

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Thrombozyten-induzierte Apoptose – Rolle der
thrombozytären Adhäsionsrezeptoren**

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

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

vorgelegt von

Eisinger, Felix

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1.Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer

2.Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Guthoff

Tag der Disputation: 18.07.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems.....	5
1.2 Rolle der Thrombozyten in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.....	5
1.3 Aufbau und Funktion der Thrombozyten	5
1.4 Ablauf der Hämostase-Reaktion.....	6
1.5 Der Glycoprotein Ib-V-IX-Komplex	7
1.5.1 Aufbau des GPIb-V-IX	7
1.5.2 Funktion des GPIb-V-IX	8
1.5.3 Interaktion des GPIb-V-IX mit Leukozyten und Endothelzellen	8
1.6 Apoptose	9
1.6.1 Definition und Abgrenzung zur Nekrose	9
1.6.2 Morphologische Zeichen der Apoptose.....	10
1.6.3 Extrinsischer Apoptoseweg.....	11
1.6.4 Intrinsischer Apoptoseweg und weitere Formen der Apoptoseinduktion...	11
1.6.5 Gemeinsame Endstrecke der Apoptosesignalwege.....	12
1.6.6 Thrombozytäre Apoptoseinduktion durch den FAS-Ligand.....	13
1.7 Fragestellung.....	13
2. Methoden und Materialien	15
2.1 Materialien.....	15
2.2 Mäuse	18
2.3 Zellkultur.....	18
2.3.1 Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	18
2.3.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen	19
2.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	19
2.3.4 Bestimmung der Zellzahl	19
2.4 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut.....	20
2.5 Caspase-Assay	20
2.6 Immunhistochemische Färbungen neuronaler Zellen in murinen Gehirnkryoschnitten.....	21
2.6.1 TUNEL-Staining an murinen Gefrierschnitten	21
2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung an murinen Gefrierschnitten	22
2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung an murinen Gefrierschnitten	22
2.7 Statistik und Darstellung.....	23
3. Ergebnisse.....	24

3.1 <i>In vitro</i> – Caspase-Assay.....	24
<i>In vitro</i> Blockade des GPIIb α -Rezeptors reduziert die thrombozyteninduzierte Apoptose nicht.....	24
3.2 <i>In vivo</i> – TUNEL-Staining/ Immunfluoreszenz.....	26
3.2.1 Injektion eines GPIIb α -Antikörpers reduziert thrombozyteninduzierte Apoptose im tMCAO-Modell.....	26
3.2.2 Verlust des GPIIb α -Rezeptors führt zur verringerten thrombozyteninduzierten Apoptose <i>in vivo</i>	27
3.2.3 Verlust des extrazellulären Anteils des GPIIb α -Rezeptors führt zu reduzierter thrombozyteninduzierter Apoptose <i>in vivo</i>	29
3.2.4 Doppelfärbung von apoptotischen Zellen und Neuronen.....	30
3.3 <i>In vivo</i> – Thrombose-Index.....	32
3.3.1 Thrombose in GPIIb α -IL4-Mäusen.....	32
3.3.2 Defizienz des GPIIb α -Rezeptors reduziert Thrombose signifikant weniger als Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	34
3.3.3 Verlust des extrazellulären GPIIb α -Rezeptors reduziert Leukozytenzahl und Apoptose von Leukozyten im Schlaganfallmodell signifikant.....	35
4. Diskussion.....	37
4.1 Thrombozyten in der Regulation kardiovaskulärer Erkrankungen.....	37
4.2 Direkte Interaktion des GPIIb α -Rezeptors mit der Zielzelle für Apoptose-induktion nicht nötig.....	37
4.3 GPIIb-Defizienz im Schlaganfallmodell.....	38
4.4 Thrombose im Schlaganfall bei GPIIb-Defizienz.....	39
4.5 GPIIb-Komplex und die Apoptose von Leukozyten.....	39
4.6 Mögliche Effektorwege des GPIIb-Rezeptors bei der Apoptoseinduktion.....	40
5. Zusammenfassung.....	43
6. Literaturverzeichnis.....	44
7. Anhang.....	52

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems

Mit einem Anteil von 39% (Stand 2014) stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen noch immer die häufigste Todesursache in Deutschland dar [1]. Auch im weltweiten Vergleich sind ischämische Herzerkrankungen und Schlaganfall für die meisten Todesfälle verantwortlich – im Jahr 2013 bezifferten sie sich auf rund 8,1 Millionen bzw. 6,9 Millionen [2]. Obwohl in ihrer Mortalitätsrate zwischen 1990 und 2013 deutlich rückläufig, machen sie damit zusammen immer noch etwas mehr als ein Drittel aller Todesfälle weltweit aus. Dies schlägt sich auch in den Kosten für die Gesundheitsversorgung nieder. In den USA belaufen sie sich auf knapp eine Milliarde Dollar – pro Tag [3]. In Deutschland verursachen Herz-Kreislauf-Erkrankungen Kosten von 37 Milliarden Euro jährlich (Stand 2008) und stellen damit den größten Anteil in den Krankheitskosten dar [4].

1.2 Rolle der Thrombozyten in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen

Zum Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen gehören typische Volkskrankheiten wie Herzinfarkt, Koronare Herzkrankheit oder Schlaganfall. In aller Regel geht ihnen ein Prozess der Arteriosklerose voran, bei dem Blutplättchen eine zentrale Rolle einnehmen. So stellen sie nicht nur durch Bindung an beschädigtes Endothel einen elementaren Teil der Koagulationskaskade dar, sondern regulieren schon früher den vaskulären Inflamationsprozess durch Rekrutierung von Leukozyten oder durch Stimulation von endothelialen Progenitorzellen [5][6][7]. Das bessere Verständnis der thrombozytären Funktionen kann damit Einblick in die Pathogenese unterschiedlicher Krankheitsbilder ermöglichen.

1.3 Aufbau und Funktion der Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, nehmen eine wichtige Rolle im Prozess der Hämostase ein [8]. Darüber hinaus wurden in letzter Zeit weitere Funktionen in so unterschiedlichen Bereichen wie der Inflammation, der Immunabwehr und der Tumorentstehung deutlich [9][10]. Mit einem Durchmesser von 2-3 μm stellen Thrombozyten die kleinsten Zellen des Blutes dar [11]. Ihre Produktion erfolgt durch Abschnürung aus polyploiden Megakaryozyten im Knochenmark [12], wobei sich die anschließende Lebensdauer im Blutstrom auf 7 bis 10 Tage beschränkt [13]. Obwohl Blutplättchen einzigartig für Säugetiere sind [14], ist ihr Gehalt im Blut zwischen den

einzelnen Spezies variabel. So liegt die übliche Konzentration beim Menschen zwischen $150-400 \times 10^9$ Plättchen pro Liter Blut, während der Gehalt bei Mäusen mit $900-1600 \times 10^9$ Zellen pro Liter Blut deutlich höher ist [15]. Thrombozyten besitzen keinen eigenen Zellkern, enthalten jedoch mRNA, welche sie zur Synthese von Proteinen wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor (vWF) oder der Glykoproteine Ib, IIb und IIIa nutzen [16][17]. Darüber hinaus enthalten Thrombozyten einfache Mitochondrien zur Energiegewinnung [18]. Eine enge Verknüpfung zwischen Morphologie und Funktion der Thrombozyten stellen die thrombozytären Granula dar: Sie lassen sich in α -Granula, dichte (δ) Granula sowie Lysosomen unterteilen. A-Granula stellen die größten und häufigsten Granula dar und enthalten neben Elementen der Hämostase wie Adhäsionsproteinen (vWF, Fibrinogen), Gerinnungsfaktoren (FV, FIX) und Membranproteinen (GPIb-V-IX, $\alpha 2\beta 3$, P-Selectin) auch zahlreiche Chemokine (PF4) und Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) [19]. Die dichten Granula sind deutlich kleiner, sie weisen dafür aber hohe Konzentrationen an ADP, Calcium und Serotonin auf [20]. Nicht zuletzt besitzen Thrombozyten wie viele andere Zellen Lysosomen, ihre Funktion ist jedoch nicht abschließend geklärt [19].

1.4 Ablauf der Hämostase-Reaktion

Das Endothel kleidet als innerste Schicht das Netz der Blutgefäße aus. Kommt es zu einer Verletzung am Gefäß, werden aus der subendothelialen Matrix Kollagen und Tissue Factor freigelegt, welche die Blutgerinnung durch Aktivierung von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren initiieren. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Bindung des GPIb-IX-V-Rezeptors an die A1-Domäne des von-Willebrand-Faktors, welcher vom verletzten Endothel freigesetzt wird [21]. Obwohl diese Bindung nur lose ist, führt sie sowohl zu einer Aktivierung als auch, insbesondere bei hohen Flussraten [22], zu einer Verlangsamung der Plättchen [18][19], sodass in der Folge weitere Bindungen gebildet werden können. Dafür sind vor allem die Rezeptoren $\alpha 2\beta 1$ [25] sowie GPVI relevant, wobei letzterer fest an Kollagen bindet und über die FcR γ -Kette die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt [26]. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und damit verbunden zur Überführung des GPIIb/IIIa-Rezeptors in seine aktive Form (inside-out-signaling) [27]. Gleichzeitig werden aus den Thrombozyten-Granula zahlreiche Signalstoffe wie Adenosindiphosphat (ADP aus den dense granula), Fibrinogen und P-Selectin sowie Thromboxan A₂ ausgeschüttet. Diese führen in Form eines positiven Feedbacks zu einer Verstärkung der Aktivierung bzw. zur Aktivierung

weiterer Thrombozyten [28]. Darüber hinaus kommt es zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was eine Formänderung des Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien bedingt [29]. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor führt schließlich durch Bindung von löslichem Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und endotheliale Vitronectin zu einer Vernetzung der Plättchen mit dem Endothel und anderen Plättchen[30][31]. Neben der Aktivierung über die Bindung an Kollagen können die Thrombozyten am Protease activated Receptor (PAR 1 und 4) durch Thrombin aktiviert werden, welches im Rahmen der ablaufenden Gerinnungskaskade gebildet wird [32].

1.5 Der Glycoprotein Ib-V-IX-Komplex

1.5.1 Aufbau des GPIb-V-IX

Der GPIb-V-IX-Komplex nimmt bei der initialen Plättchenadhäsion eine elementare Rolle ein, indem er die Bindung der Thrombozyten an von-Willebrand-Faktor aus dem Subendothelium ermöglicht [33]. Der Komplex setzt sich dabei aus vier unterschiedlichen Glycoproteinen zusammen: Die über eine Disulfid-Brücke verbundenen Iba und β , sowie V und IX in Form einer nichtkovalenten Anlagerung. Die Untereinheiten liegen doppelt (Iba; Ib β ; IX) bzw. einfach (V) vor [34].

Der Großteil der Bindungen am GPIb-IX-V-Komplex erfolgt über die GPIba-Untereinheit [33]. Bei dieser werden sieben Leucin-reiche Wiederholungen von einer N- und C-terminalen Capping-Sequenz umgeben. Daran schließt sich eine anionische Struktur, ein Sialomucin-Abschnitt sowie ein Transmembran- und zytoplasmatischer Anteil an [35][36]. Im Bereich zwischen der N-Capping-Sequenz und dem anionischen Abschnitt befindet sich ein Großteil der Bindungsstellen für Liganden. Dazu gehören der von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombospondin, MAC-1 auf Leukozyten, das auf Endothelzellen und einigen Tumorzellen exprimierte P-Selectin sowie Gerinnungsfaktoren wie Thrombin, Faktor XI und XII sowie high-molecular-weight kininogen [23][37]–[39].

1.5.2 Funktion des GPIb-V-IX

Aus seinem Aufbau lassen sich einige zentrale Funktionen des GPIb-V-IX-Komplex ableiten: Zum einen die primäre Adhäsion der Plättchen an subendotheliales Gewebe (VWF), Endothelzellen (P-Selectin) und Leukozyten (MAC-1). Zum anderen scheint die Bindung von Thrombin an den GPIb-Rezeptor die Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin am PAR zu verstärken [40] und die thrombin-abhängige Leukozytenmigration zu beeinflussen [41]. Nicht zuletzt wirkt der GPIb-V-IX-Komplex auf die intrazellulären Signalkaskaden ein. Dazu seien zwei Beispiele genannt: So ist an das zytoplasmatische Ende der GPIb α -Untereinheit Filamin A gebunden, welches eine regulatorische Wirkung auf die Zellstruktur ausübt [42]. Darüber hinaus führt die Bindung von VWF an GPIb α über eine noch nicht vollständig aufgeklärte Signalkaskade zur Aktivierung von GPIIb/IIIa [43].

Wie wichtig der GPIb-V-IX-Komplex für die Aufrechterhaltung der Thrombozytenfunktion ist, lässt sich am besten an einem Ausfall desselben beobachten. Beim Bernard-Soulier-Syndrom kommt es genetisch zu einer Defizienz des GPIb-V-IX-Komplexes, wobei unterschiedliche Abschnitte des Rezeptors betroffen sein können. Zu den typischen Symptomen kommt es nach bisherigem Wissensstand nur, wenn die Untereinheiten GPIb α , GPIb β oder GP IX betroffen sind. Eine Mutation in GPV scheint dagegen keine Auswirkung auf den Phänotyp zu haben [44]. Zu den klassischen Symptomen gehört die Trias Thrombozytopenie, das Auftreten von Makrothrombozyten sowie eine Verlängerung der Blutungszeit [45].

Im Mausmodell lässt sich dieses Krankheitsbild an GPIb α -Knockout-Tieren darstellen [46]. Um den Einfluss der Thrombozytopenie zu verringern, bietet sich außerdem die Verwendung von GPIb α -IL4-Knockout-Mäusen an. In diesem Modell wird ein Großteil des extrazytoplasmatischen Anteils der GPIb α -Kette durch die α -Untereinheit eines humanen Interleukin-4-Rezeptors ersetzt. Dadurch wird die Thrombozytenzahl annähernd normalisiert (~70% im Vergleich zu WT-Tieren), ebenso die Größe der Thrombozyten. Die verlängerte Blutungszeit als Folge der fehlenden extrazytoplasmatischen GPIb α -Untereinheit bleibt jedoch erhalten [47].

1.5.3 Interaktion des GPIb-V-IX mit Leukozyten und Endothelzellen

Neben ihrer Rolle in der Initiierung der primären Hämostase regulieren Thrombozyten die Inflammation in beschädigtem Gewebe über die Rekrutierung und Bindung von Leukozyten, darunter Neutrophile Granulozyten, Monozyten und

Lymphozyten. So exprimieren aktivierte Thrombozyten auf ihrer Oberfläche P-Selectin, an welches Leukozyten mit PSGL-1 lose binden [48][49]. Dies führt zum „Rollen“ von Leukozyten auf aktivierten Plättchen. Für die Ausbildung einer stabilen Bindung ist die Interaktion zwischen dem thrombozytären GPIb α -Rezeptor und dem Integrin α M β 2 (MAC-1) auf Leukozyten von besonderer Bedeutung [50]. Eine antikörpervermittelte Blockade der Bindungsstelle für GPIb α auf dem leukozytären MAC-1 verringerte die Ansammlung von Leukozyten an einer Gefäßverletzung und die leukozytäre Bindung an Thrombozyten im Mausmodell signifikant [39]. Auch in arteriosklerotischen Plaques war die Anlagerung von Leukozyten nach Blockade des GPIb α -Rezeptors signifikant reduziert [51]. Neben der reinen Adhäsion führt die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten zur Ausbildung eines proinflammatorischen Zustands in den Monozyten [52]. Interessanterweise konnte auch umgekehrt nachgewiesen werden, dass die Bindung von MAC-1 an den thrombozytären GPIb α -Rezeptor die Thrombusbildung nach Gefäßverletzung beeinflusst [53].

