

**„Nachweis Thrombozyten-induzierter Apoptose und
therapeutische Konsequenzen“**

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

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

vorgelegt von

Rett, Eva Theresia

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C.P. Berg

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose

1.1.1 Apoptose: Definition und Bedeutung.....	1
1.1.2 Apoptoseinduktion und -ablauf.....	2
1.1.3 Apoptoseinduktion durch Fas-Ligand.....	4

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Thrombozyten: Definition und Bedeutung.....	5
1.2.2 Rolle von Thrombozyten bei der Entstehung von Atherosklerose.....	8
1.2.3 Antithrombozytäre Therapie.....	10
1.2.4 Wirkung von NPlate (Romiplostim) auf Thrombozyten.....	12

1.3 Ziel der Arbeit: Nachweis Thrombozyten-induzierter Apoptose und therapeutische Schlussfolgerungen.....	13
---	----

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material und Bezugsquellen.....	14
2.2 Zellen.....	17
2.3 Zellkultivierung.....	17
2.4 Mäuse.....	18

2.5 Thrombozytenisolation

2.5.1 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut.....	18
2.5.2 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut.....	19
2.5.3 Vorbehandlung der Thrombozyten mit Medikamenten.....	20

2.6 Caspase 3/7 Assay zur Bestimmung der Apoptoserate

2.6.1 Funktionsprinzip des Caspase 3/7 Assays.....	20
2.6.2 Durchführung des Caspase 3/7 Assays.....	21
2.6.3 Analyse des Caspase 3/7 Assays.....	22

2.7 Annexin-Phosphatidylinositol-Staining zur Bestimmung der Apoptoserate

2.7.1 Prinzip des Annexin-PI-Stainings.....	23
2.7.2 Durchführung des Annexin-PI-Stainings mit humanen Thrombozyten.....	24
2.7.3 Durchführung des Annexin-PI-Stainings mit murinen Thrombozyten.....	25
2.7.4 Analyse des Annexin-PI-Stainings.....	26

2.8 TUNEL-Staining

2.8.1 Funktionsprinzip TUNEL-Stainings und DAPI-Gegenfärbung.....	27
2.8.2 Durchführung TUNEL-Stainings.....	27
2.8.3 Auswertung TUNEL-Stainings.....	28

2.9 Statistische Analyse.....

29

3 ERGEBNISSE	
3.1 Humane und murine Thrombozyten induzieren Apoptose in vitro.....	30
3.2 Effekt von ASS, Angiox und NPlate auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose.....	40
4 DISKUSSION.....	45
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	52
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	53
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	54
8 DANKSAGUNG.....	58
9 LEBENSLAUF.....	59

1.1 Apoptose

1.1.1 Definition und Bedeutung

„Apoptose“ (griechisch ἀπόπτωσης) bedeutet „Abfallen“ im Sinne des Abfallens welker Blätter von den Bäumen¹.

Unter Apoptose versteht man den „programmierten Zelltod“, ein in jeder Zelle vorhandenes „Todesprogramm“, das der Beseitigung nicht mehr benötigter Zellen dient. Apoptose spielt eine wichtige Rolle für die normale Entwicklung und Funktion von Geweben und Organen und ist deshalb bereits in der Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung¹. Wichtige Aufgaben sind zum Beispiel die Eliminierung potentiell schädlicher Zellen, die Kontrolle der Zellzahl in Geweben sowie die Regulation der Immunantwort². Apoptose läuft als geregelter Vorgang in mehreren Schritten ab: Zunächst werden die Proteine des Zytoskeletts von Aspartat-spezifischen Enzymen, sogenannten Caspasen, gespalten und inaktiviert. Dann kommt es zur Kondensierung des Chromatins und Fragmentierung des Zellkerns durch nukleolytische Enzyme, sogenannte DNAsen. Die Integrität der Zellmembran bleibt so lange wie möglich intakt, erst ganz am Schluss wird die Zelle in viele, von Zellmembran umgebene, Fragmente zerschnürt. Das Phospholipid Phosphatidylserin wird dann auf der Zelloberfläche exprimiert, um das Material für Makrophagen erkennbar zu machen. Es wird sofort phagozytiert und somit eine Entzündungsreaktion vermieden^{2,3}.

Apoptose unterscheidet sich damit gravierend von der Zellnekrose (griechisch νεκρός = Leichnam), welche Folge von Zellschädigungen ist. In diesem Fall ist die Zelle nicht mehr in der Lage, Apoptose einzuleiten. Es resultiert eine Schwellung, die Zellmembran wird aufgelöst und die Zelle zerfällt, erst ganz am Schluss erfolgt der DNA-Abbau. Während dieses Vorgangs werden inflammatorische Substanzen freigesetzt und Leukozyten angelockt, wodurch eine Entzündung hervorgerufen wird^{2,3}.

1.1.2 Apoptoseinduktion und -ablauf

Apoptose kann durch viele unterschiedliche Stimuli eingeleitet werden, beispielsweise durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren oder Überlebenssignalen (intrinsischer Weg), aber auch durch Bindung von bestimmten Liganden an Todesrezeptoren der Zelle (extrinsischer Weg)². Nach Einleitung der Apoptose durch einen der genannten Mechanismen kommt es zum Ablauf einer Kaskade, in deren Zentrum eine Familie proteolytischer Enzyme steht, die sogenannten Caspasen. Diese organisieren den geordneten Abbau der Zelle. Sie besitzen einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum und spalten Proteine hinter Aspartat. Daher stammt ihre Bezeichnung „**cysteiny**l-**aspartate-specific protease**“. Es werden Initiatorcaspasen, die beim Auslösen des Zelltods aktiviert werden, von Effektorcaspasen unterschieden, welche den Abbau der Zelle koordinieren⁴.

Der extrinsische Weg wird durch Bindung bestimmter Liganden an Rezeptoren der TNF-Superfamilie, z.B. TNF α -Rezeptor (CD120), Fas (CD 95) oder TRAIL-Rezeptoren (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ausgelöst. Ligandenbindung führt zur Anlagerung bestimmter Adaptermoleküle an die Procaspase 8. Dadurch wird diese zur aktiven Initiatorcaspase 8 umgewandelt und rekrutiert wiederum die Caspase 3, die als wichtigste Effektorcaspase der Kaskade betrachtet werden kann. Sie führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen 6 und 7, welche verschiedene Zellproteine spalten und inaktivieren, zudem werden durch sie DNasen aktiviert, die das Erbmateriale abbauen^{3, 5}.

Der intrinsische Weg wird durch Regulatorproteine der Bcl-Familie („Bcl“= B-cell lymphoma) koordiniert, die das Membranpotential der Mitochondrien beeinflussen. Es werden antiapoptotische Proteine (z.B. Bcl-2) von proapoptotischen Proteinen (z.B. Bak, Bax) unterschieden. Dieser Weg wird durch die Zelle selbst ausgelöst, z.B. wenn Schäden an der DNA vorliegen, oder die Zelle einer großen Menge reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt wird. Die proapoptotischen Proteine Bak und Bax sorgen in diesem Fall für eine Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran, sodass Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytosol gelangt. Cytochrom C ist ein proapoptotisches Protein, welches durch Bindung an das Protein „apoptotic-protease-activating-factor“ die Initiatorcaspase 9 aktiviert. Diese wiederum rekrutiert die Effektorcaspase 3, der weitere Ablauf ist identisch mit dem extrinsischen Weg^{3, 5} (siehe Abb.1).

1.1.3 Apoptoseinduktion durch Fas-Ligand

In der vorliegenden Arbeit wird von einem Aktivierungsmechanismus über den Apoptose-Rezeptor Fas (CD95, Apo-1) ausgegangen. Es handelt sich dabei um ein Typ-I-Membranprotein, welches auf vielen verschiedenen normalen und entarteten Zellen exprimiert wird. Der Fas-Ligand (Fas-L) ist ein Typ-II-Membranprotein und gehört zur TNF-Superfamilie. Er wird auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Monozyten exprimiert⁶, außerdem auf der Oberfläche humaner Thrombozyten⁷. Die Interaktion zwischen Fas-L und Fas führt zur Anlagerung des Adapterproteins „Fas-associated death domain“ (FADD) an die Procaspase 8 und bringt damit die Caspase-Kaskade in Gang³ (siehe Abb. 1).

