spicher, G. Boulay, A. Martín-Requero, C. A. Dye, U. Rudolph, and L. Birnbaumer. 2002. 'Mouse gene knockout and knockin strategies in application to alpha subunits of Gi/Go family of G proteins', *Methods Enzymol*, 344: 277-98.
- Khodadi, E. 2020. 'Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules', *Cardiovasc Toxicol*, 20: 1-10.
- Köhler, David, Vasudharani Devanathan, Claudia Bernardo De Oliveira Franz, Therese Eldh, Ana Novakovic, Judith M. Roth, Tiago Granja, Lutz Birnbaumer, Peter Rosenberger, Sandra Beer-Hammer, and Bernd Nürnberg. 2014. 'Gai2- and Gai3-Deficient Mice Display Opposite Severity of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury', *PLoS ONE*, 9: e98325.
- Köhler, David, Veronika Leiss, Lukas Beichert, Simon Killinger, Daniela Grothe, Ragini Kushwaha, Agnes Schröter, Anna Roslan, Claudia Eggstein, Jule Focken, Tiago Granja, Vasudharani Devanathan, Birgit Schitteck, Robert Lukowski, Bettina Weigelin, Peter Rosenberger, Bernd Nürnberg, and Sandra Beer-Hammer. 2024. 'Targeting Gai2 in neutrophils protects from myocardial ischemia reperfusion injury', *Basic Research in Cardiology*.
- Lambert, N. A. 2008. 'Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells', *Sci Signal*, 1: re5.
- Leytin, V., A. V. Gyulkhandanyan, and J. Freedman. 2019. 'Platelet Apoptosis Can Be Triggered Bypassing the Death Receptors', *Clin Appl Thromb Hemost*, 25: 1076029619853641.
- Mathur, A. 2000. 'Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes', *Cardiovascular Research*, 46: 126-38.
- Miyaniishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata. 2007. 'Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor', *Nature*, 450: 435-9.
- Moroi, M., and S. M. Jung. 2004. 'Platelet glycoprotein VI: its structure and function', *Thromb Res*, 114: 221-33.
- NaveenKumar, S. K., M. Hemshekhar, B. N. Sharathbabu, K. Kemparaju, G. Mugesh, and K. S. Girish. 2023. 'Platelet activation and ferroptosis mediated NETosis drives heme induced pulmonary thrombosis', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1869: 166688.
- Nürnberg, B., S. Beer-Hammer, E. Reisinger, and V. Leiss. 2024. 'Non-canonical G protein signaling', *Pharmacol Ther*, 255: 108589.

- Offermanns, S. 2000. 'The Role of Heterotrimeric G Proteins in Platelet Activation', *Biological Chemistry*, 381.
- . 2003. 'G-proteins as transducers in transmembrane signalling', *Prog Biophys Mol Biol*, 83: 101-30.
- Plummer, Nicholas W., Karsten Spicher, Jason Malphurs, Haruhiko Akiyama, Joel Abramowitz, Bernd Nürnberg, and Lutz Birnbaumer. 2012. 'Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the Gα subfamily of heterotrimeric G proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 21366-71.
- Ramstrom, S., S. O'Neill, E. Dunne, and D. Kenny. 2010. 'Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent', *Platelets*, 21: 289-96.
- Rheinländer, A., B. Schraven, and U. Bommhardt. 2018. 'CD45 in human physiology and clinical medicine', *Immunol Lett*, 196: 22-32.
- Rivera, J., M. L. Lozano, J. Corral, R. González-Conejero, C. Martínez, and V. Vicente. 2000. 'Complejo plaquetario GP Ib/IX/V: papel fisiológico', *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56: 355-65.
- Rivera, J., M. L. Lozano, L. Navarro-Nunez, and V. Vicente. 2009. 'Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation', *Haematologica*, 94: 700-11.
- Robert Koch Institut. 15.06.2023. 'Herz-Kreislauf-Erkrankungen', Accessed 07.03. https://www.rki.de/DE/Content/GesundAZ/H/Herz_Kreislauf_Erkrankungen/Herz_Kreislauf_Erkrankungen_node.html.
- Rose, S., A. Misharin, and H. Perlman. 2012. 'A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment', *Cytometry A*, 81: 343-50.
- Schroit, A. J., and R. F. Zwaal. 1991. 'Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes', *Biochim Biophys Acta*, 1071: 313-29.
- Simon, M. I., M. P. Strathmann, and N. Gautam. 1991. 'Diversity of G proteins in signal transduction', *Science*, 252: 802-8.
- Skárka, L., and B. Ostádal. 2002. 'Mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes', *Physiol Res*, 51: 425-34.
- Stegner, David, Vanessa Klaus, and Bernhard Nieswandt. 2019. 'Platelets as Modulators of Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury', *Frontiers in Immunology*, 10.
- Stegner, David, and Bernhard Nieswandt. 2011. 'Platelet receptor signaling in thrombus formation', *Journal of Molecular Medicine*, 89: 109-21.
- Syrovatkina, Viktoriya, Kamela O. Alegre, Raja Dey, and Xin-Yun Huang. 2016. 'Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins', *Journal of Molecular Biology*, 428: 3850-68.
- Tait, J. F., C. Smith, and B. L. Wood. 1999. 'Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with annexin V', *Blood Cells Mol Dis*, 25: 271-8.
- Tennakoon, M., K. Senarath, D. Kankanamge, K. Ratnayake, D. Wijayarathna, K. Olupothage, S. Ubeyasinghe, K. Martins-Cannavino, T. E. Hébert, and A.