Thrombozyten interagieren auf vielfältige Weise mit der Gefäßwand. Die Bindung an beschädigtes Endothel im Rahmen der primären Hämostase ist dabei nur ein Teil davon. Tatsächlich können Blutplättchen bereits auf aktiviertem, aber nicht beschädigtem Endothel „rollen“, also eine instabile Bindung an die Gefäßwand ausbilden [54]. Dies erfolgt durch Bindung der thrombozytären Rezeptoren GPIb α und PSGL1 an auf dem aktiviertem Endothel exprimiertes P-Selectin [55][56]. Für die Entstehung eines festen Kontakts ist vor allem der GPIIb/IIIa-Komplex auf Plättchen nötig. Dieser bindet über Fibrinogen als Mittler an endotheliales Vitronectin (α v β 3) [57][30].

1.6 Apoptose

1.6.1 Definition und Abgrenzung zur Nekrose

Der Begriff der Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie für einen der Mitose gegenüberstehenden Prozess des kontrollierten Zelluntergangs verwendet [58]. Dabei wurde die Apoptose vor allem nach morphologischen Kriterien definiert, welche sie auch vom unkontrollierten Vorgang der Nekrose abgrenzbar machen. Diese werden in Abschnitt 1.6.2 weiter erläutert. Ein zentrales Merkmal der Apoptose besteht darin, dass es sich dabei um einen energieabhängigen Prozess

handelt – so konnten Eguchi et al. nachweisen, dass Zellen bei einem ausreichenden intrazellulären ATP-Level in Apoptose gehen, während ein ATP-Mangel zum nekrotischen Zelltod führt [59]. Der Vorteil der Apoptose besteht in erster Linie darin, dass es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einem unkontrollierten Austritt von Zellmaterial ins Gewebe kommt [58]. Dies führt zum einen dazu, dass die umliegenden Zellen nicht durch Zelldebris geschädigt werden [60]. Zum anderen wird eine inflammatorische Immunreaktion wie im Fall der Nekrose unterdrückt [61]. Damit wird die Apoptose zu einem wichtigen Regulator des Gleichgewichts zwischen Zellwachstum- und Untergang und spielt dementsprechend eine zentrale Rolle in Prozessen wie der Embryonalentwicklung, der Bildung von Immun- und Nervenzellen oder der Beseitigung von virusinfizierten Zellen [62]–[64]. Auch bei pathologischen Ereignissen wie dem Herzinfarkt oder der Herzinsuffizienz [65] nehmen apoptotische Vorgänge einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung – so konnte die Infarktgröße im Mausmodell durch Ausschalten des apoptoseinduzierenden FAS-Rezeptors signifikant reduziert werden [66].

1.6.2 Morphologische Zeichen der Apoptose

Apoptotische Zellen zeichnen sich durch eine Reihe von morphologischen Charakteristika aus, welche sie von nekrotischen Zellen abgrenzbar machen. Dazu gehört zunächst die Schrumpfung des Zellkerns, Pyknosis genannt, durch Kondensation des Chromatins welche schließlich in der Fragmentation des Zellkerns, der Karyorrhexis, endet. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Integrität der Zellmembran erhalten, ebenso die der Zellorganellen. Letztere werden zusammen mit Anteilen des Zytoplasmas als membranumhüllte „apoptotic bodies“ von der Zelle abgeschnürt und können so leichter von Makrophagen und anderen Immunzellen phagozytiert werden. Diese Vorgänge führen insgesamt zum Schrumpfen der apoptotischen Zelle, welche sich dabei aus dem Zellverband löst und so ebenfalls schnell von Immunzellen beseitigt werden kann. Insgesamt führt dieser Vorgang zu einer deutlich geringeren Inflammation als bei der Nekrose, da potentiell antigenwirksame Bestandteile des Zytoplasmas und der Zellorganellen nicht frei ins Gewebe austreten können [58][67].

Nekrotische Zellen weisen dagegen schon relativ früh einen Zusammenbruch der Zellmembranbarriere auf, es kommt zum Anschwellen von Zelle und Zellorganellen und schließlich zur Ruptur der Zelle mit Austritt des Zellinhalts in den Extrazellulär-

raum. Dadurch werden benachbarte Zellen beschädigt und eine massive Aktivierung von Immunzellen ausgelöst [68][69].

1.6.3 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische, also von außen induzierte Apoptoseweg, wird vor allem durch Rezeptoren der Tumornekrose-Familie reguliert. Beispiele dazu wären der FAS-Rezeptor (mit dem Ligand FASL) oder der TNF-Rezeptor 1 (mit dem Ligand TNF α). Die Liganden kommen zumeist auf Immunzellen wie den zytotoxischen T-Zellen oder Makrophagen vor oder werden von diesen nach Aktivierung ausgeschüttet [70]. Im Fall des FAS-Rezeptors wird durch die Bindung des Liganden die Bildung des Death Inducing Signal Complex (DISC) ausgelöst, welcher aus dem Adaptorprotein FADD und der Procaspase 8 besteht. Dieser Komplex bedingt wiederum die autokatalytische Spaltung von Procaspase 8 zu Caspase 8, einem der Initiatorenzyme der Apoptose [71][72]. Caspase 8 aktiviert mit den Effektorenzymen Caspase 3 und 7 die Endstrecke der Apoptose, es kommt zur Entstehung der oben beschriebenen morphologischen Zeichen der apoptotischen Zelle. Über einen Nebenweg (Spaltung des BH3-Proteins BID) induziert Caspase 8 die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs, sodass beide Apoptosewege parallel zueinander ablaufen [73].

1.6.4 Intrinsischer Apoptoseweg und weitere Formen der Apoptoseinduktion

Neben der liganden-abhängigen Aktivierung der Apoptose können auch Ereignisse wie Hypoxie, Hyperthermie oder virale Infektionen zur Induktion des programmierten Zelltods führen. Dieser intrinsische Apoptoseweg wird vor allem durch Proteine der Bcl2-Familie vermittelt. Letztere lässt sich in eine anti-apoptotische (Bcl2/ BclX) und zwei pro-apoptotische (BAX/BAK sowie die BH3-only Proteine BID/BAD) Gruppen einteilen [74]. Überwiegt die pro-apoptotische Komponente, kommt es unter anderem zum Austritt von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran ins Zytosol. Cytochrom C bildet dort mit dem Adaptorprotein Apaf1 das Apotosom, ein Enzymkomplex, der Procaspase 9 zu der aktiven Form Caspase 9 spaltet [75]. Mit der Aktivierung der Effektorcaspase 3 durch Caspase 9 wird die Endstrecke der Apoptose erreicht (s. Abbildung 1).

Ein weiterer, eher spezieller Weg der Apoptoseinduktion erfolgt über den Granzym B-Weg und wird unter anderem von zytotoxischen T-Lymphozyten genutzt. Er soll im Folgenden aber nicht mehr thematisiert werden.

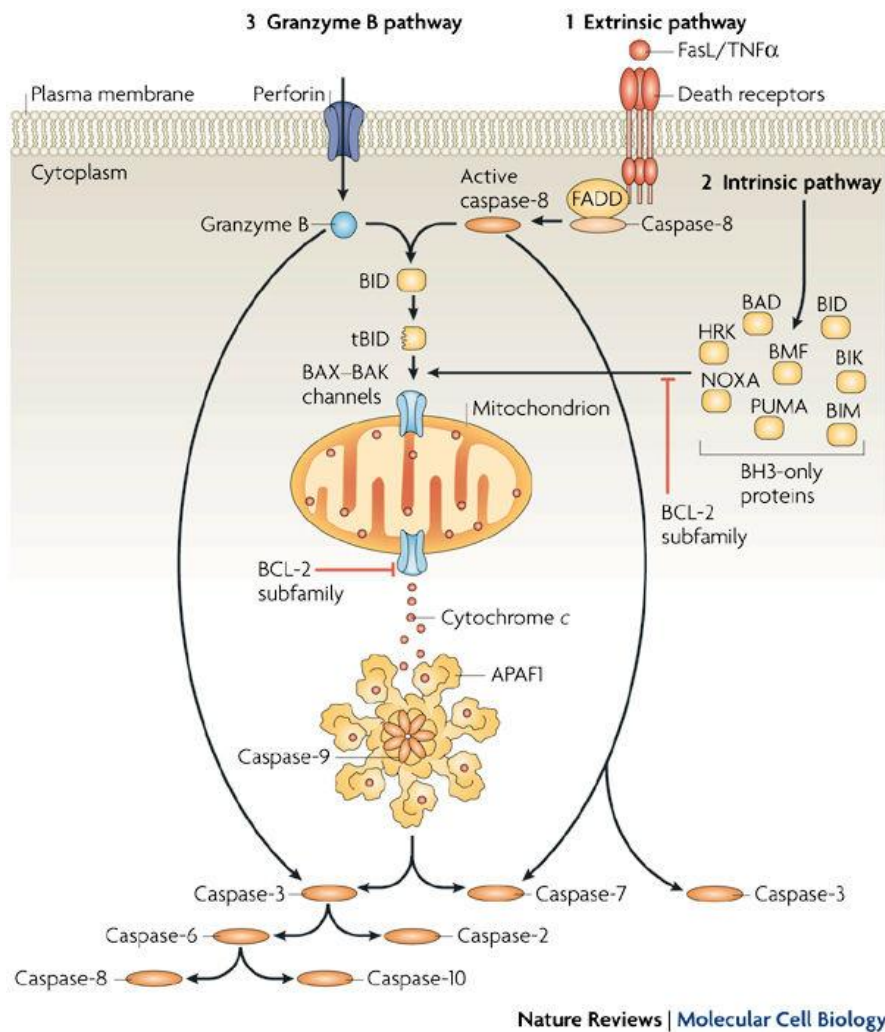


Abbildung 1: Apoptosewege und gemeinsame Endstrecke der Apoptose (Taylor et al. 2008)

1.6.5 Gemeinsame Endstrecke der Apoptosesignalwege

Extrinsisch und intrinsisch induzierte Apoptose enden beide mit der Aktivierung von Effektorcaspasen, insbesondere Caspase 3 und 7. Diese bedingen mit der Spaltung wichtiger zellulärer Komponenten die Entstehung der morphologischen Kennzeichen der apoptotischen Zelle. So aktivieren sie einerseits durch Spaltung des Inhibitors ICAD die Caspase-assoziierte DNase (CAD), welche die nukleäre DNA in Fragmente von 180-200 bp aufspaltet [76]. Weiterhin bauen die Caspasen das in der Kernhülle enthaltene Lamin A und B ab, was morphologisch mit zur Karyorrhesis führt [77]. Auch Bestandteile des Zytoskeletts, darunter Mikrotubuli und Aktinfilamente, stellen Angriffspunkte für die Caspasen dar, wodurch es zur Schrumpfung der Zelle und zur Entstehung der „apoptotic bodies“ kommt [78]. Besonders relevant für die Erkennung

der apoptotischen Zelle durch Immunzellen ist die Translokation von Phosphatidylserin von der zytosolischen- zur extrazellulären Seite der Zellmembran. Auch hierbei spielen die Effektorcaspasen eine Rolle [79].

1.6.6 Thrombozytäre Apoptoseinduktion durch den FAS-Ligand

Während der für die extrinsische Apoptoseinduktion relevante FAS-Rezeptor auf einer Vielzahl von Zellen vertreten ist, blieb der dazu passende Ligand FASL vor allem einer Gruppe von Immunzellen, darunter NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Monozyten, vorbehalten [80]. Der erste Nachweis, dass daneben auch Thrombozyten eine membranständige Form des FASL exprimieren, wurde erstmals von Ahmad et al. erbracht [81]. Darüber hinaus konnten Schleicher et al. nachweisen, dass Thrombozyten via FASL Apoptose in Zellreihen von humanen und murinen neuronalen Zellen induzieren können. In einem *in vivo* Schlaganfall-Modell führte die Ausschaltung des thrombozytären FASL zu einer signifikanten Reduktion apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe [82].

1.7 Fragestellung

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten festgestellt, lässt sich die Funktion von Thrombozyten schon längst nicht mehr nur auf den Prozess der Hämostase beschränken. Gerade der GPIIb-Rezeptor spielt dabei mit seinen zahlreichen Interaktionspartnern eine wichtige Rolle (s. Abbildung 2) und nimmt auf verschiedene Pathologien Einfluss. So fand die Arbeitsgruppe um Kleinschnitz et al. erstmals heraus, dass eine Blockade des GPIIb-Rezeptors auf Thrombozyten zu einer signifikanten Reduktion des Infarktolumens und zu einer deutlichen Verbesserung des neurologischen Outcomes im Schlaganfallmodell führt [83]. Im ischämischen Schlaganfall wird ein Großteil des Periinfarktareals, auch als Penumbra bekannt, durch apoptotischen Zelluntergang bestimmt [84][85]. Nachdem Schleicher et al. den Einfluss von Thrombozyten durch Expression des FAS-Ligand auf die Apoptose dargestellt haben, stellt sich nun die Frage, ob der GPIIb-V-IX-Komplex und weitere thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren ebenfalls an dem Prozess der Apoptoseinduktion nach ischämischer Schädigung beteiligt sind. Das Verständnis eines solchen Einflusses könnte Aufschlüsse für die Therapie verschiedenster kardiovaskulärer Erkrankungen bieten.