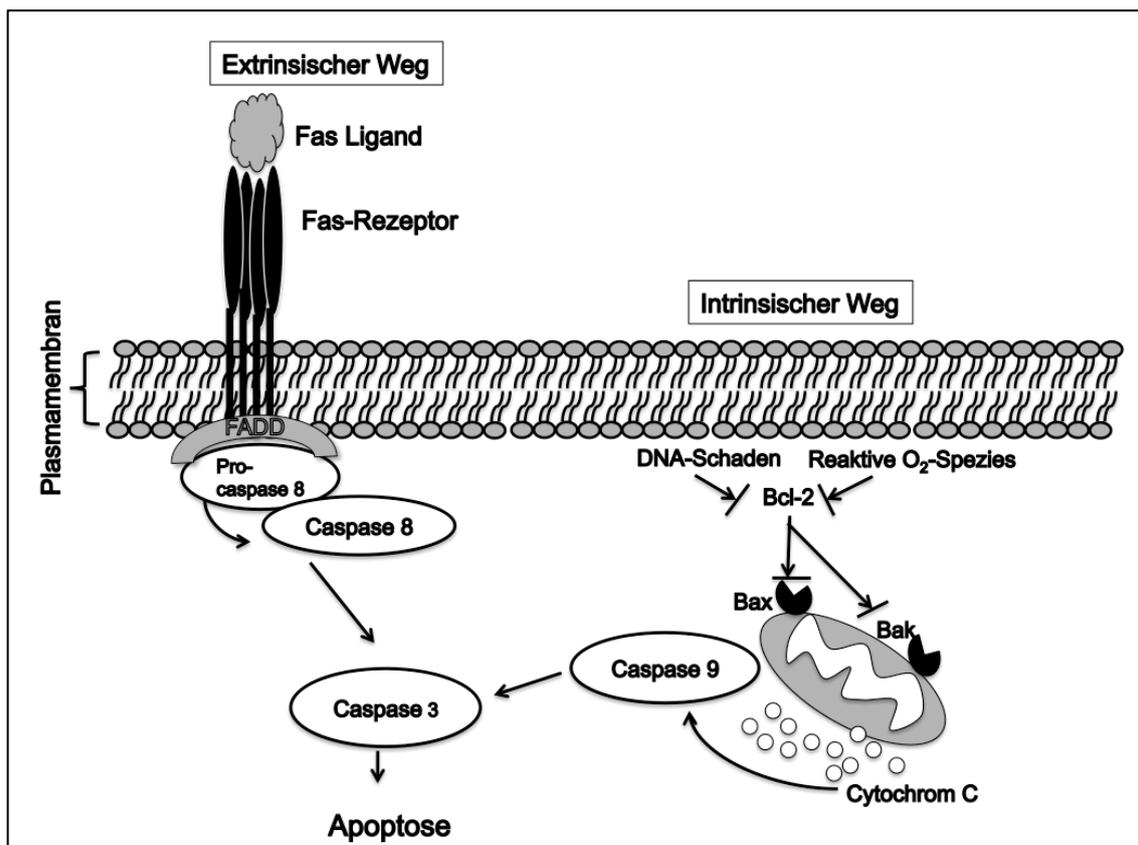


Abb. 1: Apoptoseinduktion über den extrinsischen und intrinsischen Weg
(eigene Darstellung, in Anlehnung an Hotchkiss, R.S.³)

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Definition und Aufgaben

Thrombozyten, zu deutsch Blutplättchen, machen mit 150-450 000 pro Mikroliter den zweitgrößten Anteil an Zellen im Blut aus, den größten Anteil stellen Erythrozyten. Thrombozyten sind kernfrei und entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark. Sind sie nicht aktiviert, haben sie eine charakteristische, diskoide Form mit einem Durchmesser von bis zu drei Mikrometern. Physiologischerweise zirkulieren sie etwa 10 Tage im Blut^{8, 9}, ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System von Leber und Milz¹⁰. Thrombozyten sind multifunktionale Zellen, sie sind an vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt⁹.

Ihre Funktion bei der primären Hämostase und bei der Entstehung von Thrombosen ist seit langem bekannt. Mittlerweile ist auch erwiesen, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen⁸ und der Gewebereparatur¹¹ spielen, ausserdem sind sie an der Regulation der Immunabwehr beteiligt¹².

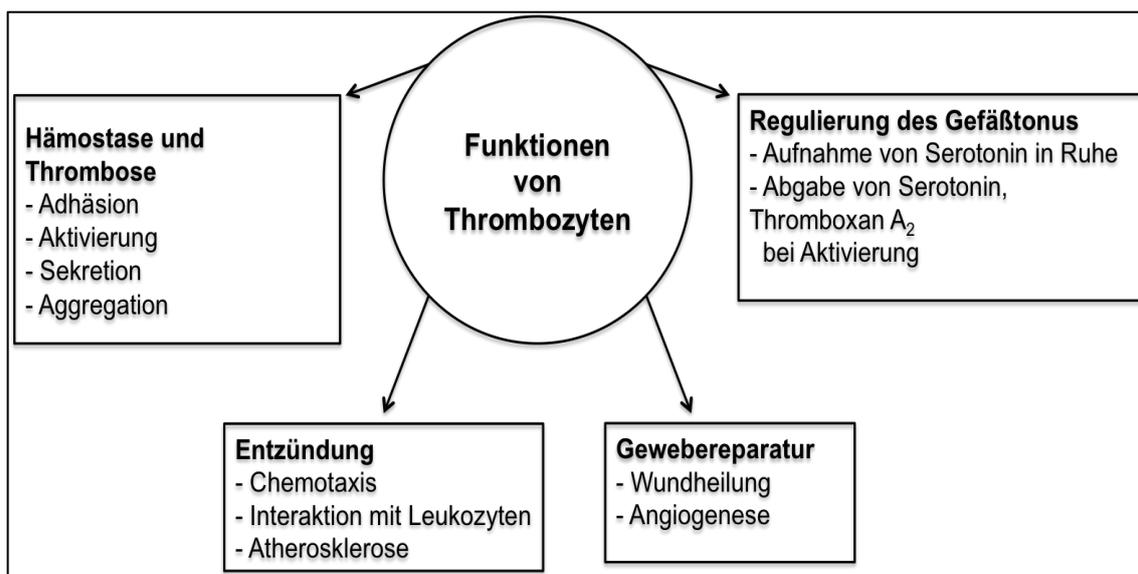


Abb. 2: Funktionen von Thrombozyten (modifiziert nach Harrison, P.⁹)

Ihre wichtigste Aufgabe besteht in der Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität, indem sie Verletzungen des Endothels verschließen. Sie bilden zusammen mit bestimmten Plasmabestandteilen einen Thrombus, um den Defekt in der Gefäßwand zu versiegeln und den Blutverlust so gering wie möglich zu halten. Unter physiologischen Bedingungen können sich Thrombozyten nicht am Endothel anlagern, dafür sorgen antithrombotische Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin I₂ (PGI₂). Liegt eine Gefäßverletzung vor, so kommen Thrombozyten mit subendothelialen Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin in Kontakt^{8, 13}. Diese Matrixproteine werden von Glykoproteinen auf der Thrombozytenmembran erkannt und ermöglichen die Adhäsion am Endothel. Der erste Kontakt wird vermittelt durch das Protein von-Willebrand-Faktor (vWF), welches sowohl im Endothel, als auch in den Thrombozytengranula gespeichert ist. vWF bildet eine Brücke zwischen dem Kollagen des Endothels und dem Glykoproteinrezeptor Ib (GPIb) auf der Thrombozytenmembran und ermöglicht dadurch eine stabile Bindung^{8, 14, 15}. Über diesen Mechanismus können erste Thrombozyten adhären und die Verletzung dünn bedecken. Durch die Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert, was mit morphologischen und funktionalen Veränderungen einhergeht. Aus den diskoiden Plättchen werden kugelige Gebilde mit langen Fortsätzen, sogenannten Pseudopodien, die eine effektive Abdichtung des Gefäßes ermöglichen. Des Weiteren kommt es zur Ausschüttung von Plättchenaktivierenden Stoffen, die entweder aus dem umliegenden Gewebe oder aus thrombozytären Granula stammen (autokrine Aktivierung). Thrombozyten haben in ihren Granula eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen gespeichert, die bei Aktivierung ausgeschüttet werden (siehe Tabelle 1). Dadurch werden weitere, noch ruhende Plättchen aktiviert und zur Aggregation veranlasst^{10, 13}.

Dichte Granula (δ)	α -Granula	Lysosomale Granula (λ)
- ADP	- <u>Adhäsionsproteine</u> Fibrinogen, vWF, Fibronectin...	- Hydrolasen
- ATP	- <u>Wachstumsfaktoren</u> platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EDGF)...	- Kollagenasen
- Serotonin	- <u>Zytokin-ähnliche Proteine</u> Interleukin I, CD40 Ligand, platelet factor 4 (PF4), β -Thromboglobulin (β -TG)	- Elastasen
-Thromboxan A ₂	- <u>Gerinnungsfaktoren</u> Fibrinogen, Faktor V und XI, Plasminogen...	
- Calcium		

Tabelle 1: Inhalte thrombozytärer Granula (modifiziert nach Yeaman, M.R. ¹²)

Die Sekretion beginnt mit Ausschüttung der dichten Granula, danach folgen α - und lysosomale Granula. Inhaltsstoffe der dichten Granula haben Einfluss auf den Gefäßtonus und stimulieren die Aggregation der Thrombozyten: ADP ist neben seiner wichtigen Bedeutung für die Aktivierung und Rekrutierung ruhender Plättchen auch für die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenmembran verantwortlich. Durch die Bindung von Fibrinogen wird die Verbindung mehrerer Thrombozyten miteinander ermöglicht^{13,8}. Das stark vasokonstriktorische Thromboxan A₂ entsteht im Rahmen des Arachidonsäurestoffwechsels und verstärkt ebenfalls die Aktivierung weiterer Thrombozyten.