- Karunaratne. 2021. 'Subtype-dependent regulation of G β y signalling', *Cell Signal*, 82: 109947.
- Tiedt, Ralph, Tibor Schomber, Hui Hao-Shen, and Radek C. Skoda. 2007. 'Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo', *Blood*, 109: 1503-06.
- Totani, Licia, and Virgilio Evangelista. 2010. 'Platelet–Leukocyte Interactions in Cardiovascular Disease and Beyond', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30: 2357-61.
- Uings, I. J., and S. N. Farrow. 2000. 'Cell receptors and cell signalling', *Mol Pathol*, 53: 295-9.
- Van Der Meijden, Paola E. J., and Johan W. M. Heemskerk. 2019. 'Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives', *Nature Reviews Cardiology*, 16: 166-79.
- Wasiluk, A. 2004. 'Markers of platelets activation, CD 62P and soluble P-selectin in healthy term neonates', *J Perinat Med*, 32: 514-5.
- Wootten, Denise, Arthur Christopoulos, Maria Marti-Solano, M. Madan Babu, and Patrick M. Sexton. 2018. 'Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19: 638-53.
- Yeung, Jennifer, Wenjie Li, and Michael Holinstat. 2018. 'Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases', *Pharmacological Reviews*, 70: 526-48.
- Zeiler, M., M. Moser, and M. Mann. 2014. 'Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range', *Mol Cell Proteomics*, 13: 3435-45.
- Zou, Jinmi, Frauke Swieringa, Bas De Laat, Philip G. De Groot, Mark Roest, and Johan W. M. Heemskerk. 2022. 'Reversible Platelet Integrin α IIb β 3 Activation and Thrombus Instability', *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 12512.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik, Abteilung Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Sandra Beer-Hammer durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (insbesondere Dr. Madhumita Chatterjee und Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer) von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung des Instituts durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Danksagung

Ich möchte meinen aufrichtigen Dank an alle aussprechen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich meinen herzlichen Dank an Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer richten, die mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und mich immer sowohl fachlich als auch persönlich kontinuierlich unterstützt und motiviert hat. Ohne ihre Flexibilität und ihre letztendlich hervorragende Betreuung wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Dissertation abzuschließen. Vielen Dank für alles!

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie durchzuführen.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Madhumita Chatterjee und Dr. Veronika Leiss für die Einführung in die Welt der Plättchen, die Einweisung in das experimentelle Handling von Thrombozyten, Bereitstellung der Protokolle und den fachlichen Austausch.

Mein Dank gilt Sandra Schwegmann, Renate Riehle, Claudia Müller und Iris Noetzelmann für ihre wertvolle labortechnische und organisatorische Unterstützung

Mein besonderer Dank gilt Patrick Rieker, Lea Kaupp, Lisa Rebmann, Agnes Schröter, Ragini Kushwaha, Georgia Bauer und Christin Nothnagel. Ihre fachliche Expertise und menschliche Unterstützung haben mir immer geholfen und das Arbeitsumfeld sehr bereichert.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden in Tübingen danken, die mich während der gesamten Zeit stets mit ermutigt und unterstützt haben.