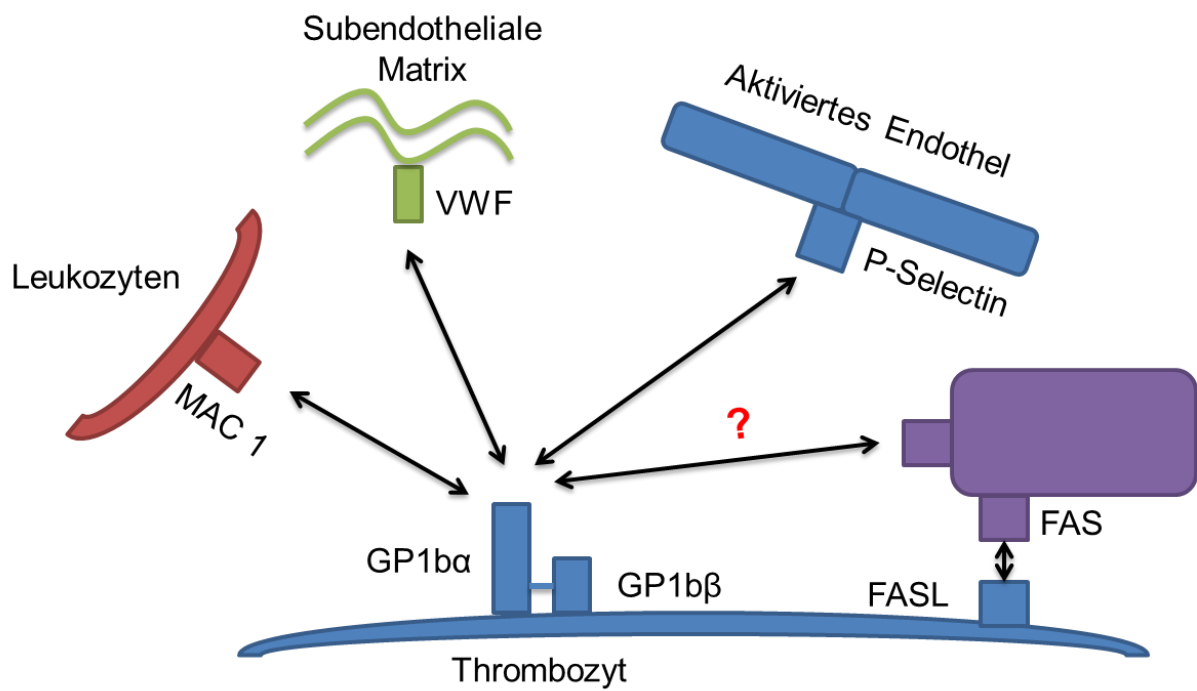


Abbildung 2: Interaktionsstellen des thrombozytären GPIb α -Rezeptors

Schematische Darstellung des thrombozytären GPIb-Rezeptors als Angriffspunkt für Liganden unterschiedlicher Zellen, darunter Leukozyten, Endothelzellen und extrazellulärer Matrix

2. Methoden und Materialien

2.1 Materialien

Puffer:

Tyrodes 10x:

- 80 g Natriumchlorid(AppliChem / A2942)
- 10,15g Natriumhydrogencarbonat (AppliChem / A3590, 0500)
- 1,95 g Kaliumchlorid(Roth / 6781.3)
- 1000ml Aqua dest.
- Sterilfiltrieren

Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose

- 0,2 g Albumin Fraction V (pH 7,0)(AppliChem / A1391, 0250)
- 0,2 g D(+)-Glucose(Sigma Ultra / G7528)
- 180 ml Aqua dest.
- 20 ml Tyrodes 10x (s.o.)
- HEPES Pufferan $\geq 99,5\%$ (Roth / 9105.3)
- Sterilfiltrieren

Tyrodes pH 6,5 + 0,1% BSA/Glucose

- 150 ml Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose (s.o.)
- 1N HCl auf pH 6,5
- Sterilfiltrieren

ACD-Puffer:

- 12,5 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Sigma / C1909)
- 6,82 g Citronensäure (AppliChem A3901,1000)
- 10 g D-(+)-Glucose(Sigma Ultra / G7528)
- Ad 500 ml mit Aqua dest.
- Mit NaOH auf pH 4,69
- Sterilfiltrieren

0,05% Tween-PBS:

- 2 PBS-Tablets(Gibco / 18912-014)
- 1 l Aqua dest.
- 500 µl Tween 20(Sigma / P1379)

PBS:

- 2 PBS-Tablets(Gibco / 18912-014)
- 1 l Aqua dest.

Zellmedien:

SH-SY5Y Medium:

- 500 ml DMEM/ F-12(Gibco / 11320-074)
- 50 ml FBS South American(life technologies /10270)
- 5ml Penicillin / Streptomycin (Sigma / P0781)

Caspase-Assay :

Caspase-Set:

- Apo-One Homogeneous Caspase-3/7 Buffer(Promega/G778A)
- Caspase Substrate Z-DEVD-R110, 100X(Promega/G777A)

Positiv-Kontrolle:

- Staurosporine(Invitrogen/1271)

Thrombozyten-Stimulanz:

- Adenosindiphosphat(Chrono-Log/384)

Antikörper:

- Rat IgG Isotype Control(ThermoFisher/ 02-9602)
- Rat anti-Mouse GPIIb α Monoclonal antibody(emfret analytics/M042-0)

TUNEL-Färbung:

Lösung für Positiv-Kontrolle:

- 20 µl DNase I recombinant(Roche/04716728001)
- 10 µl Tris-HCl(1M)(Sigma-Aldrich / T-3038)
- 170 µl BSA-Lösung (1mg/ml)
 - Albumin Fraction V (pH 7,0)(AppliChem/A1391,0250)
 - PBS-Lösung

Permeabilisations-Lösung:

- 200 µl Triton X-100 (Sigma-Aldrich / T8787)
- 200 mg tris-Natriumcitrat-Dihydrat (AppliChem/A3901)
- 200 ml PBS-Lösung

TUNEL-Mixture *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red*(Roche/12156792910)

- 50 µl Enzyme Solution
- 450 µl Label Solution

Immunfluoreszenzfärbung:

Primärantikörper:

- Anti-NeuN Antibody (Clone A60)(Merck Millipore / MAB 377)
- CD11b Monoclonal Antibody (5C6)(Thermo Fisher / MA5-16528)

Sekundärantikörper:

- Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG (H+L)(Invitrogen / A11001)
- Alexa Fluor 488, goat anti-rat IgG (H+L)(Invitrogen / A11006)

Negativ-Kontrolle:

- Normal mouse IgG(Santa Cruz / SC 2025)
- Rat IgG Isotype Control (Invitrogen / 02-9602)

DAPI for nucleic acid staining(Sigma Aldrich / D9542)

Ziegen-Serum (Normal)(Dako / X0907)

Fluorescence Mounting Medium(Dako / S3023)

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Mayers Hämalaunlösung(Merck Millipore/ 109249)

Eosin G Lösung 1% wässrig(Roth/ 3137.1)

Roti-Histol(Roth/ 6640.1)

Roti-Histokitt(Roth/ 6638.2)

2.2 Mäuse

Bei den als Kontrolltiere verwendeten Wildtyp-C57BL/6-Mäusen handelt es sich um eine Weiterzuchtung in unserer Tierhaltung aus dem Bestand von Jackson Laboratory (Charles River, Sulzfeld). Sowohl die Linie der GPIIb α (-/-)-Mäuse als auch der GPIIb α -IL-4R α -tg-Mäuse wurde von Jerry Ware (University of Arkansas) bereitgestellt. Die Behandlung der verwendeten Mäuse erfolgte nach deutschen Tierschutzrechtlinien.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

SH-SY5Y gehört zur Linie der humanen Neuroblastomzellen (SK-N-SH), welche erstmals 1970 aus Knochenmetastasen eines vier Jahre alten Mädchens gewonnen wurden. Sie bilden beim Wachsen kurze Fortsätze (Neuriten) aus und liegen sowohl adhären an der Flaschenwand als auch als Klumpen im Medium schwebend vor. Zur Kultivierung wurde ein Medium aus DMEM/ Ham's F12 im Verhältnis 1:1 mit Zusatz von FBS (10%) und Penicillin/ Streptomycin (1%) verwendet. Für die Subkultivierung wurde ein Verhältnis von 1:20 gewählt. Die Zellen stammen von der Firma Cell Lines Service aus Eppelheim (Deutschland).

2.3.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% inkubiert, alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (Heraeus HERAsafe HS18). Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² verwendet. Beim Passagieren der Zellen erfolgte zunächst ein Waschvorgang mit PBS, anschließend konnten die adhärenen Zellen durch dreiminütige Inkubation mit Trypsin von der Zellflasche abgelöst werden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde Zellmedium hinzugegeben. An dieser Stelle fand auch die Auszählung der Zellen in einer Neubauerzählkammer statt. Die Zellsuspension konnte daraufhin bei 450 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Es folgte die Resuspendierung des Zellpellet in Medium und das Splitten der Zellen nach dem entsprechenden Verhältnis.

2.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie in Schritt 2.2 beschrieben abgelöst, ausgezählt, zentrifugiert und mit einem entsprechenden Volumen von neuem Medium resuspendiert, sodass die Zellkonzentration 3x10⁶ Zellen auf 2 ml entsprach. Dem Medium waren 10% DMSO und 10% FCS zugesetzt. Im nächsten Schritt wurden je 2 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -80°C und dann langfristig bei -150°C eingefroren. Da das DMSO zytotoxische Wirkung aufweist, musste das Auftauen der Zellen relativ schnell im 37°C warmen Wasserbad erfolgen. Sofort danach wurde frisches Medium zugegeben und die Zentrifugation der Suspension durchgeführt. Der Überstand wurde dabei verworfen, während die Zellen nach Resuspendierung in eine neue Zellkulturflasche ausgesät werden konnten.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer vorgenommen. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Nach Färbung durch Zugabe von Trypanblau zu einer Probe der Suspension im Verhältnis 1:1 konnten die Zellen in der Zählkammer ausgezählt werden. Die Zellzahl in der Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{X}{4} \times V \times F \times 10^4$$

mit X = Gesamtzellzahl in allen vier Quadranten, V = Volumen der Probe und F = Verdünnungsfaktor

Eine gewünschte Zellzahl zu erhalten, musste die Probe mit der entsprechenden Menge Medium verdünnt werden.

2.4 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut

Das Verfahren richtete sich nach der Beschreibung von Schleicher et al. (2015). Das dem narkotisierten Versuchstier retrobulbär entnommene Vollblut wurde im ersten Schritt in einem Eppendorf-Gefäß mit 300 µl ACD-Puffer aufgefangen. Anschließend erfolgte die vorsichtige Umpipettierung in ein FACS-Röhrchen, zu welchem außerdem Tyrodes-Puffer pH-Wert 6,5 bis zum einem Volumen von 2 ml hinzugegeben wurde. Die Suspension wurde daraufhin für 20 Min bei Raumtemperatur und 120 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) konnte danach langsam abgenommen und in ein neues FACS-Röhrchen gegeben werden, welches mit Tyrodes pH 6,5 bis 4 ml aufgefüllt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Min bei 2.600 x g und Raumtemperatur mit Bremse erfolgte das Abgießen des Überstandes und die Resuspension sowie Neutralisation des Pellets mit 500 µl Tyrodes-Puffer (jeweils zur Hälfte pH 6,5 und 7,4). Die Zahl der Thrombozyten in der Probe wurde mit Hilfe des Sysmex bestimmt.

2.5 Caspase-Assay

Das Prinzip des im Versuch verwendeten Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assays aus dem Hause Promega basiert auf dem Hinzufügen eines Z-DEVD-Rhodamine-110-Substrats zur Probe, welches von den Caspasen 3 bzw. 7 zum fluoreszierenden Rhodamine 110 umgesetzt wird. Dieses Fluoreszenzprodukt kann mittels des Fluoreszenzmessgeräts Glomax Multi Detection System (Promega) quantifiziert werden.

Für die Messung wurden immer Duplets zu je 100 µl mit einer Suspension aus isolierten Thrombozyten und Tyrodes-Puffer pH 7,4 (Konzentration 100 Mio. Thrombozyten/ 100 µl) auf eine 96-well Platte aufgetragen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Platte bei Raumtemperatur mit 600 x g für 5 Min und die Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Nachdem die Thrombozyten einmalig mit PBS gewaschen wurden, konnten pro Well 88 µl PBS und 2 µl Calciumchlorid (0,1 M) hinzugegeben werden. Im nächsten Schritt wurde ein Teil der Proben durch Zugabe von 10 µl ADP (100 µM) pro Well für 5 min aktiviert, bevor die

Fixierung der Thrombozyten mittels 100 µl 2-prozentigem PFA über 10 bis 15 Min erfolgen konnte.

In Versuch 3.1.2 fand an dieser Stelle die Inkubation für eine Stunde mit dem GPIIb-Antikörper bzw. der IgG-Kontrolle bei einer Konzentration von 100 µg/ml statt. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag waren zunächst die Jurkat-Zellen zu ernten und auf 20.000 Zellen pro 100 µl einzustellen. Die Proben wurden im Inkubator auf 37 °C erwärmt und dann drei Mal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt konnte die Jurkat-Zell-Suspension zu je 100 µl auf die Wells verteilt werden. Für die Positiv-Kontrolle wurde STS (1µM/Well), für die Negativ-Kontrolle dagegen ausschließlich Jurkat-Zellen in Jurkat-Medium verwendet. Als Blank-Probe diente Jurkat-Medium ohne Zellen.

Im Weiteren wurde die Platte für 5 min bei 360 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Probe sollte nun für sechs Stunden bei 37 °C inkubiert werden. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Caspase-3/7-Reagenz in jedes Well sowie die erneute Inkubation bei 37 °C in Dunkelheit und 26 x g auf der Schüttelplatte. Im letzten Schritt konnte die Fluoreszenz nach einer Stunde im Glomax bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm bestimmt werden. Weitere Messungen erfolgten im Abstand von einer Stunde bis zu einem Zeitpunkt von 17 Stunden nach Zugabe der Caspase-Reagenz.

2.6 Immunhistochemische Färbungen neuronaler Zellen in murinen Gehirnkryoschnitten

2.6.1 TUNEL-Staining an murinen Gefrierschnitten

In diesem Versuchsabschnitt wurde das „in situ cell death detection kit TMR red“ der Firma Roche verwendet. Die als TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, kurz TUNEL, bezeichnete Färbemethode basiert auf dem Anhängen von markierten Nukleotiden an die bei Apoptose freierwerdenden 3'-OH-Gruppen von DNA-Fragmenten durch das Enzym TdT. Die markierten Nukleotide können anschließend im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zunächst erfolgte dafür die Fixierung der gefrorenen Hirnschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 4-prozentigem Paraformaldehyd. Anschließend wurden die Proben zwei Mal je 15 Min mit PBS gewaschen und für 2 Min in Permeabilisationslösung inkubiert. Der nächste Schritt

bestand in zwei erneuten Waschgängen für 5 min in PBS. Für die Positiv-Kontrolle wurde eine Probe für 10 Min mit der Kontrolllösung behandelt. Während zur Negativ-Kontrolle im Anschluss nur Markierungslösung gegeben wurde, konnten alle anderen Proben mit der TUNEL-Färbemischung bedeckt werden. Die Schnitte wurden nun für 1h bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang für je 5 Min mit PBS. Im Folgenden konnte mit der Immunfluoreszenz-Färbung und der Detektion am Fluoreszenzmessgerät fortgeföhren werden.

2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung an murinen Gefrierschnitten

Diese Methode schloss sich an das TUNEL-Staining der gefrorenen Hirnschnitte an. Die Schnitte wurden zunächst für 30 Min bei Raumtemperatur mit 10%igem Ziegen-Serum (Verdünnung mit PBS) behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer. Als Kontrolle wurde ein IgG-Antikörper verwendet. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für je 8 Min in Tween-PBS 0,05% gewaschen und dann für 30 Min erneut in 10%iges Ziegen-Serum gegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 (Verdünnung 1:1000 mit PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Es folgte ein zweimaliger Waschvorgang von je 8 Min in Tween-PBS 0,05%, bevor die Schnitte 3 Min lang mit DAPI (Verdünnung 1:3000 in PBS) gefärbt wurden. Nach zweiminütigem Waschen in PBS konnten die Proben mit Mounting Medium eingedeckt und bei 4 °C dunkel gelagert werden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Observer Z1).

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung an murinen Gefrierschnitten

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden Gefrierschnitte der murinen Hirne von je 10 µm Dicke angefertigt, wobei jeder 10.Schnitt angefärbt wurde. Nach einer Antrocknungsphase von 10 Min erfolgte die Färbung für 10 Min in Mayers Hämalaun-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Min in fließendem Leitungswasser gewaschen. Einer Färbephase von 30 Sek in Eosin-Lösung 1% schloss sich die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 2x100%) an. Nach 3-minütigem Bad in Rotihistol-Lösung wurde die Schnitte mit Rotihisto-Kit eingedeckt.

Zur Entwicklung des Thrombose-Index wurden pro Tier in 5 Schnitten die offenen und verschlossenen Gefäße ausgezählt und nach folgender Formel in Relation zueinander gesetzt.

$$\text{Thrombose – Index} = \frac{\text{Anzahl Gefäße offen}}{\text{Anzahl Gefäße offen} + \text{verschlossen}}$$

Von den Schnitten wurden Aufnahmen mit einem Nikon-Optiphot 2-Mikroskop und NIS-Elements-Basic-Research-Software (Nikon, Tokyo/Japan) angefertigt.