α -Granula enthalten eine Vielzahl von Proteinen, die verschiedene hämostatische Vorgänge steuern. Sie beeinflussen die Adhäsion (z.B. vWF und Fibrinogen), sind für die Anlockung von Leukozyten und Fibroblasten zuständig (z.B. β -TG und PF4), beeinflussen die Koagulation (z.B. Faktoren V+XI und Plasminogen) und induzieren Reparaturvorgänge in der verletzten Gefäßwand (z.B. PDGF)^{12, 16}. Inflammatorische Stoffe wie Interleukin I und CD40-Ligand¹⁷, die vermutlich ebenfalls aus den α -Granula stammen, erzeugen entscheidende Veränderungen der adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des Endothels. Stoffe aus Lysosomen vermitteln vermutlich die Auflösung von Thromben¹². Durch die beschriebenen Aktivierungsvorgänge kommt es schließlich zur Bildung eines Plättchenpfropfs, der kurzzeitig das Fortdauern der Blutung verhindert. Stabil wird dieser weiße Thrombus jedoch erst nach Aktivierung der Gerinnungskaskade, an deren Ende die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch das Enzym Thrombin steht. Fibrin vermittelt die stabile Vernetzung der Thrombozyten, es entsteht ein roter Thrombus, in den weitere Zellen wie Erythrozyten und Leukozyten eingelagert sind. Dieser erzeugt einen stabilen Verschluss der Gefäßverletzung¹⁰.

1.2.2 Rolle von Thrombozyten bei der Entstehung von Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören weltweit zu den führenden Todesursachen¹⁸. Die WHO definierte Atherosklerose im Jahr 1958 als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia¹⁹.

Nach heutigen Erkenntnissen werden chronisch-entzündliche Prozesse in der Gefäßwand als ursächlich für Entstehung und Progression der Erkrankung betrachtet^{18, 20, 21}. Diese chronisch-entzündlichen Prozesse entwickeln sich über viele Jahre, unter Einwirkung bestimmter Risikofaktoren. Dazu gehören unter anderem Rauchen, Hypertonie, Adipositas, Diabetes Mellitus und Hyperlipidämie²². Die Atherogenese beginnt mit einer Dysfunktion des Endothels. Unter physiologischen Bedingungen können sich Thrombozyten nicht am Endothel anlagern, dafür sorgen bestimmte Stoffe wie NO oder PGI₂¹⁰. Durch inflammatorische Stimuli, wie etwa das Vorliegen einer Hyperlipidämie, werden diese antiadhäsiven Mechanismen beeinträchtigt. Veränderte Lipoproteinpartikel und reaktive Sauerstoffspezies lagern sich in der Intima ab, dadurch werden vermehrt endotheliale Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektin, vWF, ICAM1 (intracellular adhesion molecule) sowie VCAM1 (vascular adhesion molecule) auf dem Endothel exprimiert^{22, 23}. Dies ermöglicht Thrombozyten, Monozyten und Leukozyten, sich am Endothel anzulagern. Adhärenente Thrombozyten sezernieren bestimmte Substanzen, welche die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften des Endothels verändern¹⁶. Dadurch werden Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Monozyten durch das Endothel weiter unterstützt⁸. Vermutlich gibt diese Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen den Anstoß zur Entwicklung von Atherosklerose²⁴. Monozyten differenzieren sich im Endothel zu Makrophagen und phagozytieren dort abgelagerte Lipide und Cholesterinester. Dadurch werden sie schließlich zu Schaumzellen und sind morphologisch als sogenannte „fatty streaks“ sichtbar. Aus den „fatty streaks“ entstehen im Verlauf manifeste atherosklerotische Plaques, indem sich glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima einlagern. Sie produzieren dort Proteine der extrazellulären Matrix, so dass auf den Plaques fibröse Kappen aus glatten Muskelzellen und Kollagen entstehen. Die Kappen können mit der Zeit an Substanz abnehmen, so dass es zur Plaquesruptur kommt²².

Die dann freiliegende subendotheliale Matrix induziert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, was zum Verschluss des betroffenen Gefäßes führt. Auch ohne Ruptur kann es, alleine durch Größenprogredienz der Plaques, zur Verlegung des Gefäßlumens kommen²². Der Gefäßverschluss resultiert in einer Ischämie des von dem betroffenen Gefäß versorgten Gewebegebietes. Tritt Atherosklerose an den Koronargefäßen auf, spricht man von einer „koronaren Herzerkrankung“ (KHK). Der Stenosegrad entscheidet darüber, ob sich die KHK als stabile- oder als instabile Angina pectoris äußert. Die Beschwerden einer instabilen Angina pectoris sind nicht sicher von einem akuten Myokardinfarkt zu unterscheiden, daher wurde die Bezeichnung „akutes Koronarsyndrom“ (ACS) eingeführt. Damit werden alle Krankheitsbilder zusammenfasst, die mit kardialer Ischämie einhergehen. Dazu gehören instabile Angina Pectoris, Herzinfarkt mit und ohne ST-Streckenhebung und plötzlicher Herztod²⁵.

1.2.3 Antithrombozytäre Therapie

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms (ACS). Daher ist die antithrombozytäre Therapie ein Eckpfeiler in der Behandlung und Sekundärprävention des ACS. Derzeit sind zwei orale Formen der Thrombozytenaggregationshemmung gebräuchlich: Acetylsalicylsäure (Aspirin) und Adenosin-Diphosphat-P2Y₁₂-Rezeptor-Blocker (z.B. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor)²⁶. Aspirin bewirkt die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase I, dabei handelt es sich um ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels, welches die Prostaglandinsynthese katalysiert. Die Entstehung des Thrombozytenaktivators Thromboxan A₂ wird somit verhindert und die Thrombozytenaggregation gehemmt. Aspirin ist das mit Abstand am besten untersuchte Medikament zur Thrombozytenaggregationshemmung, es wird von Millionen Menschen weltweit zur Behandlung oder zur Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen eingenommen²⁷.

Die aktuelle Empfehlung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse bei stabiler KHK ist eine Langzeittherapie mit 75-160 mg Aspirin täglich^{27, 28}. Die American Heart Association empfiehlt ebenfalls 75-162 mg Aspirin täglich für Patienten mit akutem Koronarsyndrom²⁶.

Thienopyridine wie Clopidogrel (2. Generation) und Prasugrel (3. Generation) sind Adenosin-Diphosphat-P2Y₁₂-Rezeptor-Blocker, die durch irreversible Bindung am P2Y₁₂-Rezeptor eine Thrombozytenaktivierung durch ADP verhindern. Ein weiterer P2Y₁₂-Rezeptor-Blocker ist Ticagrelor, dabei handelt es sich um ein ATP-Analogon, welches den Rezeptor nur reversibel blockiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Prasugrel und Ticagrelor Clopidogrel in der Wirksamkeit überlegen sind (PLATO, TRITON-38)^{29 30}.

Nach aktueller Studienlage werden in Deutschland mit der langfristigen Kombinationstherapie aus Aspirin und einem P2Y₁₂-Rezeptor-Blocker bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom klinisch die besten Langzeitergebnisse erzielt²⁸. In den letzten Jahren wurden immer mehr neue antithrombozytäre Substanzen entwickelt, sie befinden sich teilweise noch in der klinischen Erprobung. Dazu gehören zum Beispiel Glykoproteinrezeptorantagonisten und Phosphodiesterase-Antagonisten sowie Thromboxan A₂- und Thrombin-Rezeptor-Antagonisten³¹. Von den neuen Substanzen erhofft man sich, dass sie das Blutungsrisiko der antithrombozytären Therapie weiter senken³¹. Ihre Bedeutung muss nach Abschluss der derzeit laufenden Studien unter Abwägung des Nutzen-Risiko-Profiles weiter eruiert werden²⁸.

Eine große Rolle bei der Therapie des ACS spielt die interventionelle Behandlung von Stenosen der Herzkranzgefäße durch Ballondilatation und Stenting. Neben der postinterventionellen antithrombozytären Therapie ist auch während der Intervention eine Hemmung der Gerinnungskaskade notwendig, um Komplikationen wie Stent-Thrombosen zu vermeiden.

Dafür werden derzeit zum einen Heparine eingesetzt, zum anderen finden neuere Substanzen, wie Faktor-Xa- Inhibitoren und direkte Thrombininhibitoren Verwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit ASS (Aspirin) und Bivalirudin (Angiox) durchgeführt. Angiox wirkt als reversibler Thrombin-Inhibitor und ist derzeit zur Verwendung bei percutanen Koronarinterventionen (PCI) zugelassen³².