2.7 Statistik und Darstellung

Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu bestimmen, wurden sowohl der unverbundene t-Test als auch der Man-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5% festgelegt. Für die Analyse der Daten wurde das Programm IBM SPSS Statistics verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 *In vitro* – Caspase-Assay

***In vitro* Blockade des GPIIb α -Rezeptors reduziert die thrombozyteninduzierte Apoptose nicht**

Wie in der Arbeit von Schleicher et al. ermittelt werden konnte, induzieren aktivierte Thrombozyten über den FAS-Ligand Apoptose in einer Reihe von Zellen, darunter Neuroblastomzellen und primären murinen Neuronen.[82] Im Folgenden stellte sich die Frage, inwieweit neben dem FAS-Liganden weitere thrombozytäre Rezeptoren für die Apoptoseinduktion eine Rolle spielen, beispielsweise zur Etablierung der Adhäsion zwischen Thrombozyt und Zielzelle.

Als eine mögliche Überlegung kam eine direkte Interaktion des GPIIb α -Rezeptors mit einem Liganden auf der Zielzelle oder dem FAS-Ligand als Voraussetzung für die Apoptoseinduktion in Frage. Um dies zu überprüfen wurden Thrombozyten aus Wildtyp-Tieren mit einem Antikörper gegen den GPIIb α -Rezeptor (pOpB) bzw. einer IgG-Kontrolle inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) zu beiden Ansätzen und die Bestimmung der Apoptose-Aktivität über 17 Stunden mittels eines Caspase-Assays. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Thrombozyten mit GPIIb α -Blockade und der unspezifischen IgG-Kontrolle (Abb.3).

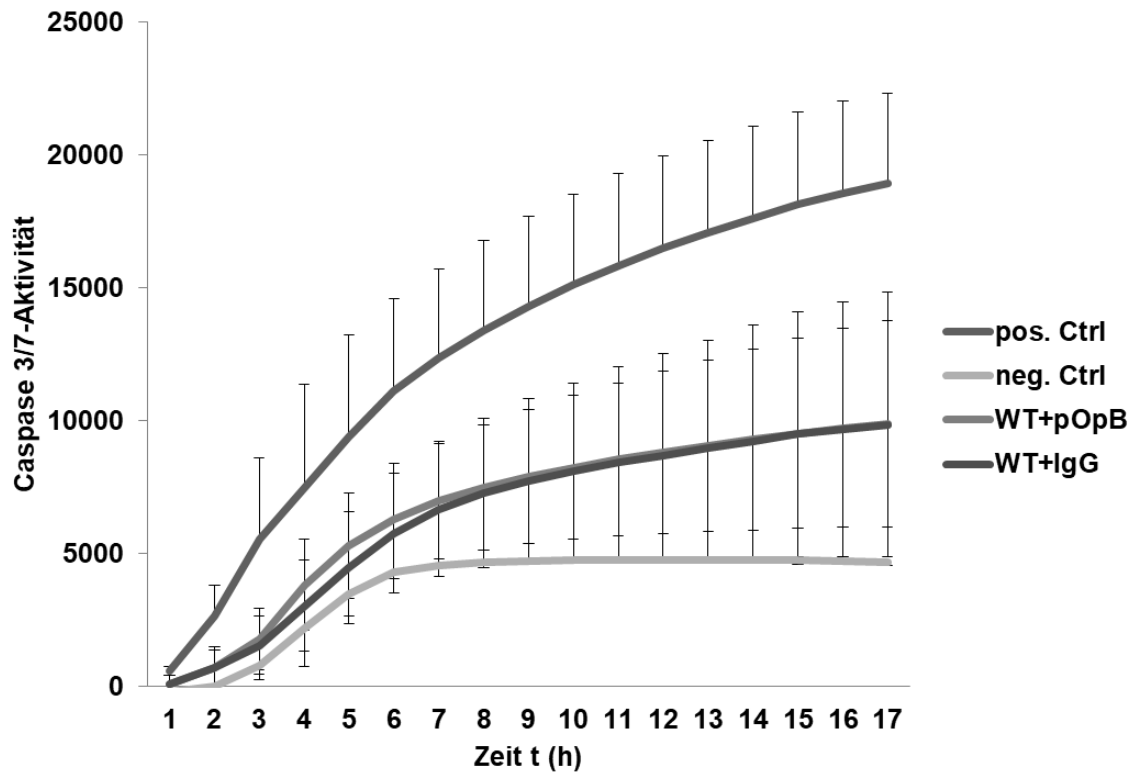


Abbildung 3: Keine Reduktion der thrombozyteninduzierten Apoptose in Neuroblastomzellen nach Zugabe von GPIIb α -Antikörper (pOpB)

Zu Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) wurden aktivierte Thrombozyten aus C57BL/6J Mäusen ($n=7$) gegeben. Nach Fixation erfolgte die Inkubation der Thrombozyten mit pOpB-Antikörper bzw. IgG-Kontrolle für eine Stunde bei einer AK-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. Anschließend wurde die Messung der Caspase-Aktivität stündlich über 17 Stunden durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM

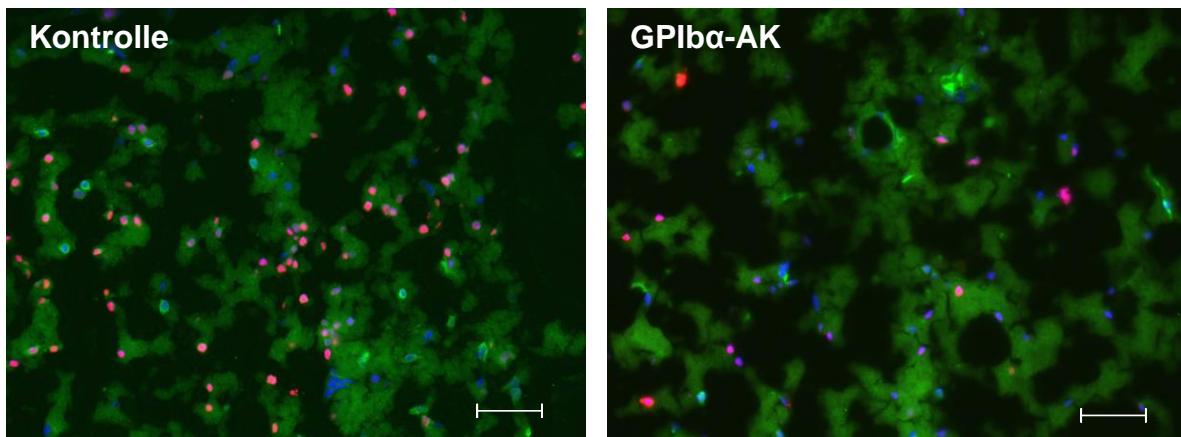
Die Daten zeigten keinen Effekt durch die antikörpervermittelte Blockade des GPIIb α -Rezeptors *in vitro* auf die thrombozyteninduzierte Apoptose in Neuroblastomzellen.

3.2 In vivo – TUNEL-Staining/ Immunfluoreszenz

3.2.1 Injektion eines GPIIb/IIIa-Antikörpers reduziert thrombozyteninduzierte Apoptose im tMCAO-Modell

Im Folgenden sollte die Rolle des GPIIb/IIIa-Rezeptors bei der Apoptoseinduktion an einem *in vivo* Modell überprüft werden. Dazu wurde Wildtyp-Mäusen intraperitoneal GPIIb/IIIa-Antikörper (pOpB) bzw. eine IgG-Kontrolle injiziert. Im nächsten Schritt induzierte man bei den Tieren durch 60-minütigen Verschluss der Zerebralarterie (tMCAO) einen Schlaganfall. Zur weiteren Untersuchung des Schlaganfallgewebes wurden daraus Gefrierschnitte hergestellt und apoptotische (TUNEL-positive) sowie kernhaltige Zellen (DAPI) in den Schnitten angefärbt. Exemplarisch für die Stichprobenzahl von $n = 4$ sind in Abb. 4 A die Unterschiede zwischen den beiden Proben qualitativ dargestellt. Das quantitative Verhältnis von Apoptose zur Gesamtzellzahl ist als Apoptoserate im Schaubild 4 B ersichtlich. Wie aus Abb. 4 A und B hervorgeht, ist die Apoptoserate in den Tieren, welche den GPIIb/IIIa-Antikörper erhalten haben, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

A.



B.

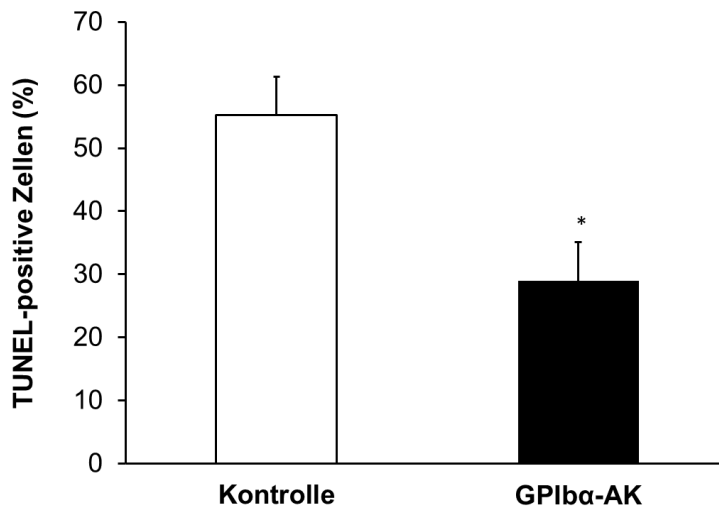


Abbildung 4: Injektion eines GPIb α -Antikörpers reduziert thrombozyten-induzierte Apoptose im tMCAO-Modell

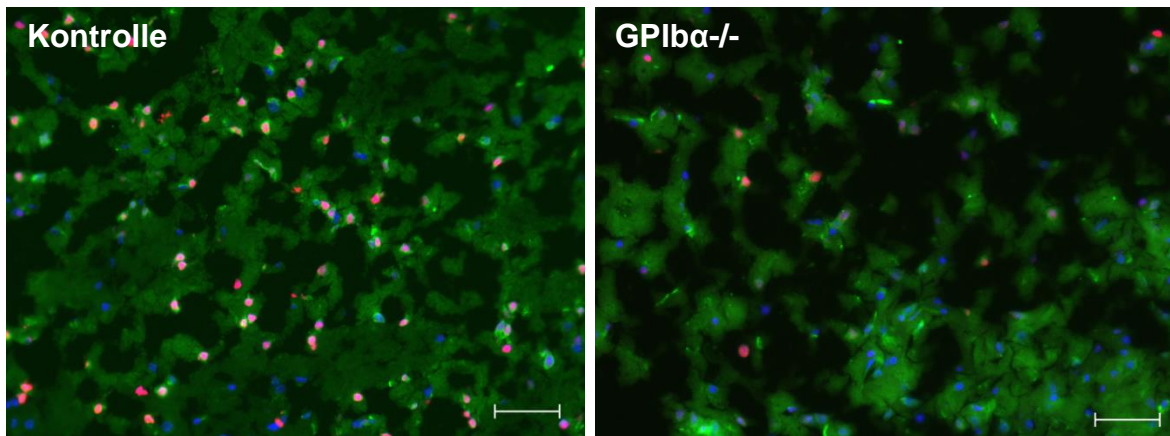
(A.) Beispielaufnahmen der murinen Hirnschnitte nach Schlaganfallinduktion durch Verschluss der mittleren Zerebralarterie (tMCAO). In den Aufnahmen erscheinen apoptotische Zellen (TUNEL-Staining) in rot, Zellkerne in blau (DAPI) und Neuronen in grün (antiNeuN). Maßstabsbalken = 50 μ m. (B.) Darstellung der TUNEL-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtheit aller Zellen (Mittelwert \pm SEM, $n = 4$, * $p \leq 0,05$)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der antikörpervermittelten Blockade des GPIb α -Rezeptors *in vitro* (s. Abschnitt 3.1.2) zeigte sich im *in vivo* Schlaganfallmodell ein signifikanter Rückgang der TUNEL positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen im Hirngewebe nach Behandlung der Tiere mit GPIb α -Antikörper.

3.2.2 Verlust des GPIb α -Rezeptors führt zur verringerten thrombozyteninduzierten Apoptose *in vivo*

Nach dem Schlaganfallmodell mit Antikörpervorbehandlung in 3.2.1 sollte der Einfluss des GP1b α -Rezeptors auf die Apoptose an einem Knockout-Modell überprüft werden. Dazu wurde das tMCAO-Verfahren auf GPIb α -defiziente sowie wildtypische Mäuse angewandt. Die Färbung der apoptotischen Zellen erfolgte wieder nach der TUNEL-Methode, Zellkerne wurden wie im vorangegangenen Abschnitt mit einer DAPI-Immunfluoreszenzfärbung angefärbt. In Abbildung 5 A sind beispielhaft Schnitte aus beiden Proben dargestellt. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, war die Apoptoserate in den Hirnschnitten der GPIb α -Knockout-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

A.



B.

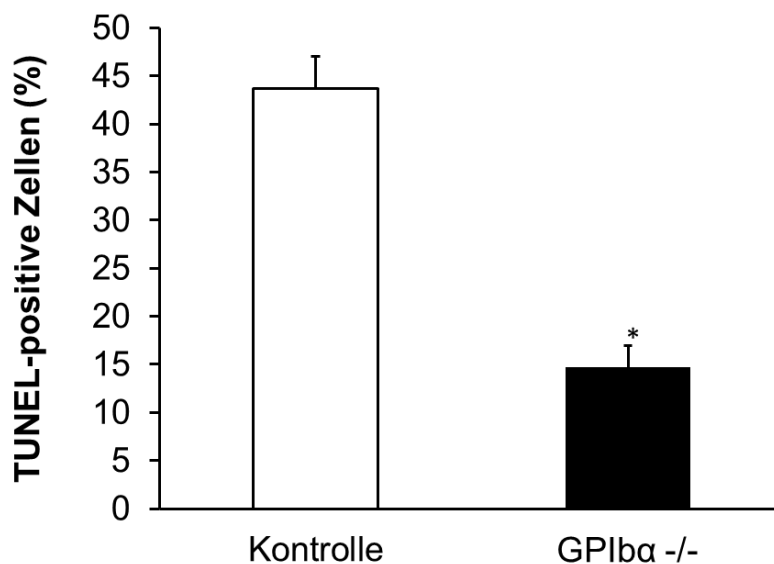


Abbildung 5: Reduzierte thrombozyteninduzierte Apoptose im tMCAO-Modell bei GPIIb α -knockout-Tieren

(A). Beispielaufnahmen der murinen Hirnschnitte nach Schlaganfallinduktion. In den Aufnahmen erscheinen apoptotische Zellen (TUNEL-Staining) in rot, Zellkerne in blau (DAPI) und Neuronen in grün (antiNeuN). Maßstabsbalken = 50 μ m (B.) Die Darstellung der apoptotischen Zellen gegenüber den Zellkernen wurde mittels TUNEL-Staining und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die vorliegenden Daten stellen den prozentualen Anteil der TUNEL-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl dar. (Mittelwerte \pm SEM, n = 5, *p \leq 0,05)

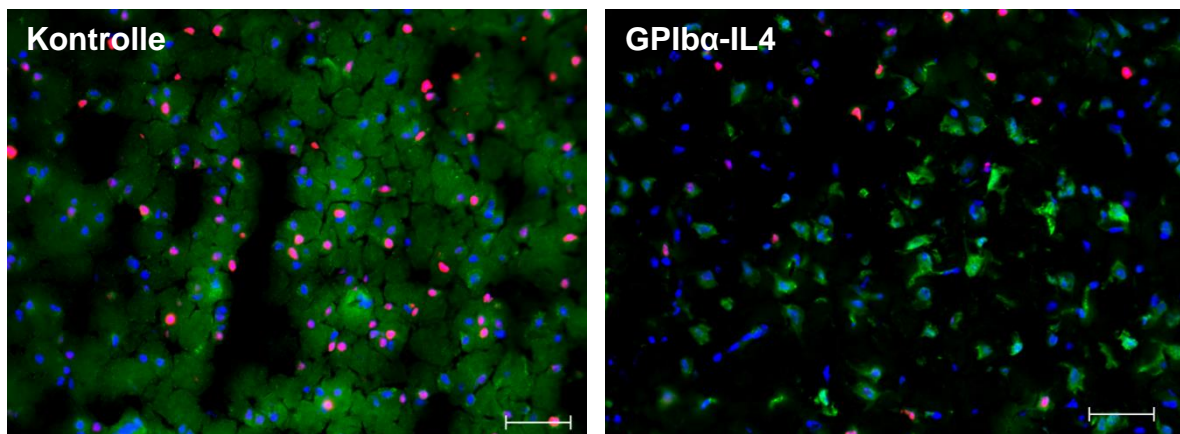
Sowohl eine antikörpervermittelte Blockade (Abschnitt 3.2.1) als auch eine Defizienz des GPIIb α -Rezeptors führen zu einer Verminderung der Apoptoserate im Hirngewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.3 Verlust des extrazellulären Anteils des GPIIb α -Rezeptors führt zu reduzierter thrombozyteninduzierter Apoptose in vivo

Bei den im vorausgegangenen Abschnitt verwendeten GPIIb α -defizienten Tieren ist neben dem extrazellulären GPIIb α -Anteil auch der intrazelluläre Rezeptoranteil ausgeschaltet [46]. Dies führt unter anderem dazu, dass die Thrombozytenbildung im Knochenmark stark eingeschränkt ist und die Knockout-Tiere dementsprechend unter einer Thrombozytopenie leiden. Um den Einfluss der Thrombozytenzahl auf das Messergebnis zu reduzieren, wurde im Folgenden ein GPIIb α -IL4-Modell verwendet, in dem es zu einem Austausch der extrazellulären Domain des GPIIb α -Rezeptors kommt, der zytoplasmatische, für die Thrombozytogenese wichtige Anteil jedoch erhalten bleibt. Auf diese Weise erreichen GPIIb α -IL4-Tiere eine Thrombozytenzahl von annähernd 70% des WT-Wertes [47].

Dementsprechend wurde das Schlaganfallverfahren (tMCAO) auf GPIIb α -IL4-Mäuse sowie eine Gruppe Kontrolltiere angewendet. Wie auch in den vorangegangenen Versuchen erfolgte eine Färbung der apoptotischen Zellen (TUNEL) und der Zellkerne (DAPI) an kryokonservierten Hirnschnitten aus den verwendeten Tieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Apoptoserate in den Schnitten aus GPIIb-IL4-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl qualitativ als auch quantitativ signifikant erniedrigt war (s. Abbildung 6 A und B).

A.



B.

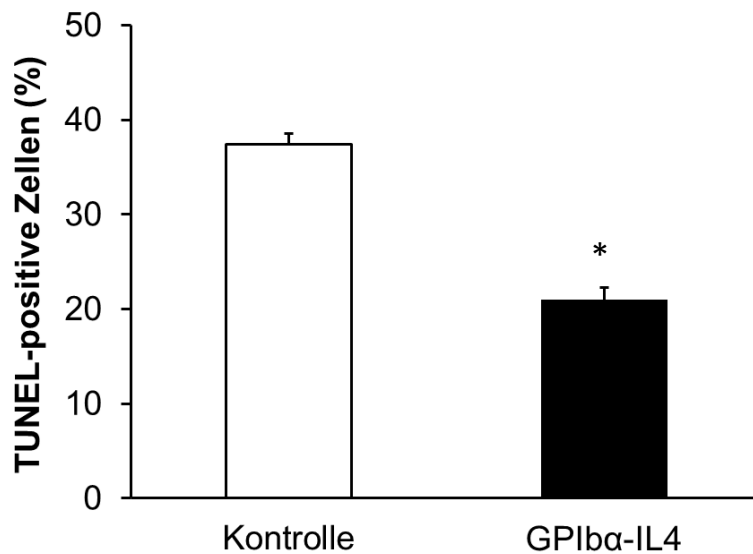


Abbildung 6: Reduzierte thrombozyteninduzierte Apoptose im tMCAO-Modell bei GPIb α -IL4-Tieren

(A.) Beispielaufnahmen der Hirnschnitte nach Verschluss der mittleren Zerebralarterie (tMCAO). In den Aufnahmen erscheinen apoptotische Zellen (TUNEL-Staining) in rot, Zellkerne in blau (DAPI) und Neuronen in grün (antiNeuN). Maßstabsbalken = 50 μ m (B.) Die Darstellung der apoptotischen Zellen gegenüber Zellkernen wurde mittels TUNEL-Staining und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Daten repräsentieren das Verhältnis von TUNEL-positiven Zellen zur Gesamtheit aller Zellen (Mittelwerte \pm SEM, n = 9, *p \leq 0,05)

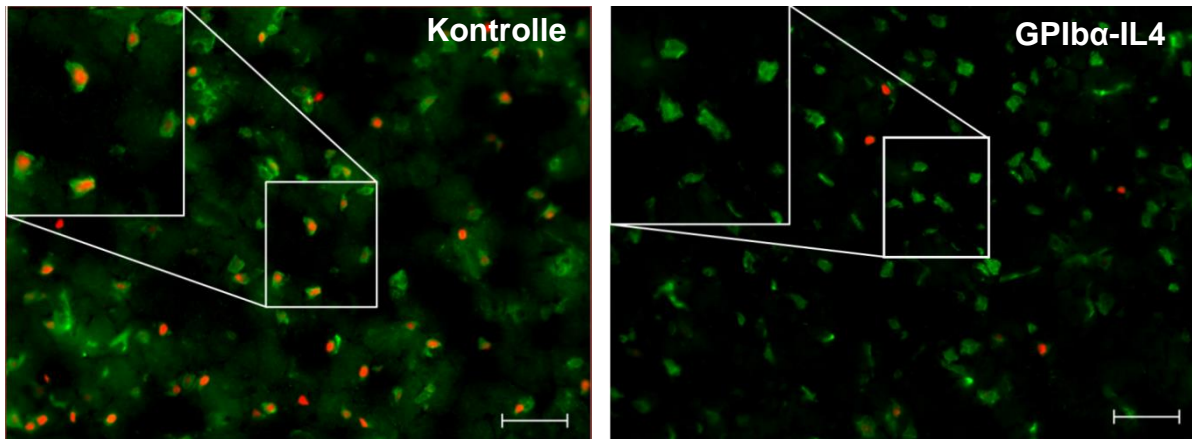
Wie im Abschnitt 3.2 festgestellt werden konnte, nimmt der extrazelluläre Anteil des thrombozytären GPIb α -Rezeptors unabhängig von der Thrombozytenzahl einen Einfluss auf die Apoptose *in vivo*. Nun stellt sich die Frage, ob sich dieser Effekt durch eine zelluläre Interaktion des Thrombozyten mit einer anderen Zelle erklären lässt oder sich der Effekt in einer geringeren Thrombusbildung bei GPIb α -Defizienz begründet.

3.2.4 Doppelfärbung von apoptotischen Zellen und Neuronen

Die bisher ermittelten Ergebnisse zeigen, dass der GPIb α -Rezeptor einen Einfluss auf die Apoptose im Schlaganfallmodell hat. Allerdings ist unklar, welche Zellen hierbei in die Apoptose gehen. Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde an Hirnschnitten von GPIb-IL4-Tieren bzw. Kontrolltieren aus dem Schlaganfallmodell eine Doppelfärbung von apoptotischen Zellen (TUNEL) und Neuronen (NeuN) vorgenommen. Anschließend wurden die Zahl der apoptotischen Neuronen sowie die Gesamtzahl der Neuronen ermittelt und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

Wie in den folgenden Abbildungen (s. Abbildung 7 A und B) erkennbar wird, liegen in der Kontrollgruppe im Verhältnis signifikant mehr apoptotische Neuronen als in der GPIb-IL4-Gruppe vor. So halbierte sich in der Knockout-Gruppe der Anteil der untergegangenen Neurone an der Gesamtzahl aller Neuronen nahezu im Vergleich zur Kontrollgruppe.

A.



B.

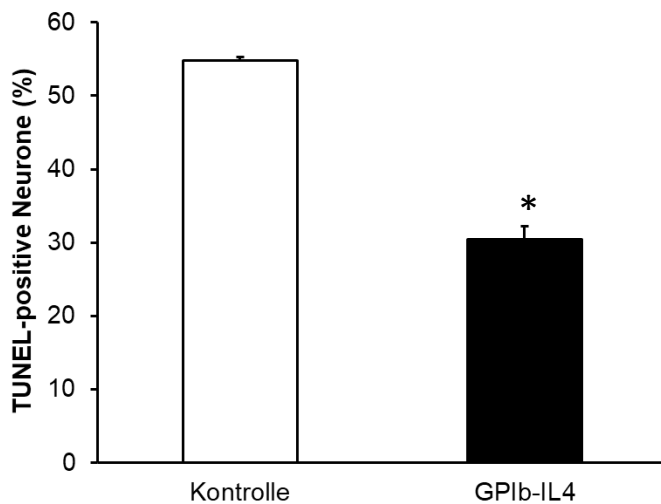


Abbildung 7: Defizienz des GPIb α -Rezeptors führt zu einer Reduktion der Apoptose von Neuronen im Schlaganfallmodell

(A.) Beispielbilder einer Doppelfärbung von Hirnschnitten aus GPIb-IL4- und Wildtyp-Tieren, an denen das tMCAO-Modell angewandt wurde. In den Aufnahmen erscheinen apoptotische Zellen rot (TUNEL) und Neuronen grün (NeuN). Maßstabsbalken = 50 μ m (B.) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven Neuronen an der Gesamtzahl aller Neuronen. (Mittelwerte \pm SEM, n = 6, *p \leq 0,05)

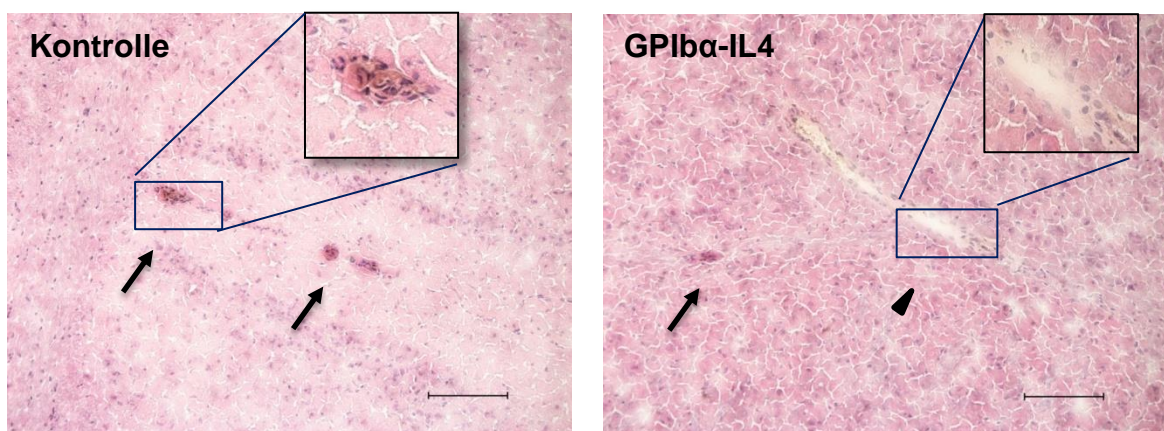
Die Defizienz des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf Thrombozyten führt damit zu einer signifikanten Reduktion der neuronalen Apoptose im Schlaganfallmodell. Nun muss untersucht werden, über welchen Signalweg die Apoptose in den Neuronen induziert wird.

3.3 In vivo – Thrombose-Index

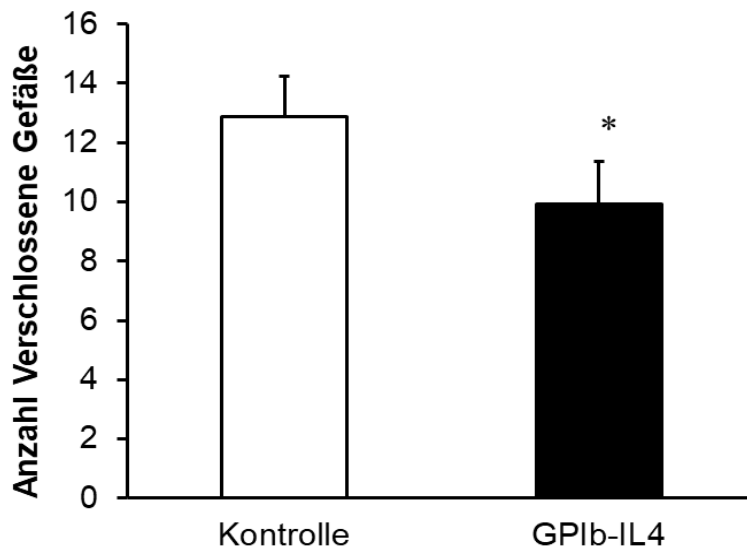
3.3.1 Thrombose in GPIIb/IIIa-IL4-Mäusen

Nachdem in Abschnitt 3.2.3 die Apoptose in GPIIb/IIIa-IL4-Mäusen untersucht wurde, stellte sich die Frage, inwieweit die Thrombose durch den Knockout des GPIIb/IIIa-Rezeptors beeinflusst wird. Um dem weiter nachzugehen, wurden Hirnschnitte von GPIIb/IIIa-IL4-Mäusen bzw. Kontrolltieren nach Durchführung des Schlaganfallmodells angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin/ Eosin gefärbt, woraufhin die Anzahl der thrombosierten und offenen Gefäße in der ischämischen Hemisphäre ausgezählt und in Relation zueinander gesetzt werden konnte. In Abbildung 8 A sind exemplarisch verschlossene und offene Gefäße abgebildet. Abbildung 8 B zeigt dabei sowohl die absolute als auch die relative Zahl der verschlossenen Gefäße. Wie aus den Abbildungen 8 A und B hervorgeht, kommt es in GPIIb/IIIa-IL4-Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Thromboserate um etwa ein Fünftel im Vergleich zu den Kontrolltieren.

A.



B.



C.