1.2.4 Wirkung von NPlate (Romiplostim) auf Thrombozyten

NPlate ist ein Thrombopoetin-Rezeptor-Agonist, der zur Therapie von Immunthrombozytopenien eingesetzt wird. Über den Thrombopoetin-Rezeptor auf Megacaryozyten wird die Steigerung der Thrombozytenproduktion aktiviert. NPlate ist derzeit als second-line Therapie bei Patienten zugelassen, die gegenüber anderen Therapiemöglichkeiten refraktär sind³³.

1.3 Ziel der Arbeit: Nachweis Thrombozyten-induzierter Apoptose und therapeutische Schlussfolgerungen

Thrombozyten enthalten diverse biologisch aktive Stoffe, durch die sie auf ihre Umgebung einwirken können. Sie verfügen zudem über eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, über welche sie mit anderen Zellen in Kontakt treten können. Diese Voraussetzungen ermöglichen ihnen die Beteiligung an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen. Ahmad et. al konnten 2001 zeigen, dass Thrombozyten über Fas-L Apoptose in Fas-positiven humanen Tumorzellen induzieren⁷. Angesichts ihrer multifunktionellen Aufgabe ist es denkbar, dass Thrombozyten auch in ihrem physiologischen Funktionsbereich Apoptose in bestimmten anderen Zellen auslösen können. Dies könnte im Rahmen der Hämostase und der Entstehung von Thrombosen, sowie bei entzündlichen Prozessen⁸, der Gewebereparatur¹¹ und der Immunabwehr¹² eine Rolle spielen. Diese Annahme wirft interessante Fragen für die Bedeutung der Thrombozyten-induzierten Apoptose in vivo auf.

Der Nachweis der Thrombozyten-induzierten Apoptose und die gegebenenfalls daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen sollen in der folgenden Arbeit dargestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tabelle 2: Material und Bezugsquelle

Methode	Material	Bezugsquelle
Zellkultur	Claycomb Medium	Sigma-Aldrich
	DMEM Medium	PAA Laboratories
	VLE-RPMI Medium	PAA Laboratories
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
	Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories
	Fibronectin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich
	Gelatine	Sigma Aldrich
	L-Glutamin	PAA Laboratories
	Norepinephrin	Sigma-Aldrich
	Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
	Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories
	Staurosporin Solution (STS)	Sigma
	Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories
	Brutschrank CO ₂ Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo
	Falcon®-Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson
	Glas-Pipetten	Costar
	Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss
	Sterilbank HERAsafe	Hereaus
	Zellkulturflaschen	Corning Inc.
	Zellzählautomat KX-21N	Sysmex
Thrombozytenisolation	Blutentnahme Safety-Multifly® Set	Sarstedt
	Citrat-Monovetten®	Sarstedt
	Einmalspritze (20 ml)	Braun
	Filter-Einheit 0,22 µm Millex GS	Milipore
	Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf
	Natrium-Heparin Glaskapillaren	Hirschmann

Tabelle 2: Material und Bezugsquellen (Fortsetzung von Seite 14)

Methoden	Material	Bezugsquelle
Thrombozytenisolation	ADP 2,5 mg	ChronoLog
	Bovines Serumalbumin Fraktion V 96% (BSA)	AppliChem
	D-Glucose	Merck
	Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
	Natriumcitrat	Sigma
	Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
	Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
	Paraformaldehyd 1%	Merck
	24- und 96-Well Platten	Corning Inc.
	pH-Meter	Hanna Instruments
	Feinwaage ED 6202S	Sartorius
Puffer für Thrombozytenisolation	<u>ACD-Puffer:</u> 12,5 g Natriumcitrat 6,82 g Zitronensäure 10 g Glukose Aqua dest. ad 500 ml, mit NaOH auf pH 4,69 einstellen	
	<u>Tyrodes-Puffer (10x)</u> 80 g Natriumchlorid 10,15 g Natriumhydrogencarbonat 1,95 g Kaliumchlorid Aqua dest. ad 1000 ml	
	<u>Tyrodes-Gebrauchslösung</u> 20 ml Tyrodes-Puffer (10x) 0,2 g BSA 0,2 g Glukose Aqua dest. ad 200 ml mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml abnehmen, Rest mit HCl auf pH 6,5 einstellen	

Tabelle 2: Material und Bezugsquellen (Fortsetzung von Seite 15)

Methode	Material	Bezugsquelle
Vorbehandlung der Thrombozyten	Aspirin	Sigma
	Angiox	The Medicines Company
	NPlate	Amgen
	oxLDL	Kalen Biomedical
Caspase Assay	Apo-ONE® Homogenous Caspase Assay	Promega
	ELISA Lesegerät Microplate Reader 550	Bio-Rad Laboratories
Annexin-PI-Staining	FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
	FACS-Röhrchen	BD Biosciences
	Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences
TUNEL-Staining	In situ cell detecion kit	Roche
	Chamber Slides	Becton Dickinson
	Bovines Serumalbumin Fraktion V 96% (BSA)	AppliChem
	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
	DNase I	Roche
	Natriumcitrat	Merck
	TrisHCl	Sigma
	Triton-X 100	Sigma
	Mountain Medium	Dako
	Objektträger, Deckglas	Langenbrink
	Fluoreszenzmikroskop ApoTome	Carl Zeiss

2.2 Zellen

Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um immortalisierte T-Lymphozyten, die erstmals 1970 aus dem Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie isoliert wurden. Heute gibt es viele verschiedene Derivate, die zur Erforschung von T-Zell-Signalwegen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der wildtypische Zellklon Jurkat A3 verwendet, welcher sehr empfindlich gegenüber der Fas-induzierten Apoptose ist³⁴. Des Weiteren wurde mit dem wildtypischen Zellklon Jurkat J16 gearbeitet, welcher ebenfalls sehr empfindlich gegenüber der Fas-induzierten Apoptose ist³⁵. KG-1 Zellen sind humane myeloische Leukämie-Zellen, die ursprünglich aus dem Blut eines Patienten mit Erythroleukämie isoliert wurden. Phänotypisch und funktionell entsprechen sie Myeloblasten, den Vorläuferzellen von Granulozyten³⁶. HL-1 Zellen sind murine Kardiomyozyten, die aus AT1-Zellen entwickelt wurden. Sie sind kontraktile und zeigen damit als erste Zelllinie sowohl morphologische als auch elektrophysiologische Eigenschaften von Kardiomyozyten *in vitro*³⁷.

2.3 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt, die außerhalb der Arbeitszeiten mit UV-Licht bestrahlt wurde. Alle Materialien und Geräte wurden vor Verwendung unter der Sterilbank desinfiziert oder sterilisiert.

Wachstum und Morphologie der Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen unter regelmäßigem Wechsel des Mediums. Jurkat-Zellen wurden in VLE-RPMI-Medium kultiviert, für KG1-Zellen wurde DMEM-Medium verwendet. Beide Medien wurden mit jeweils 1% Penicillin-Streptomycin und 10% FBS versetzt. Das Medium wurde im Abstand von drei bis vier Tagen gewechselt.

HL1-Zellen wurden in Claycomb-Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% FBS kultiviert, welches stets lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Vor Aussaat der HL1-Zellen wurden die Kulturflaschen eine Stunde mit Gelatine und Fibronectin ge-coated. Die Zellen wurden erst verwendet, wenn sie lückenlos konfluent waren. Dann wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS abgespült und schließlich mit Trypsin benetzt. Nach etwa 15 Minuten im Brutschrank hatten sich die Zellen gelöst und konnten geerntet werden. Die Zellen wurden für Versuche auf 96- bzw. 24-Well-Platten ausgesät.

2.4 Mäuse

Es wurden Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6, Jackson Laboratories) isoliert und für Versuche verwendet.

2.5 Thrombozytenisolation

2.5.1 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut

Die Blutentnahme erfolgte an jungen, gesunden Probanden durch Punktion der Vena mediana cubiti mittels einer Butterfly-Kanüle. Das Blut wurde langsam in eine 20ml Spritze abgenommen, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Die Spritze enthielt 4ml ACD-Puffer und wurde sofort nach der Blutentnahme vorsichtig geschwenkt, um eine gute Durchmischung von Puffer und Blut zu erreichen und dadurch der Gerinnung des Blutes vorzubeugen.

Danach wurde das Blut vorsichtig zu gleichen Teilen in zwei 15ml Falcons überführt und bei 1200 rpm ohne Bremse 20 Minuten zentrifugiert. Es entstanden etwa 10ml plättchenreiches Plasma, welche mit einer Transferpipette abgenommen und in ein 50ml Falcon überführt wurden.