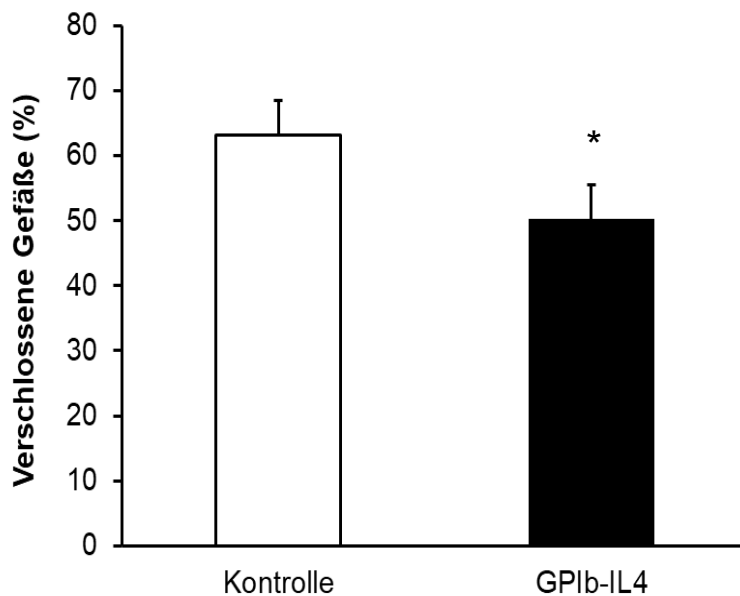


Abbildung 8: Defizienz des thrombozytären GPIb α -Rezeptors verringert die Thrombose im murinen Schlaganfallmodell

(A.) Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der HE-gefärbten Schnitte aus GPIb α -IL4-Tieren bzw. der Kontrollgruppe. Verschlussene Gefäße sind mit Pfeilen, offene Gefäße mit Dreiecken markiert. Maßstabsbalken = 100 μ m (B.) Dargestellt ist die absolute Anzahl thrombotischer Gefäße in der ischämischen Hirnhälfte von GPIb α -IL4-Tieren bzw. der Kontrollgruppe nach Schlaganfallinduktion (Mittelwert \pm SEM, n = 9, *p \leq 0,05) (C). Anteil der verschlossenen Gefäße an der Gesamtzahl aller Gefäße in der ischämischen Hirnhälfte (Thrombose-Index). (Mittelwert \pm SEM, n = 9, *p \leq 0,05)

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor spielt bei der Thrombogenese eine zentrale Rolle [21]. Dementsprechend führt ein Ausfall der Rezeptorfunktion zu einer verringerten Thrombusbildung im Schlaganfallgebiet. Im nächsten Schritt muss erörtert werden, in welcher Relation die Verringerung von Apoptose und Thrombose zueinander stehen.

3.3.2 Defizienz des GPIIb/IIIa-Rezeptors reduziert Thrombose signifikant weniger als Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe

In den Versuchsabschnitten 3.2.3 und 3.3.1 wurden Apoptose und Thrombose in GPIIb-IL4-Mäusen bestimmt. Beide Werte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. In Abbildung 9 wird zusammenfassend die relative Reduktion von Thrombose und Apoptose bei den Knockout-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe abgebildet. Auf der Vertikalachse ist dabei die jeweilige Reduktion in Prozent gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Alle Daten wurden bei einer Stichprobenzahl von $n = 9$ erhoben. Der Rezeptordefekt führte dabei zu einer deutlich stärkeren Verringerung der Apoptose als der Thrombose.

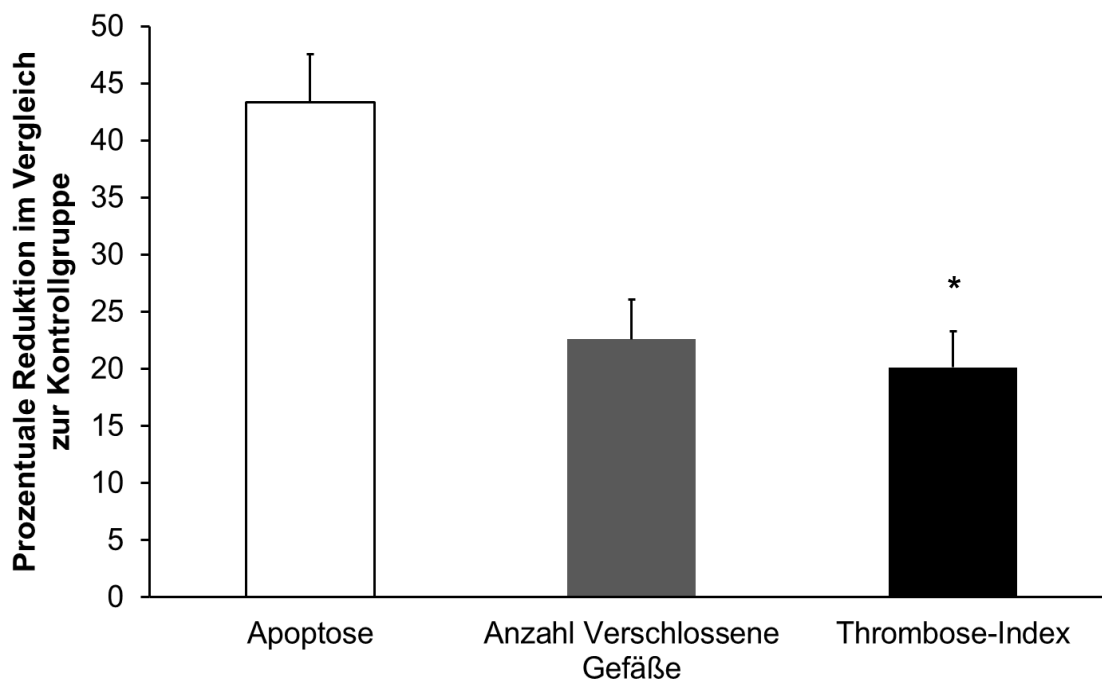


Abbildung 9: GPIIb/IIIa-Defizienz verringert Apoptose weitaus stärker als Thrombose im murinen Schlaganfallmodell

Die in Abschnitt 3.2.3 und 3.2.4 erhobenen Daten werden in diesem Schaubild zusammengeführt. Dargestellt ist, um wie viel Prozent der jeweilige Wert bei den GPIIb-IL4-Tieren im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist ($n = 9$, $*p < 0,05$)

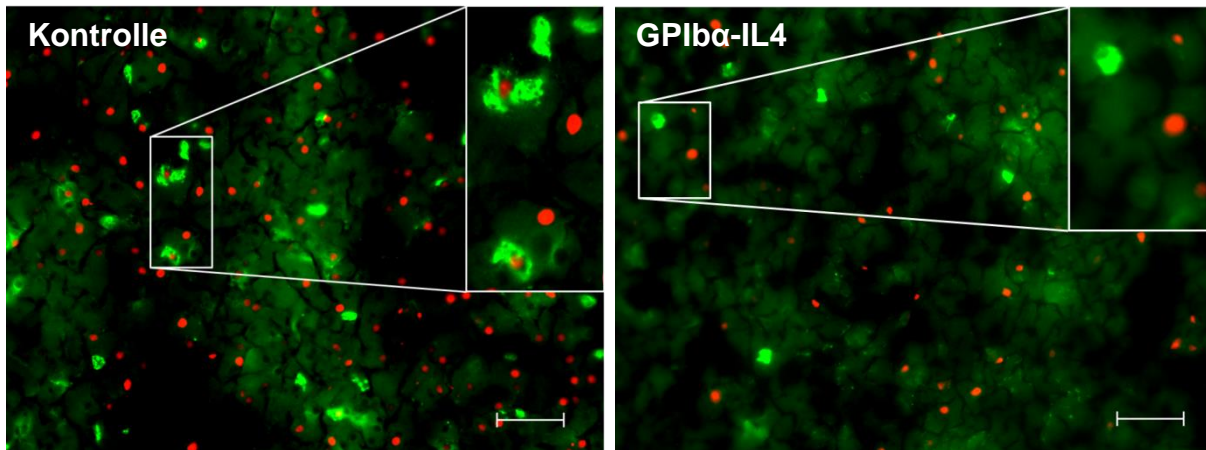
In dieser Zusammenfassung wird deutlich, dass durch Ausfall des GPIIb/IIIa-Rezeptors sowohl Thrombose als auch Apoptose signifikant reduziert werden. Allerdings sind die Auswirkungen auf die Apoptose deutlich stärker – dies spricht dafür, dass über den Einfluss der Thrombose hinaus ein Effekt des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die induzierte Apoptose besteht.

3.3.3 Verlust des extrazellulären GPIIb/IIIa-Rezeptors reduziert Leukozytenzahl und Apoptose von Leukozyten im Schlaganfallmodell signifikant

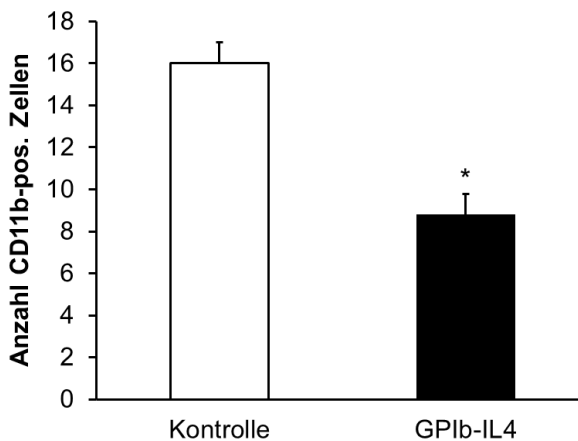
In den vorausgegangenen Abschnitten konnte ein Einfluss des thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die Apoptose im Schlaganfallmodell nachgewiesen werden. Um die Rolle der Leukozyten in diesem Vorgang zu untersuchen, wurden Hirnschnitte von GPIIb-IL4-Mäusen bzw. Kontrolltieren, an welchen das tMCAO-Modell angewendet worden war, mit einem CD11b-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper behandelt. CD11b bildet zusammen mit CD18 den MAC1-Rezeptor, welcher auf zahlreichen Leukozyten, darunter Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Neben dieser Immunfluoreszenzfärbung wurden wie in den vorangegangenen Abschnitten apoptotische Zellen (TUNEL) dargestellt. Dabei wurden doppelt positive, also sowohl TUNEL als auch CD11b positive, Zellen dargestellt und ihr Anteil an der Gesamtzahl aller CD11b-positiven Zellen ausgewertet.

Wie aus den folgenden Abbildungen (s. Abbildung) hervorgeht, war die Gesamtzellzahl CD11b-positiver Zellen in Schnitten von GPIIb-defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. In der Knockout-Gruppe ließen sich im Verhältnis zur Kontrollgruppe auch signifikant weniger apoptotische CD11b-positive Zellen darstellen.

A.



B.



C.

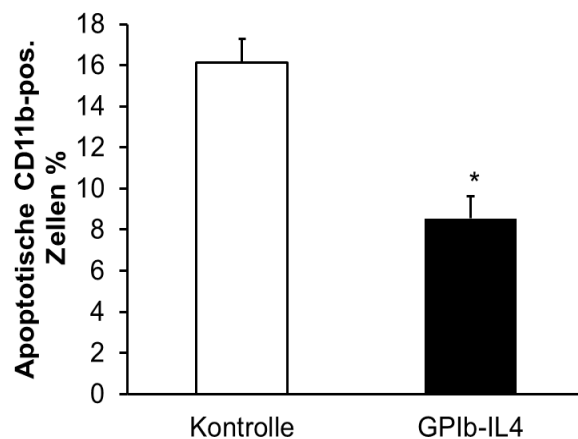


Abbildung 10: Leukozytenzahl im Schlaganfallmodell bei GPIIb-IL4-Tieren signifikant verringert

(A.) Exemplarische Aufnahmen der gefärbten Hirnschnitte nach Anwendung des tMCAO-Schlaganfallmodells. In der Färbung erscheinen apoptotische Zellen rot (TUNEL) und Leukozyten grün (CD11b). Maßstabsbalken = 50µm (B.) Vergleich der Leukozytenzahl in Hirnschnitten von GPIIb-IL4-Tieren bzw. einer Kontrolle nach Anwendung des Schlaganfallmodells (tMCAO). Leukozyten wurden mittels CD11b-Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Daten repräsentieren das Verhältnis von Leukozyten zur Gesamtzellzahl (Mittelwerte \pm SEM, $n = 5$, $*p \leq 0,05$) (C.) Die Abbildung baut auf dem gleichen Versuch wie in Abbildung 6.B auf. Hier wurden TUNEL-positive Leukozyten ausgewertet und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Leukozyten gesetzt (Mittelwert \pm SEM, $n = 5$, $*p \leq 0,05$)

Ein Defekt des GPIIb-Rezeptors reduziert die absolute Leukozytenzahl im Schlaganfallmodell signifikant. Auch der relative Anteil apoptotischer Leukozyten in den Knockout-Tieren ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert.

4. Diskussion

4.1 Thrombozyten in der Regulation kardiovaskulärer Erkrankungen

Thrombozyten nehmen eine zentrale Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ein und stellen damit potentielle Angriffspunkte in der Prävention und Therapie verschiedenster Pathologien wie dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall dar. In den letzten Jahren konnten dabei immer mehr Erkenntnisse zu den Funktionen von Thrombozyten außerhalb der reinen Hämostase gewonnen werden. So regulieren Blutplättchen die Inflammation im geschädigten Gewebe, erkennen Pathogene und tragen zur Induktion der Angiogenese bei [86]–[88]. Eine relativ neu entdeckte Funktion von Thrombozyten ist ihre Beteiligung in der Apoptose – so konnten Schleicher et al. den Nachweis erbringen, dass Thrombozyten in neuronalen Zellen über die Expression des FAS-Liganden Apoptose induzieren können [82]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche Rolle thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren in diesem Prozess einnehmen. Der GPIIb-V-IX-Komplex stellte sich als ein geeigneter Kandidat für die Untersuchung dar, da er zum einen durch die Bindung verschiedener Liganden den Kontakt von Thrombozyten zu Endothelzellen, Immunzellen und dem beschädigten Gewebe vermittelt. Zum anderen trug er in Versuchen von Kleinschnitz et al. in relevantem Ausmaß zur Entwicklung des Infarktareals im Schlaganfallmodell bei [83]. In diese Vorgänge weiter Licht zu bringen, könnte sich als Ansatzpunkt für neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

4.2 Direkte Interaktion des GPIIb α -Rezeptors mit der Zielzelle für Apoptose-induktion nicht nötig

Der GPIIb-Rezeptor weist Bindungsstellen für eine Vielzahl von Liganden auf: Über die Bindung von vWF ermöglicht er die primäre Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix im verletzten Gewebe, was für die weitere Ausbildung stabiler Bindungen nötig ist [22][18]. In der Interaktion mit Immunzellen erfolgt über den GPIIb-Komplex die feste Bindung an MAC1 auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten [50]. Eine Hypothese könnte nun darin bestehen, dass die Induktion von Apoptose durch Thrombozyten ebenfalls die Bindung des GPIIb-Rezeptors an die Zielzelle benötigt, um beispielsweise den Kontakt des FAS-Liganden mit dem FAS-

Rezeptor zu ermöglichen. In einem *in vitro* Modell mit humanen Neuroblastomzellen zeigte eine antikörpervermittelte Blockade des GPIb-Rezeptors allerdings keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch Thrombozyten. Dies spricht gegen eine direkte Interaktion von Blutplättchen mit der Zielzelle über diesen Rezeptor. Eine Vermittlung von Apoptose über einen indirekten Mechanismus kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt ein *in vivo* Modell für die Untersuchung der Apoptose angewandt.

4.3 GPIb-Defizienz im Schlaganfallmodell

Das Schlaganfallmodell wurde sowohl von Schleicher et al. für die Untersuchung der Apoptose als auch von Kleinschnitz et al. zur Darstellung der Auswirkung einer GPIb-Blockade genutzt. Deshalb wurde dieses Modell auch für das weitere Studium der Apoptose im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. Im ersten Schritt wurde ähnlich wie in der Arbeit von Kleinschnitz et al. (2007) der thrombozytäre GPIb-Rezeptor mittels Injektion eines Antikörpers vor der Schlaganfallinduktion blockiert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate in den Hirnschnitten. Kleinschnitz et al. hatten außerdem eine Reduktion des Infarktolumens und eine Verbesserung des neurologischen Outcomes dokumentiert [83]. Als nächstes wurde die Apoptose in einem GPIb-Knockoutmodell untersucht, in dem der GPIb-Rezeptor vollständig entfernt worden war. Auch hier lag signifikant weniger Apoptose in der Knockoutgruppe als in der Kontrollgruppe vor. Allerdings weisen die Tiere eine starke Thrombozytopenie sowie deformierte Thrombozyten auf [46]. Aus diesem Grund lässt sich die Wirkung der Apoptosereduktion nicht sicher auf das Fehlen des GPIb-Rezeptors zurückführen. Deutlich sicherer ist dies in einem Mausmodell möglich, bei dem nur der extrazytoplasmatische Teil des GPIb-Rezeptors gegen einen Teil des humanen IL4-Rezeptors α ausgetauscht wurde [47]. Im Schlaganfallmodell zeigten die GPIb α -IL4-Mäuse ebenfalls eine signifikante Reduktion der Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um weiter Aufschluss darüber zu erhalten, welche Zellen in diesem Modell in Apoptose gehen, wurde eine Doppelfärbung von apoptotischen Zellen und Neuronen angefertigt. Sowohl bei den GPIb-IL4-Tieren als auch bei der Kontrollgruppe zeigten sich apoptotische Neuronen, der Anteil war in der GPIb α -IL4-Gruppe allerdings signifikant reduziert. Tatsächlich ist eine Apoptoseinduktion in Neuronen über den FAS-Liganden gut denkbar – so konnten Felderhoff et al. nachweisen, dass

Neuronen den FAS-Rezeptor exprimieren und der Rezeptor nach einem Schlaganfall hochreguliert ist [91]. Des Weiteren stellten Li et al. fest, dass nahezu alle apoptotischen Zellen nach zerebraler Ischämie neuronaler Herkunft sind [92]. In einem weiteren Versuchsabschnitt stellte sich heraus, dass auch Leukozyten unter den apoptotischen Zellen im Schlaganfallmodell waren. Auch dies deckt sich mit dem aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand, wonach apoptotische Leukozyten in Hirngewebe nach Schlaganfall vorkommen [93]. Insgesamt konnte also festgestellt werden, dass ein Ausfall des thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptors zu einer signifikanten Reduktion der neuronalen Apoptose im Schlaganfallmodell führt.

4.4 Thrombose im Schlaganfall bei GPIIb/IIIa-Defizienz

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, über welchen Signalweg die Apoptose in den Neuronen induziert wird. Da der GPIIb/IIIa-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Thrombusbildung einnimmt, könnte sich der beobachtete Effekt möglicherweise ausschließlich auf eine Reduktion der Thrombose nach Schlaganfallinduktion zurückführen lassen. Tatsächlich führte die Defizienz des GPIIb/IIIa-Rezeptors bei GPIIb/IIIa-Mäusen zu einer sehr starken Reduktion der Thrombusbildung in durch FeCl₃ geschädigten Mesenterialgefäßen [94]. Auch in dem in dieser Arbeit vorliegenden Schlaganfallmodell zeigte sich die Anzahl thrombotischer Gefäße in den GPIIb/IIIa-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant reduziert. Interessanterweise stellte sich jedoch in einem Vergleich von Thrombose und Apoptose in den Knockout-Tieren heraus, dass der Wegfall des GPIIb/IIIa-Rezeptors einen weit stärkeren Einfluss auf die Apoptose als auf die Thrombose nahm. So war die Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe bei der Apoptose signifikant höher als bei der Zahl thrombotischer Gefäße. Dies spricht für einen über die reine Thrombusbildung hinausgehenden Effekt des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die Apoptose im Schlaganfallmodell. Auch die Arbeit von Kraft et al. deutet in diese Richtung – so hatte eine Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors, nicht jedoch des für die Thrombusbildung ebenfalls wichtigen GPIIb/IIIa-Rezeptors eine signifikante Auswirkung auf die Größe des Infarktvolumens im Schlaganfallmodell [95].

4.5 GPIIb/IIIa-Komplex und die Apoptose von Leukozyten

Seit langem ist eine Interaktion von Blutplättchen mit Leukozyten über den GPIIb/IIIa-Rezeptor bekannt. So bilden Leukozyten mit ihrem Integrin CD11b/CD18 (MAC1) eine stabile Bindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten aus. Im Rahmen von

Gefäßverletzungen kommt es über diese Bindung zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Schädigung sowie zu einer Migration der Leukozyten aus dem Gefäßlumen. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten spielt somit eine elementare Rolle bei der Regulation von akuten Entzündungsreaktionen. Im Schlaganfallmodell weisen Mäuse, welchen der leukozytäre MAC-1-Rezeptor, eine Bindungsstelle für den GPIIb/IIIa-Rezeptor, fehlt ein signifikant geringeres Infarktvolume auf [96][97].

Bezogen auf die vorausgegangenen Versuche stellte sich nun die Frage, ob der Einfluss des thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die Apoptose möglicherweise durch die Interaktion mit Leukozyten zu erklären ist. Tatsächlich ließ sich im Schlaganfallmodell bei GPIIb/IIIa-IL4-Tieren eine signifikante Verminderung der Leukozytenzahl im geschädigten Hirngewebe feststellen. Darüber hinaus lagen bei der GPIIb/IIIa-IL4-Gruppe im Vergleich zu WT-Tieren signifikant weniger apoptotische Leukozyten vor.

4.6 Mögliche Effektorwege des GPIIb/IIIa-Rezeptors bei der Apoptoseinduktion

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse lassen sich zu verschiedenen Erklärungsansätzen zusammenführen. Da eine Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors im *in vitro* Modell keine Auswirkungen auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose zeigte, scheint er in diesem Prozess als Korezeptor keine Rolle zu spielen. Auffällig war dagegen in den *in vivo* Versuchen, dass die Anzahl an Leukozyten im Gewebe bei Ausfall des Rezeptors deutlich vermindert war.

Eine Hypothese könnte nun darin bestehen, dass der thrombozytäre GPIIb/IIIa-Rezeptor für die Migration von Leukozyten ins geschädigte Gewebe von Bedeutung ist und diese dort wiederum eine vermehrte Apoptose von Neuronen bedingen. Die Arbeitsgruppe um Langer et al. konnte bereits demonstrieren, dass bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors zu einer verringerten Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe führt [86]. In einer weiteren Arbeit führte eine antikörpervermittelte Blockade der GPIIb/IIIa-MAC1-Interaktion zu einer deutlich verminderten Leukozyteneinwanderung in eine verletzte Gefäßintima [98]. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen den Leukozyten im Gewebe nicht weiter differenziert. Tatsächlich ist der für die Detektion der Leukozyten verwendete Antikörper CD11b auf verschiedenen Zellen präsent, darunter Neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten.

Gerade Monozyten stellen einen interessanten Ansatz für die Erklärung der Apoptosereduktion bei GPIIb/IIIa-Defizienz dar. So erleichtert die Bindung von Monozyten an Thrombozyten die Migration der Immunzellen durch eine Endothelmembran [99]. Gleichzeitig reduziert die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors die Bindung von Monozyten an aktiviertes Endothel signifikant [100]. Möglicherweise führt also der Ausfall des GPIIb/IIIa-Rezeptors zu einer verminderten Rekrutierung von Monozyten ins Gewebe. Da Monozyten über den FAS-Ligand Apoptose induzieren können, würde dies auch die geringer ausgeprägte neuronale Apoptose erklären [80][101]. Nicht ausgeschlossen werden kann auch ein Einfluss von Neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten, welche beide über den MAC-1-Rezeptor an Blutplättchen binden [102][103]. Gerade zytotoxische T-Lymphozyten sind ebenfalls zur Apoptoseinduktion über den FAS-Ligand in der Lage [104].

Weiterhin lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass Thrombozyten in der Lage sind, die Apoptose von Leukozyten zu beeinflussen. Die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion über den FAS-Ligand konnten Schleicher et al. in Thrombozyten bereits nachweisen [82]. Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, interagieren Thrombozyten mit Leukozyten über den GPIIb/IIIa-Rezeptor. Die in dieser Arbeit vorliegenden Versuche konnten zeigen, dass eine Defizienz des Rezeptors zu einer Verringerung der Apoptose in Leukozyten führt. Es wäre denkbar, dass Thrombozyten die Leukozytenaktivität im geschädigten Gewebe durch Apoptoseinduktion regulieren, dafür jedoch eine Bindung der Zellen über den GPIIb/IIIa-Rezeptor nötig ist. Da die absolute Zahl der Leukozyten im Hirngewebe bei Defizienz des Rezeptors allerdings abnimmt, scheint dies als Ansatz für die Erklärung der Reduktion der neuronalen Apoptose keine Rolle zu spielen.

Nicht zuletzt kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Defekt des GPIIb/IIIa-Rezeptors schlicht die Transmigration von Thrombozyten ins geschädigte Gewebe verringert. Schleicher et al. konnten zeigen, dass Blutplättchen nach einem Schlaganfall aus dem Gefäßsystem ins geschädigte Gewebe austreten [82]. Tatsächlich sind Thrombozyten zur Transmigration durch ein aktiviertes Endothel fähig [105]. Der GPIIb/IIIa-Komplex reguliert über die Interaktion mit P-Selektin und vWF den Kontakt von Thrombozyten zum Endothel bzw. zum Subendothel [55]. Es ist also denkbar, dass durch den Defekt des GPIIb/IIIa-Rezeptors weniger Blutplättchen an das

Endothel binden und ins Gewebe übertreten können, weshalb dort auch weniger thrombozyteninduzierte Apoptose vorliegt.

Weitere Versuche müssen den genauen Zusammenhang zwischen dem thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor und der Apoptose im Schlaganfallmodell untersuchen. Interessanterweise haben einige der Erklärungsansätze bereits Eingang in Therapiestudien zum Schlaganfall gefunden. Allerdings konnte eine antikörpervermittelte Blockade des MAC1-Rezeptors trotz deutlicher Reduktion des Infarktolumens im Tiermodell keinen Effekt auf das neurologische Outcome bei Schlaganfallpatienten erzielen [106]. Dagegen bewirkte eine antiapoptotische Therapie nach Schlaganfallinduktion eine deutliche Reduktion des Infarktolumens im Tiermodell [107]. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die Apoptose im Schlaganfallmodell stellen einen weiteren möglichen Schritt in Richtung einer Therapie des Schlaganfalls dar – so könnte eine gezielte antithrombozytäre Therapie eine neuroprotektive Wirkung über die reine Hemmung der Gerinnung hinaus haben.

5. Zusammenfassung

Thrombozyten sind zentraler Bestandteil der Blutgerinnung, regulieren darüber hinaus aber auch die Inflammation und den Zelluntergang im geschädigten Gewebe [86][108]. Seit kurzem ist bekannt, dass sie dabei über Expression des FAS-Liganden Apoptose in verschiedenen Zellen induzieren können [81][82]. Ob für die Induktion der Apoptose die Bindung weiterer Rezeptoren nötig ist, wurde bisher noch nicht erforscht.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass der GPIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten einen Einfluss auf die Apoptose im Schlaganfallmodell nimmt. Sowohl die antikörpervermittelte Blockade als auch eine Defizienz des Rezeptors in Knockout-Tieren konnte die Apoptose signifikant reduzieren. Die apoptotischen Zellen wurden dabei neuronaler sowie leukozytärer Herkunft identifiziert. Die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors *in vitro* konnte dagegen keine Reduktion der thrombozyteninduzierten Apoptose in Neuroblastomzellen nachweisen.

Der Einfluss des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf die Blutgerinnung legt nahe, dass der beobachtete Effekt der Apoptosereduktion auf eine verminderte Thrombusbildung nach Schlaganfallinduktion zurückzuführen ist. Die Auswertung der Thrombose in Wildtyp- und GPIIb/IIIa-IL4-Tieren zeigte jedoch, dass der Knockout des GPIIb/IIIa-Rezeptors einen weitaus größeren Effekt auf die Apoptose als auf die Thrombose im Schlaganfallmodell hat. Dies lässt an einen weiteren Mechanismus denken, über den der GPIIb/IIIa-Rezeptor die Apoptose mitreguliert.

Eine Untersuchung der Leukozyten in den Schlaganfalltieren konnte nachweisen, dass in GPIIb/IIIa-defizienten Tieren signifikant weniger Leukozyten im Hirngewebe vorliegen. Darüber hinaus ist auch die Apoptose von Leukozyten in den Knockout-Tieren signifikant reduziert. Möglicherweise führt der Verlust des GPIIb/IIIa-Rezeptors dementsprechend über eine Reduktion der Thromboinflammation zu einer verringerten Apoptose im Schlaganfallmodell. Weitere Versuche in diese Richtung müssen hier Aufklärung verschaffen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, dass Thrombozyten mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor über die reine Blutgerinnung hinaus einen Einfluss auf die neuronale Apoptose im Schlaganfall nehmen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] S. Bundesamt, "Gesundheit -Todesursachen in Deutschland," vol. 12, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2015.
- [2] R. Lozano *et al.*, "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010," *Lancet*, vol. 380, no. 9859, pp. 2095–2128, 2012.
- [3] M. Writing Group *et al.*, "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association," *Circulation*, vol. 133, no. 4, pp. 447–454, 2016.
- [4] S. Bundesamt, "Gesundheit - Krankheitskosten," vol. 7.2, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2010.
- [5] M. Gawaz, H. Langer, and A. E. May, "Platelets in inflammation and atherogenesis," *J Clin Invest*, vol. 115, no. 12, pp. 3378–3384, 2005.
- [6] C. Schulz *et al.*, "Chemokine Fractalkine Mediates Leukocyte Recruitment to Inflammatory Endothelial Cells in Flowing Whole Blood," *Circulation*, vol. 116, no. 7, 2007.
- [7] K. Daub *et al.*, "Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells," *FASEB J.*, vol. 20, no. 14, pp. 2559–2561, Dec. 2006.
- [8] P. M. Aggeler, J. Howard, and S. P. Lucia, "Platelet counts and platelet function," *Blood*, vol. 1, no. 6, pp. 472–496, 1946.
- [9] H. M. Nording, P. Seizer, and H. F. Langer, "Platelets in inflammation and atherogenesis," *Front Immunol*, vol. 6, p. 98, 2015.
- [10] L. J. Gay and B. Felding-Habermann, "Contribution of platelets to tumour metastasis," *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 123–134, 2011.
- [11] J. M. Paulus, "Platelet size in man," *Blood*, vol. 46, no. 3, pp. 321–336, 1975.
- [12] D. C. Pease, "An electron microscopic study of red bone marrow," *Blood*, vol. 11, no. 6, pp. 501–526, 1956.
- [13] J. A. Cohen and C. H. Leeksa, "Determination of the life span of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphonate," *J Clin Invest*, vol. 35, no. 9, pp. 964–969, 1956.
- [14] A. Vieira-de-Abreu, R. A. Campbell, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman, "Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum," *Semin Immunopathol*, vol. 34, no. 1, pp. 5–30, 2012.
- [15] J. W. Semple, J. E. Italiano Jr., and J. Freedman, "Platelets and the immune continuum," *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 4, pp. 264–274, 2011.
- [16] P. J. Newman, J. Gorski, G. C. White, S. Gidwitz, C. J. Cretney, and R. H. Aster, "Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction.," *J. Clin. Invest.*, vol. 82, no. 2, pp. 739–43, Aug. 1988.