Anschließend wurde auf 35ml mit Tyrodes Puffer pH 6,5 aufgefüllt und bei 2100 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Pellet vorsichtig in 250µl Tyrodes Puffer pH 6,5 resuspendiert, mit der gleichen Menge Tyrodes Puffer pH 7,5 wurde neutralisiert. Die Thrombozytenzählung erfolgte mit dem Zellzählautomat „Sysmex“. Die Thrombozyten wurden auf Platten ausgesät und zur Adhäsion zwei Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Danach wurden sie mit 100µM ADP für fünf Minuten aktiviert und schließlich für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS, bis zur weiteren Verwendung wurden die Thrombozyten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.5.2 Thrombozytenisolierung aus murinem Vollblut

Die Mäuse wurden zur Blutentnahme mit Isofluran narkotisiert. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer Glaskapillare punktiert und das Blut in ein Eppendorfgefäß getropft, welches mit 300µl ACD-Puffer gefüllt war. Das gewonnene Blut wurde in FACS-Röhrchen überführt und auf 2ml mit Tyrodes Puffer pH 6,5 aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation von sechs Minuten bei 120g, das nun entstandene plättchenreiche Plasma wurde in neue FACS-Röhrchen überführt und nochmals für fünf Minuten bei 2600g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in Tyrodes Puffer pH 7,4 resuspendiert. Die Thrombozytenzählung erfolgte am Zellzählautomat „Sysmex“. Die Thrombozyten wurden auf Platten ausgesät und zur Adhäsion zwei Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Danach wurden sie mit 100µM ADP für fünf Minuten aktiviert und schließlich für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS, bis zur weiteren Verwendung wurden die Thrombozyten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.5.3 Vorbehandlung der Thrombozyten mit Medikamenten

Für bestimmte Experimente wurden die Thrombozyten mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt. Es wurden Acetylsalicylsäure (ASS), Bivalirudin (Angiox) und Romiplostim (Nplate) verwendet. ASS wurde in PBS gelöst in Konzentrationen von 100µM und 500µM direkt zum Vollblut gegeben und eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Isolation der Thrombozyten, wie in 2.5.2 beschrieben. Angiox und NPlate wurden zu den isolierten Plättchen gegeben und vor der weiteren Verwendung eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Es wurden 50mg/ml Angiox und 500µg/ml NPlate verwendet.

2.6 Caspase 3/7 Assay zur Bestimmung der Apoptoserate

2.6.1 Funktionsprinzip des Caspase 3/7 Assays

Als Maß für die Apoptoserate wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem Apo-ONE® Homogenous Caspase 3/7 Assay bestimmt. Der Mechanismus des Assays beruht auf dem Aktivitätsnachweis der Caspase 3/7. Nach Induktion von Apoptose kommt es zur Auslösung einer Caspase-Kaskade, in der die Caspasen 3 und 7 aktiviert werden. Zum Nachweis dieser Caspasen verwendet der Assay ein fluoreszenzmarkiertes Substrat (Z-DEVD-R110) und einen Puffer, welcher die Zellmembranen auflöst und ein geeignetes Milieu für die Caspase 3/7 herstellt. Durch die Aktivität der Caspase 3/7 wird das Substrat gespalten und es entsteht der stark fluoreszierende Farbstoff Rhodamin 110. Das Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Menge der Caspase 3/7 Aktivität und kann als Maß für die Apoptoserate verwendet werden.

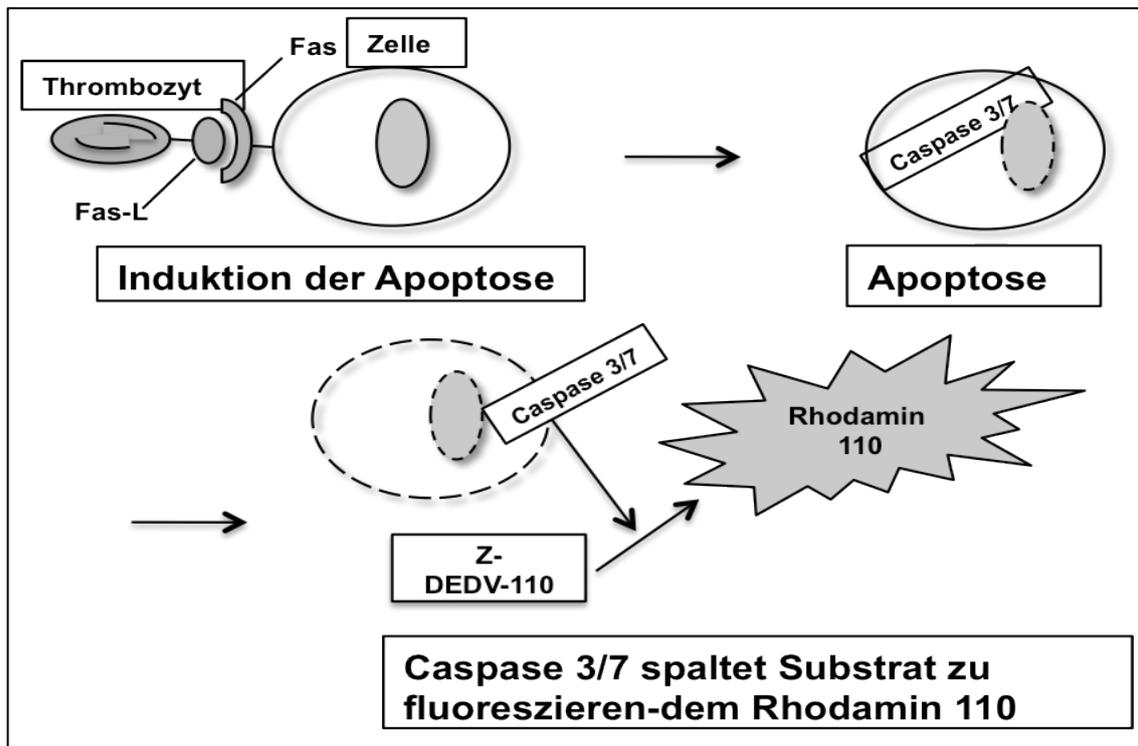


Abb. 3: Funktionsprinzip des Caspase 3/7 Assays

Induktion von Apoptose, hier dargestellt durch Bindung des Fas-Liganden auf der Thrombozytenmembran an den Fas-Rezeptor auf der Membran einer Zelle. In der Zelle beginnt die Caspase-Kaskade. Durch Zugabe des Puffers wird die Zelle lysiert, die Caspase 3/7 gelangt nach außen und kann das Substrat Z-DEVD-110 zum fluoreszierenden Rhodamin 110 spalten. Rhodamin wird als Maß für die Caspase 3/7 Aktivität verwendet (eigene Darstellung).

2.6.2 Durchführung des Caspase 3/7 Assays

Caspase Assays wurden mit isolierten, fixierten Thrombozyten auf 96-well Platten durchgeführt. Es wurden Duplikate mit jeweils drei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen von 3×10^7 , 1×10^8 und 2×10^8 Thrombozyten pro well verwendet. Zunächst wurden die fixierten Thrombozyten zwei mal mit 100µl PBS gewaschen, dann wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl Medium pro well hinzugefügt. Die Kontrollen wurden ohne Thrombozyten durchgeführt:

Die Negativkontrollen enthielten $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl Medium und 10µM PBS, die Positivkontrollen enthielten $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl Medium und 10µM Staurosporin (STS). STS ist ein Proteinkinaseinhibitor und kann den programmierten Zelltod auslösen. Die Zellen wurden sechs Stunden mit den Thrombozyten im Brutschrank bei 37°C koinkubiert. Danach wurden zu jedem well 100µl des „Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagent“ hinzugefügt. Um dieses zu erhalten, waren Substrat und Puffer 1:100 gemischt worden. Die Platte wurde dann bis zur Messung bei 300rpm auf einen Plattenschüttler gestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte 15 Stunden nach Zugabe des Reagents an einem Microplate-Reader.

2.6.3 Analyse des Caspase 3/7 Assays:

Fluoreszenzmessung am Microplate- Reader

Die Analyse der Caspase 3/7 Assays erfolgte mittels Fluoreszenzmessung an einem Microplate-Reader. Das Prinzip der Messung besteht darin, dass die Probe von einem Licht mit bestimmter Wellenlänge durchstrahlt wird und die fluoreszierende Substanz in der Probe einen Teil des einfallenden Lichts in Fluoreszenzlicht umwandelt. Dieses Fluoreszenzlicht hat eine größere Wellenlänge als das eingestrahlte Licht, es wird abgestrahlt und kann nun mit einem Detektor gemessen werden.

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 490nm und einer Emissionswellenlänge von 520nm. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Caspase 3/7 Aktivität und wird als Maß für die Apoptoserate herangezogen.

2.7 Annexin-Phosphatidylinositol-Staining zur Bestimmung der Apoptoserate

2.7.1 Prinzip des Annexin-PI-Stainings

Die Apoptoserate wurde durch eine Annexin- und Phosphatidylinositol-Färbung mit Hilfe des FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I bestimmt. Der Mechanismus des Kits beruht auf der Umverteilung von Phospholipiden an der Zellmembran in apoptotischen Zellen. Das Phospholipid Phosphatidylserin, welches sich in lebenden Zellen auf der inneren Seite der Lipiddoppelmembran befindet, wird während der Apoptose auf die äußere Seite transloziert. Das Protein Annexin V bindet Phosphatidylserin spezifisch und mit hoher Affinität. Es ist im verwendeten Kit mit dem Fluorochrom FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert, somit wird die durchflusszytometrische Detektion der apoptotischen Zellen möglich. FITC-Annexin V markiert jedoch nicht nur apoptotische Zellen, sondern auch nekrotische Zellen. Deren Membran ist für FITC-Annexin V durchlässig und es bindet an die Innenseite der Membran. Damit nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen unterschieden werden können, muss die Färbung in Kombination mit Phosphatidylinositol erfolgen. Das Phospholipid Phosphatidylinositol dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein und markiert daher nur nekrotische Zellen. Es ergeben sich also folgende Kombinationen zur Differenzierung der Zellen: Apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, Zellen im Spätstadium der Apoptose oder bereits nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv. Tote Zellen sind Annexin-negativ und PI-positiv und intakte Zellen sind Annexin-negativ und PI negativ.

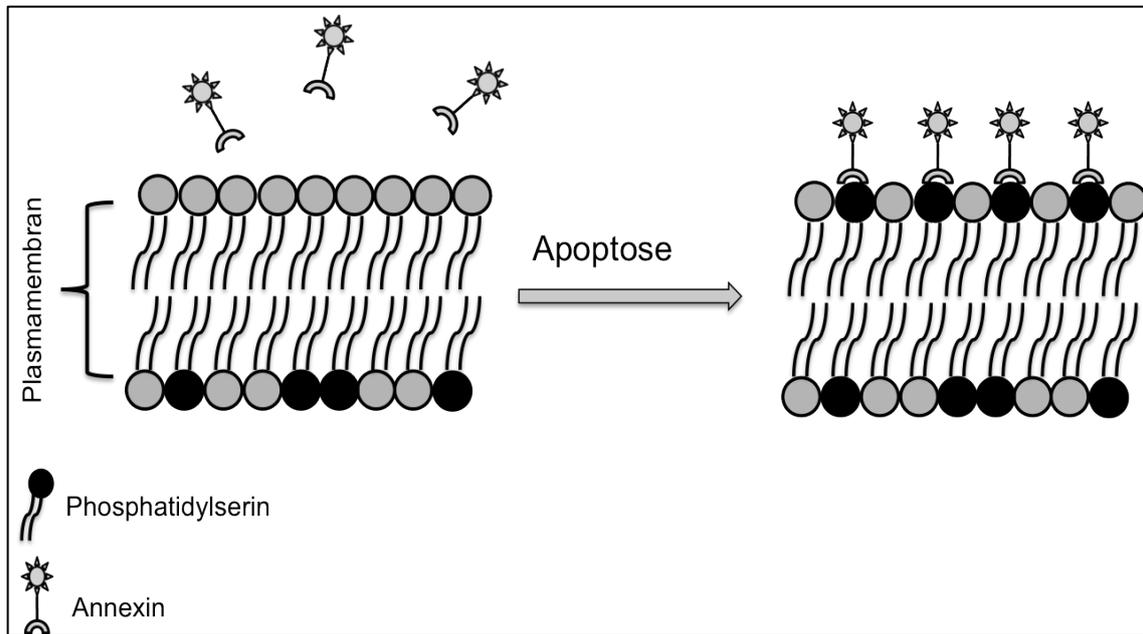


Abb. 4: Funktionsprinzip Annexin-PI-Staining

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert und Annexin kann spezifisch daran binden (eigene Darstellung).

2.7.2 Durchführung des Annexin-PI-Stainings mit humanen Thrombozyten

Für Annexin-PI-Stainings wurden je 1×10^8 isolierte, fixierte Thrombozyten auf 24-well-Platten verwendet. Die Thrombozyten wurden zwei mal mit $300 \mu\text{l}$ PBS gewaschen, dann wurden 1×10^6 Zellen in $300 \mu\text{l}$ Medium pro well hinzugefügt. Die Kontrollen wurden ohne Thrombozyten durchgeführt: Die Negativkontrollen enthielten 1×10^6 Zellen in $300 \mu\text{l}$ Medium und $10 \mu\text{M}$ PBS, die Positivkontrollen enthielten 1×10^6 Zellen in $300 \mu\text{l}$ Medium und $10 \mu\text{M}$ STS. Nach einer Inkubation von 5 Stunden bei 37°C wurden die Suspensionen in FACS-Röhrchen überführt und bei 1200rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet wurde zweimal mit $300 \mu\text{l}$ PBS gewaschen und nochmal bei 1200rpm für fünf Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100µl „binding buffer“ resuspendiert. Zu jeder Probe wurden je 5µl Annexin und PI hinzugefügt. Die Proben wurden sanft auf dem Vortexer geschüttelt und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 400µl „binding buffer“ hinzugefügt und die Proben innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch am FACS-Gerät gemessen.

2.7.3 Durchführung des Annexin-PI-Stainings mit murinen Thrombozyten

Es wurden $0,6 \times 10^5$ murine HL-1 Zellen in 300µl Medium auf einer 24-well Platte ausgesät und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden pro well 1×10^8 fixierte Thrombozyten zugegeben, zu den Kontrollen wurden keine Thrombozyten hinzugefügt. Die Negativkontrolle wurde mit 10µM PBS versetzt, die Positivkontrolle wurde mit 10µM STS versetzt. Anschließend wurde die Platte bei 200g drei Minuten lang zentrifugiert, danach folgte die Koinkubation von 17 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 300µl PBS gewaschen und von der Platte abtrypsiniert. Die Suspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und bei 1200rpm abzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit 300 µl PBS, bevor die Zellen in 100µl „binding buffer“ aufgenommen wurden. Zu jeder Probe wurden nun je 5µl Annexin und PI hinzugefügt. Die Proben wurden sanft auf dem Vortexer geschüttelt und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 400µl „binding buffer“ hinzugefügt und die Proben innerhalb einer Stunde am FACS-Gerät gemessen.

2.7.4 Analyse des Annexin-PI-Stainings:

Durchflusszytometrie mit FACS (fluorescence activated cell sorter)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen quantitativ analysiert werden. Gemessen wird die Lichtstreuung an den Zellen, außerdem kann nach Färbung der Zellen mit bestimmten Farbstoffen das emittierte Fluoreszenzlicht gemessen werden. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare angesaugt und durch einen Laserstrahl geleitet, der die Zellen anregt. Im angeregten Zustand erzeugen die Zellen, abhängig von ihrer Struktur oder Färbung, unterschiedliche Effekte. Das Vorwärtsstreulicht ("forward scatter" = FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist abhängig vom Volumen der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht ("side scatter" = SSC) ist ein Maß für die Lichtbrechung um 90° und hängt von der Granularität der Zellen ab. Mit diesen Parametern lassen sich zum Beispiel Zellen im Vollblut gut differenzieren. Um die Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzlicht unterscheiden zu können, müssen sie zuvor mit bestimmten Farbstoffen oder markierten Antikörpern angefärbt werden. Diese binden an die Zellen und strahlen, nachdem sie durch das monochromatische Licht des Lasers angeregt worden sind, Licht in einer bestimmten Wellenlänge ab. Dieses Fluoreszenzlicht nimmt proportional zur Menge des Farbstoffes zu, den die Zellen gebunden haben.

Durch Anfärbung der Zellen mit Hilfe des FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I kann in der Durchflusszytometrie bestimmt werden, welche Zellen sich in Apoptose befinden. Die Differenzierung der Zellen erfolgte mit dem Programm „CellQuest pro“.

2.8 TUNEL-Staining

2.8.1 Funktionsprinzip TUNEL-Staining und DAPI-Gegenfärbung

Die Abkürzung TUNEL steht für „terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling“, es handelt sich um eine Methode zur Darstellung der Zellkerne apoptotischer Zellen. Das Prinzip der TUNEL-Färbung beruht auf dem Abbau des DNA-Doppelstrangs während der Apoptose. Die DNA wird von bestimmten Endonukleasen fragmentiert und es entstehen freie Hydroxygruppen an den Bruchstücken. Diese werden durch das Enzym terminal desoxynucleotidyl transferase (Tdt) mit Fluorescein-markierten dUTP-Molekülen bestückt. Die so markierten Endstücke können dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, sie erscheinen unter UV-Anregung rot. Die TUNEL-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer DAPI-Färbung (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol) kombiniert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Gegenfärbung der Zellkerne verwendet werden kann. Er fluoresziert unter UV-Anregung blau. Durch die Doppelfärbung mit TUNEL und DAPI kann die Anzahl der apoptotischen Zellkerne in Relation zur Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt werden.