- [17] N. Kieffer, J. Guichard, J. P. Farcet, W. Vainchenker, and J. Breton-Gorius, "Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 164, no. 1, pp. 189–95, Apr. 1987.
- [18] J. G. White, *Platelet structure*, Third Edit. Elsevier Inc., 2007.
- [19] R. Flaumenhaft, *Platelet Secretion*, Third Edit. Elsevier Inc., 2013.
- [20] H. Holmsen, D. Ph, and H. J. Weiss, "Secretables storage pools in platelets .7309," no. Table 1, 1979.
- [21] B. Furie and B. C. Furie, "Mechanisms of thrombus formation," *N Engl J Med*, vol. 359, no. 9, pp. 938–949, 2008.
- [22] S. Konstantinides, J. Ware, P. Marchese, F. Almus-Jacobs, D. J. Loskutoff, and Z. M. Ruggeri, "Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ib?? and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, no. 9, pp. 2014–2021, Sep. 2006.
- [23] S. Kulkarni *et al.*, "A revised model of platelet aggregation," *J Clin Invest*, vol. 105, no. 6, pp. 783–791, 2000.
- [24] A. Kasirer-Friede, M. R. Cozzi, M. Mazzucato, L. De Marco, Z. M. Ruggeri, and S. J. Shattil, "Activation of integrin alpha IIb beta 3 by GP Ib-IX-V independent of signaling from other platelet receptors.," *Blood*, vol. 102, no. 11, p. 160a–160a, 2003.
- [25] S. Gruner *et al.*, "Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo," *Blood*, vol. 102, no. 12, pp. 4021–4027, 2003.
- [26] C. Lecut *et al.*, "Principal role of glycoprotein VI in alpha2beta1 and alphaIIb beta3 activation during collagen-induced thrombus formation," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 24, no. 9, pp. 1727–1733, 2004.
- [27] K. Bledzka, M. M. Pesho, Y.-Q. Ma, and E. F. Plow, "Chapter 12 – Integrin alphaIIb beta3," in *Platelets*, 2013, pp. 233–248.
- [28] J. Jin, J. L. Daniel, and S. P. Kunapuli, "Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 4, pp. 2030–2034, 1998.
- [29] B. Z. Paul, J. L. Daniel, and S. P. Kunapuli, "Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 40, pp. 28293–28300, 1999.
- [30] M. Gawaz *et al.*, "Vitronectin Receptor (alpha v beta 3) Mediates Platelet Adhesion to the Luminal Aspect of Endothelial Cells," *Circulation*, vol. 96, no. 6, 1997.
- [31] D. Phillips, I. Charo, L. Parise, and L. Fitzgerald, "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex," *Blood*, vol. 71, no. 4, 1988.
- [32] M. L. Kahn, M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, and S. R.

- Coughlin, "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin.," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 6, pp. 879–87, Mar. 1999.
- [33] J. F. Dong, S. Gao, and J. A. Lopez, "Synthesis, assembly, and intracellular transport of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 47, pp. 31449–31454, 1998.
- [34] R. K. Andrews, J. A. Lopez, and M. C. Berndt, "Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 29, no. 1, pp. 91–105, 1997.
- [35] J. A. Lopez, "The platelet glycoprotein Ib-IX complex," *Blood Coagul Fibrinolysis*, vol. 5, no. 1, pp. 97–119, 1994.
- [36] M. C. Berndt, C. Gregory, A. Kabral, H. Zola, D. Fournier, and P. A. Castaldi, "Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane," *Eur J Biochem.*, vol. 151, p. pp.637-649, 1985.
- [37] L. Erpenbeck, B. Nieswandt, M. Schon, M. Pozgajova, and M. P. Schon, "Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis," *J Invest Dermatol*, vol. 130, no. 2, pp. 576–586, 2010.
- [38] Y. Shen *et al.*, "Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ibalpha for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex," *Blood*, vol. 95, no. 3, pp. 903–910, 2000.
- [39] Y. Wang *et al.*, "Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury," *Circulation*, vol. 112, no. 19, pp. 2993–3000, 2005.
- [40] E. De Candia, S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews, and R. De Cristofaro, "Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 7, pp. 4692–8, Feb. 2001.
- [41] Z. S. Kaplan *et al.*, "ARTICLE Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIb and PAR4," 2015.
- [42] F. Nakamura *et al.*, "The structure of the GPIb-filamin A complex," *Blood*, vol. 107, no. 5, pp. 1925–1932, 2006.
- [43] R. K. Andrews and M. C. Berndt, *The GPIb-IX-V Complex*, Third Edit. Elsevier Inc., 2013.
- [44] A. Savoia *et al.*, "Spectrum of the Mutations in Bernard-Soulier Syndrome," *Hum. Mutat.*, vol. 35, no. 9, pp. 1033–1045, 2014.
- [45] R. K. Andrews and M. C. Berndt, "Bernard-Soulier syndrome: an update," *Semin Thromb Hemost*, vol. 39, no. 6, pp. 656–662, 2013.
- [46] J. Ware, S. Russell, and Z. M. Ruggeri, "Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 6, pp. 2803–2808, 2000.

- [47] T. Kanaji, S. Russell, and J. Ware, "Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome," *Blood*, vol. 100, no. 6, pp. 2102–2107, 2002.
- [48] E. R. Vandendries, B. C. Furie, and B. Furie, "Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis," *Thromb. Haemost.*, vol. 92, no. 3, pp. 459–466, Jul. 2004.
- [49] L. S. Fernandes *et al.*, "Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alphaMbeta2, in coronary stenting.," *Thromb. Res.*, vol. 111, no. 3, pp. 171–7, Jan. 2003.
- [50] D. I. Simon *et al.*, "Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)," *J Exp Med*, vol. 192, no. 2, pp. 193–204, 2000.
- [51] S. Massberg *et al.*, "A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation," *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 7, 2002.
- [52] G. Passacquale, P. Vamadevan, L. Pereira, C. Hamid, V. Corrigall, and A. Ferro, "Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes.," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e25595, 2011.
- [53] Y. Wang *et al.*, "Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIIb/IIIa," *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 15559, May 2017.
- [54] P. S. Frenette, R. C. Johnson, R. O. Hynes, and D. D. Wagner, "Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by endothelial P-selectin," *Cell Biol.*, vol. 92, pp. 7450–7454, 1995.
- [55] G. M. Romo *et al.*, "The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin.," *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 6, pp. 803–14, Sep. 1999.
- [56] P. S. Frenette *et al.*, "P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 8, pp. 1413–22, Apr. 2000.
- [57] M. P. Gawaz, J. C. Loftus, M. L. Bajt, M. M. Frojmovic, E. F. Plow, and M. H. Ginsberg, "Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions.," *J. Clin. Invest.*, vol. 88, no. 4, pp. 1128–1134, Oct. 1991.
- [58] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–57, Aug. 1972.
- [59] Y. Eguchi, S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, "Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 10, 1997.
- [60] R. C. Taylor, S. P. Cullen, and S. J. Martin, "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 231–241, 2008.
- [61] R. E. Voll, M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite, "Immunosuppressive effects of apoptotic cells," *Nature*, vol. 390, no. 6658, pp.

- 350–351, Nov. 1997.
- [62] J. T. Opferman, “Apoptosis in the development of the immune system,” *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 2, pp. 234–242, Feb. 2008.
- [63] M. Kristiansen and J. Ham, “Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model,” *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 7, pp. 1025–1035, Jul. 2014.
- [64] C. Haanen and I. Vermes, “Apoptosis: Programmed cell death in fetal development,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 64, no. 1, pp. 129–133, Jan. 1996.
- [65] D. Wencker *et al.*, “A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure,” *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 10, pp. 1497–504, May 2003.
- [66] P. Lee, M. Sata, D. J. Lefer, S. M. Factor, K. Walsh, and R. N. Kitsis, “Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 284, no. 2, 2003.
- [67] S. Elmore, “Apoptosis: a review of programmed cell death,” *Toxicol Pathol*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [68] U. Ziegler and P. Groscurth, “Morphological Features of Cell Death,” *Physiology*, vol. 19, no. 3, 2004.
- [69] G. Majno and I. Joris, “An Overview of Cell Death,” *Am. J. of Pathology*, vol. 146, no. 1, 1995.
- [70] D. H. Dockrell *et al.*, “The expression of Fas Ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection,” *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 11, pp. 2394–405, Jun. 1998.
- [71] A. M. Chinnaiyan, M. Tewari, and V. M. Dixit, “FADD, a Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis,” *Cell*, vol. 81, pp. 505–512, 1995.
- [72] M. O. Hengartner, “The biochemistry of apoptosis,” *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–776, Oct. 2000.
- [73] H. Li, H. Zhu, C. Xu, and J. Yuan, “Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis,” *Cell*, vol. 94, no. 4, pp. 491–501, Aug. 1998.
- [74] A. Gross, J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer, “BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis,” *Genes Dev.*, vol. 13, no. 15, pp. 1899–911, Aug. 1999.
- [75] T. F. Reubold and S. Eschenburg, “A molecular view on signal transduction by the apoptosome,” *Cell. Signal.*, vol. 24, no. 7, pp. 1420–1425, Jul. 2012.
- [76] S. Nagata, M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, and A. Iwamatsu, “A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD,” *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 43–50, Jan. 1998.

- [77] L. Rao, D. Perez, and E. White, "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis.," *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 6, 1996.
- [78] M. L. Coleman, E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, and M. F. Olson, "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 339–345, Apr. 2001.
- [79] J. Suzuki, D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz, and S. Nagata, "Xk-Related Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells," *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6144, 2013.
- [80] P. A. Kiener *et al.*, "Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages.," *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 8, pp. 1511–6, Apr. 1997.
- [81] R. Ahmad, J. Menezes, L. Knafo, and A. Ahmad, "Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 69, no. 1, pp. 123–8, Jan. 2001.
- [82] R. I. Schleicher *et al.*, "Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL," vol. 126, no. 12, pp. 1483–1493, 2015.
- [83] C. Kleinschnitz, M. Pozgajova, M. Pham, M. Bendszus, B. Nieswandt, and G. Stoll, "Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding," *Circulation*, vol. 115, no. 17, pp. 2323–2330, 2007.
- [84] J. J. Velier, J. A. Ellison, K. K. Kikly, P. A. Spera, F. C. Barone, and G. Z. Feuerstein, "Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat.," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 14, pp. 5932–41, Jul. 1999.
- [85] T. Sairanen, M. L. Karjalainen-Lindsberg, A. Paetau, P. Ijas, and P. J. Lindsberg, "Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments," *Brain*, vol. 129, no. Pt 1, pp. 189–199, 2006.
- [86] H. F. Langer *et al.*, "Platelets Contribute to the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Novelty and Significance," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 9, 2012.
- [87] M. R. Yeaman, "Platelets in defense against bacterial pathogens," *Cell Mol Life Sci*, vol. 67, no. 4, pp. 525–544, 2010.
- [88] J. Patzelt and H. F. Langer, "Platelets in Angiogenesis," *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 10, no. 5, pp. 570–577, Jul. 2012.
- [89] E. Karshovska *et al.*, "Hyperreactivity of junctional adhesion molecule A-deficient platelets accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 4, pp. 587–599, 2015.
- [90] C. Haanen and I. Vermes, "Apoptosis and inflammation."
- [91] U. Felderhoff-Mueser *et al.*, "Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral

- hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain.," *Brain Pathol.*, vol. 10, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2000.
- [92] Y. Li, M. Chopp, N. Jiang, Z. G. Zhang, and C. Zaloga, "Induction of DNA Fragmentation After 10 to 120 Minutes of Focal Cerebral Ischemia in Rats," *Stroke*, vol. 26, no. 7, 1995.
- [93] S. Love, "Apoptosis and brain ischaemia," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 27, no. 2, pp. 267–282, Apr. 2003.
- [94] W. Bergmeier *et al.*, "The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 45, pp. 16900–16905, 2006.
- [95] P. Kraft *et al.*, "Efficacy and Safety of Platelet Glycoprotein Receptor Blockade in Aged and Comorbid Mice With Acute Experimental Stroke," *Stroke*, vol. 46, no. 12, pp. 3502–3506, 2015.
- [96] S. G. Soriano *et al.*, "Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury.," *Stroke*, vol. 30, no. 1, pp. 134–9, Jan. 1999.
- [97] T. V. Arumugam, J. W. Salter, J. H. Chidlow, C. M. Ballantyne, C. G. Kevil, and D. N. Granger, "Contributions of LFA-1 and Mac-1 to brain injury and microvascular dysfunction induced by transient middle cerebral artery occlusion," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 287, no. 6, 2004.
- [98] A. C. Zago *et al.*, "The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury," *Arq Bras Cardiol*, vol. 90, no. 1, pp. 54–63, 2008.
- [99] J. M. van Gils, P. A. da Costa Martins, A. Mol, P. L. Hordijk, J. J. Zwaginga, and 3, "Transendothelial migration drives dissociation of platelet-monocyte complexes," *Thromb. Haemost.*, vol. 100, no. 2, pp. 271–279, Jul. 2008.
- [100] C. J. Kuckleburg *et al.*, "Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 91, no. 1, pp. 134–141, Jul. 2011.
- [101] M. Daigneault *et al.*, "Monocytes Regulate the Mechanism of T-cell Death by Inducing Fas-Mediated Apoptosis during Bacterial Infection," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 7, p. e1002814, Jul. 2012.
- [102] N. LI, Q. JI, and P. HJEMDAHL, "Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, no. 4, pp. 874–881, Apr. 2006.
- [103] T. Diacovo, S. Roth, J. Buccola, D. Bainton, and T. Springer, "Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18," *Blood*, vol. 88, no. 1, 1996.
- [104] D. E. Wesche-Soldato, C.-S. Chung, S. H. Gregory, T. P. Salazar-Mather, C. A. Ayala, and A. Ayala, "CD8+ T Cells Promote Inflammation and Apoptosis in the

- Liver after Sepsis," *Am. J. Pathol.*, vol. 171, no. 1, pp. 87–96, Jul. 2007.
- [105] D. Feng, J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak, "Platelets exit venules by a transcellular pathway at sites of F-met peptide-induced acute inflammation in guinea pigs," *Int Arch Allergy Immunol*, vol. 116, no. 3, pp. 188–195, 1998.
- [106] M. Krams, K. R. Lees, W. Hacke, A. P. Grieve, J.-M. Orgogozo, and G. A. Ford, "Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN)," *Stroke*, vol. 34, no. 11, 2003.
- [107] H. T. Le *et al.*, "The protective effects of plasma gelsolin on stroke outcome in rats," *Exp. Transl. Stroke Med.*, vol. 3, no. 1, p. 13, Nov. 2011.
- [108] M. K. Schuhmann, J. Guthmann, G. Stoll, B. Nieswandt, P. Kraft, and C. Kleinschnitz, "Blocking of platelet glycoprotein receptor 1b reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke.," *J. Neuroinflammation*, vol. 14, no. 1, p. 18, Jan. 2017.

7. Anhang

Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III, Abteilung Kardioimmunologie erstellt und von Professor Dr. Harald Langer betreut.

Die Konzeption der Versuche erfolgte unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Harald Langer.

Alle in der Arbeit vorliegenden Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Marcus Olbrich und Frau Sarah Gekeler von mir eigenständig durchgeführt. Die Schlaganfallinduktion nach dem tMCAO-Modell sowie die Entnahme und Kryokonservierung der Schlaganfallhirne wurde von Dr. Friederike Langhauser vom Universitätsklinikum Würzburg vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie.

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

Tübingen, den