2.8.2 Durchführung TUNEL-Staining

TUNEL-Stainings wurden mit Hilfe des In situ cell detection kits auf chamber slides durchgeführt, pro well wurden 2×10^4 HL-1 Zellen in 100µl Medium ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht in den Brutschrank gestellt, um sich zu adhären. Am nächsten Tag wurde die Zelladhärenz mikroskopisch kontrolliert, dann erfolgte die Zugabe der Thrombozyten. Die Thrombozyten waren nach der Isolation fünf Minuten mit 100µM ADP (Adenosindiphosphat) stimuliert worden, um sie zu aktivieren. Anschließend wurden sie mit 4% PFA fixiert und nach einem Waschschrift mit PBS bis zur Verwendung in PBS

aufbewahrt. Pro well wurden nun 1×10^8 Thrombozyten in 20 μ l PBS hinzugefügt, nur zur Positiv- und Negativkontrolle wurden keine Thrombozyten zugegeben. Nach 16-stündiger Koinkubation bei 37°C wurden die Thrombozyten abgenommen und die Zellen mit 4% PFA eine Stunde lang fixiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit 100 μ l PBS von jeweils 15 Minuten, bevor die Zellen für eine Stunde mit „permeabilization solution“ (0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat, gelöst in PBS) versetzt wurden. Es folgten drei weitere Waschschrte mit 100 μ l PBS von jeweils fünf Minuten. Dann wurde die Positivkontrolle für zehn Minuten mit DNaseI und TrisHCl sowie BSA 1mg/ml in PBS gelöst, behandelt. Die DNaseI soll in der Positivkontrolle die Spaltung der DNA bewirken. Schließlich wurde die „reaction mixture“ für zehn Minuten zu Positivkontrolle und Proben hinzugefügt. Die „reaction mixture“ wurde 1:10 aus dem „reaction enzyme“ Tdt und der „label solution“, welche die Fluorescein-markierten dUTP-Moleküle enthält, hergestellt. Die Negativkontrolle wurde nur mit „label solution“ behandelt. Anschließend wurden alle Proben mit 1:3000 mit DAPI versetzt und zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die chambers entfernt, Mountain-Medium auf den Objektträger gegeben und ein Deckglas angedrückt. Die Färbung trocknete über Nacht.

2.8.3 Auswertung TUNEL-Staining:

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit den jeweiligen Filtern für Fluorescein und DAPI. Zellkerne intakter Zellen stellten sich auf Grund der DAPI-Färbung blau dar, TUNEL-positive Zellkerne erschienen rot angefärbt. Die Objektträger wurden für beide Filter aus jeweils drei Gesichtsfeldern bei 20facher Vergrößerung fotografiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte nach Überlagerung der beiden Fotos mit dem Programm ImageJ. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde dabei ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt.

2.9 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mittels Student t-Test auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit Excel, Grafiken wurden mit Graph Pad Prism erstellt.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte.

Der erste Abschnitt befasst sich mit der Induktion von Apoptose durch Thrombozyten an ausgewählten Zelllinien.

Im zweiten Abschnitt wurde untersucht, ob bestimmte Medikamente, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen, einen Effekt auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose haben. Es wurde ASS, Angiox und NPlate verwendet.

3.1 Humane und murine Thrombozyten induzieren Apoptose in vitro

Die Annahme, dass Thrombozyten in anderen Zellen Apoptose induzieren können, wurde an ausgewählten Zelllinien mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Zellen wurden dazu zunächst mit Thrombozyten inkubiert, danach wurde die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Hierfür wurden Caspase Assays, Annexin V-FITC – Propidiumjodid - Färbungen und TUNEL-Stainings herangezogen. In den Negativkontrollen wurden die Zellen nicht mit Thrombozyten, sondern nur mit PBS inkubiert.

Für die ersten Versuche wurden Jurkat A3-Zellen verwendet, der A3 Zellklon ist hochempfindlich für die Fas-induzierte Apoptose. Es konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass Thrombozyten Apoptose in Jurkat A3-Zellen induzieren.

Abb. 5 zeigt, dass Thrombozyten konzentrationsabhängig Apoptose in Jurkat A3-Zellen induzieren. Als Maß für die Apoptoserate wurde die Caspase 3/7 Aktivität verwendet. Verglichen wird die Apoptoserate der Zellen nach Koinkubation mit Thrombozyten, mit der Apoptoserate der Zellen in der Negativkontrolle ohne Koinkubation mit Thrombozyten. In der Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit PBS inkubiert.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten nach sechsstündiger Koinkubation von Zellen und Thrombozyten, zur genaueren Differenzierung des Ablaufs wurden verschiedene Thrombozytenkonzentrationen benutzt. Verglichen mit den Kontrollen kann in Zellen, die mit Thrombozyten inkubiert wurden, eine signifikant höhere Apoptoserate festgestellt werden. Dieser Effekt ist bei allen Thrombozytenkonzentrationen (3×10^7 , 1×10^8 und 2×10^8 Thrombozyten pro well) zu beobachten, wobei die Apoptoserate mit steigender Thrombozytenkonzentration zunimmt.

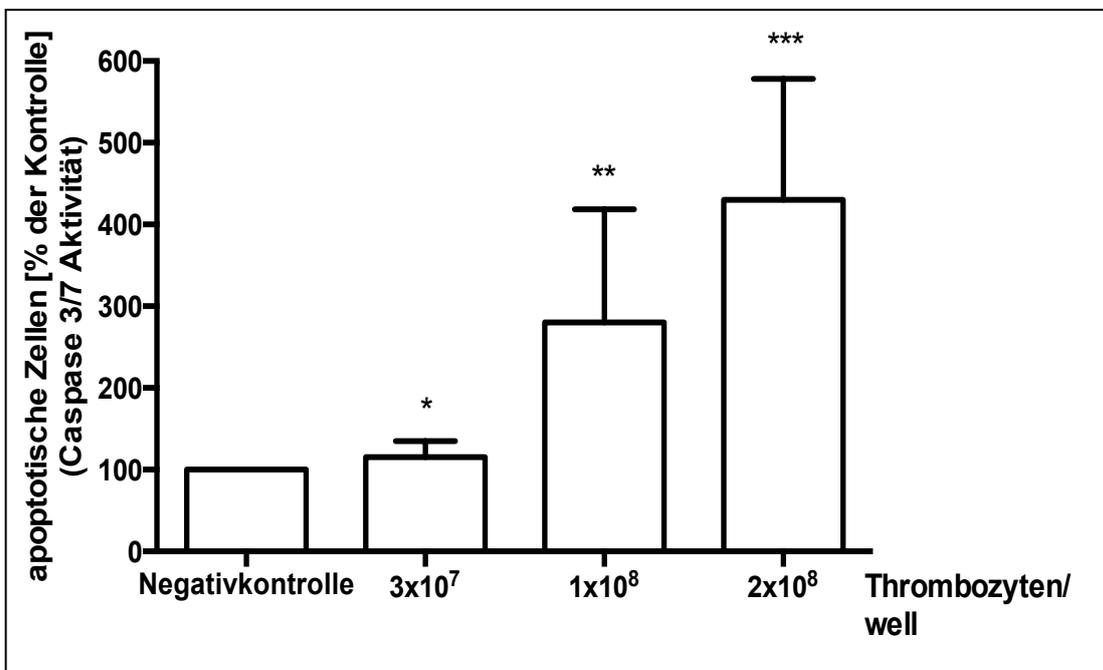


Abb.5 Thrombozyten induzieren konzentrationsabhängig Apoptose in Jurkat-Zellen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit PBS behandelt. Nach sechsstündiger Koinkubation wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den Jurkat A3-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=8), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dieses Ergebnis konnte in der Durchflusszytometrie reproduziert werden, auch hier zeigen sich in Jurkat A3-Zellen nach Inkubation mit Thrombozyten signifikant höhere Apoptosewerte (Abb. 6a). Zur Identifizierung apoptotischer Zellen wurde ein Annexin-PI-Staining herangezogen.

Es kann zwischen nicht-apoptotischen - (Annexin V- FITC negativ / PI negativ), apoptotischen - (Annexin V-FITC positiv / PI- negativ), spät-apoptotischen - und toten - (Annexin V-FITC positiv / PI positiv) sowie nekrotischen Zellen (Annexin V-FITC negativ / PI positiv) differenziert werden. Verglichen wird die Apoptose-rate der Zellen nach Inkubation mit Thrombozyten mit der Apoptoserate der Zellen in der Negativkontrolle mit PBS. In der Positivkontrolle wurde zur Apoptoseinduktion der Proteinkinaseinhibitor STS verwendet. Die Messung erfolgte nach fünfstündiger Inkubation.

Nach Inkubation mit Thrombozyten sind signifikant mehr apoptotische Zellen in den Proben enthalten, als in den Negativkontrollen mit PBS. Thrombozyten induzieren in circa 50% der enthaltenen Zellen Apoptose, damit erreichen die Proben ähnliche Werte wie die Positivkontrollen mit STS.

Abb. 6b veranschaulicht die Verteilung der Zellen in der Durchflusszytometrie. Zu beachten ist der Unterschied im rechten unteren Quadranten der Darstellung, welcher die apoptotischen Zellen repräsentiert: Nach Inkubation Thrombozyten können signifikant mehr apoptotische Zellen detektiert werden, als in der Negativkontrolle mit PBS. Die Negativkontrolle enthält 3,26% apoptotische Zellen, in der Probe sind es 67,87%.

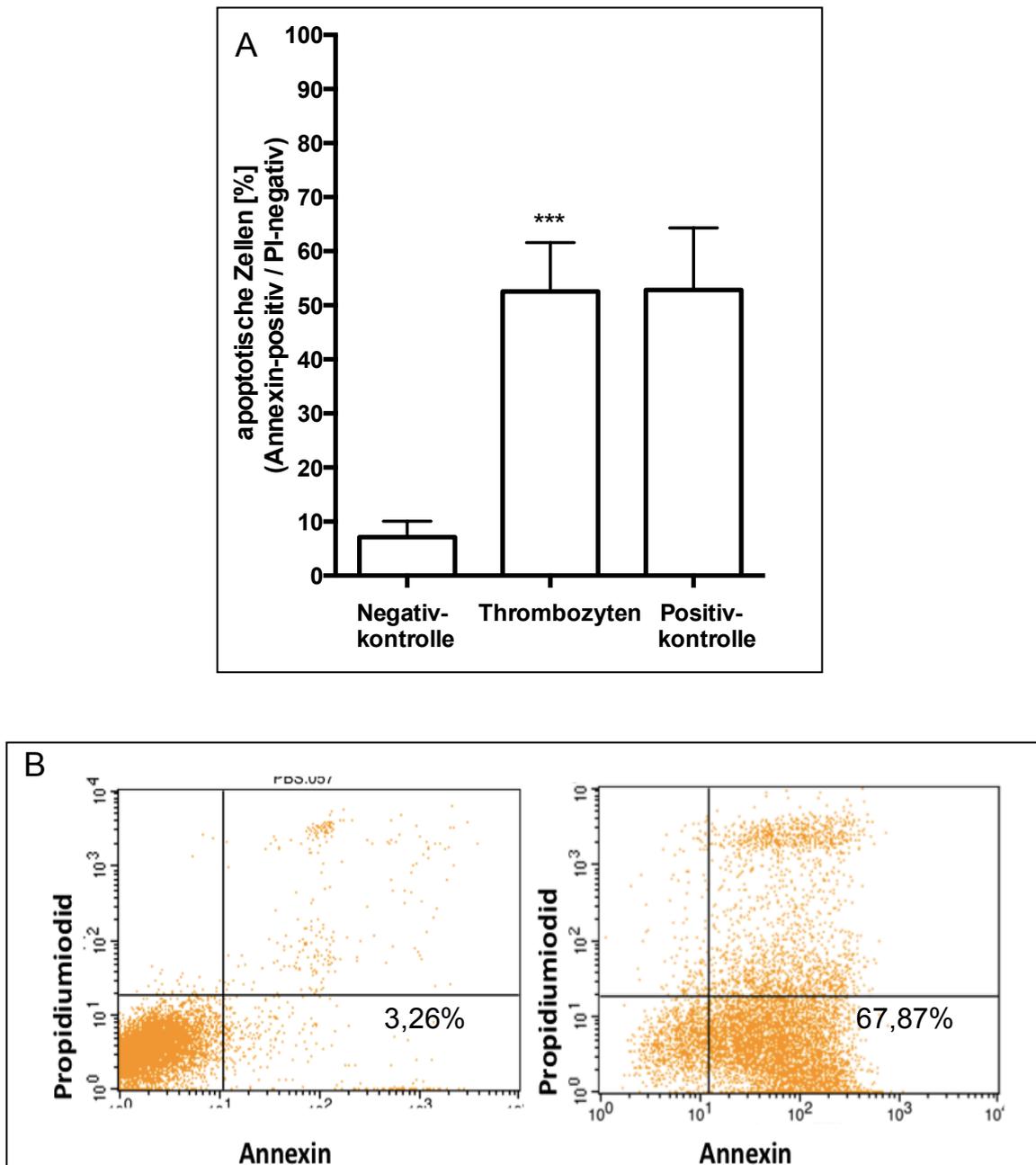


Abb. 6A+B Thrombozyten induzieren Apoptose in Jurkat A3-Zellen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. In der Positivkontrolle wurden die Zellen mit STS behandelt, um Apoptose auszulösen. Nach 5 Stunden wurden die Jurkat A3-Zellen durchflusszytometrisch untersucht, wobei Annexin-positive und PI-negative Zellen als apoptotisch gewertet wurden. **A** Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=8). *** p < 0,001.

B Darstellung der Durchflusszytometrie, Negativkontrolle enthält 3,26% apoptotische Zellen (linkes Bild), nach Inkubation mit Thrombozyten sind 67,78% apoptotische Zellen enthalten (rechtes Bild).

In der Durchflusszytometrie fällt außerdem auf, dass nach Inkubation mit Thrombozyten der Anteil an spätapoptotischen und toten Zellen signifikant höher ist, als in den Negativkontrollen (Abb. 7). Die Detektion erfolgte ebenfalls mit Annexin-PI-Staining.

Abb. 7 zeigt den Anteil an spätapoptotischen und toten Zellen Jurkat A3-Zellen, wobei dies nach Inkubation mit Thrombozyten circa 20% der Zellen sind und damit signifikant mehr als in der Negativkontrolle.

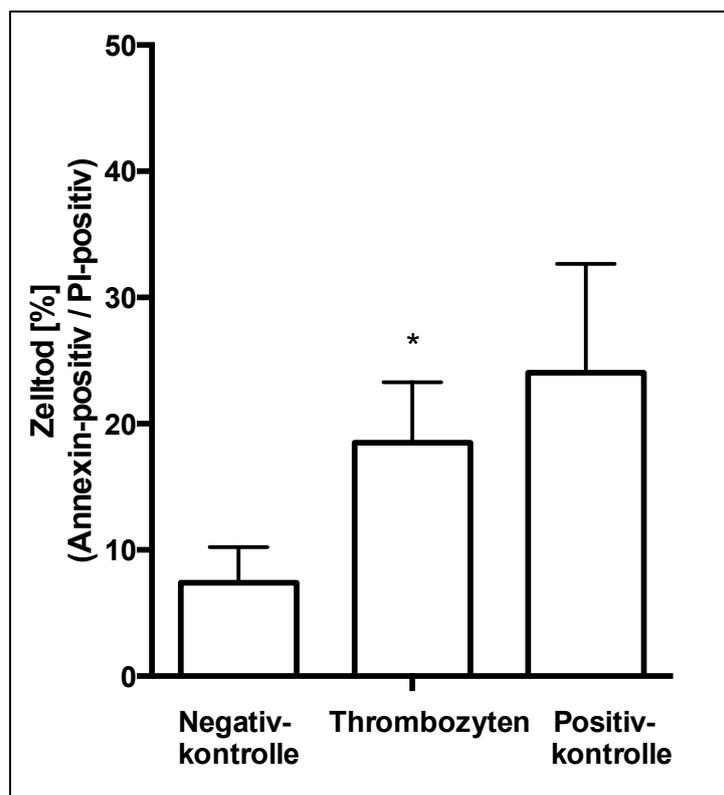


Abb.7 Inkubation mit Thrombozyten erhöht die Anzahl an spätapoptotischen und toten Jurkat A3-Zellen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. In der Positivkontrolle wurden die Zellen mit STS behandelt, um Apoptose auszulösen. Nach 5 Stunden wurden die Jurkat A3-Zellen durchflusszytometrisch untersucht, wobei Annexin-positive und PI-positive Zellen als spätapoptotisch oder nekrotisch gewertet wurden. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=8). *p<0,05.

Neben Jurkat A3 wurde der wildtypische Zellklon Jurkat J16 für Versuche ausgewählt, da diese Zellen ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit für die Fas-induzierte Apoptose aufweisen. Als Maß für die Apoptoserate diente die Caspase 3/7 Aktivität. Auch in diesen Zellen induzieren Thrombozyten Apoptose, die Apoptoserate steigt in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration an. Abbildung 8 stellt den Anteil apoptotischer Jurkat J16-Zellen nach Inkubation mit Thrombozyten dar. Verglichen mit der Negativkontrolle kann in Zellen, die mit Thrombozyten inkubiert wurden, eine signifikant höhere Apoptoserate festgestellt werden. Dieser Effekt ist bei Thrombozytenkonzentrationen von 1×10^8 und 2×10^8 pro well zu beobachten, bei 3×10^7 Thrombozyten pro well ergibt sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle.

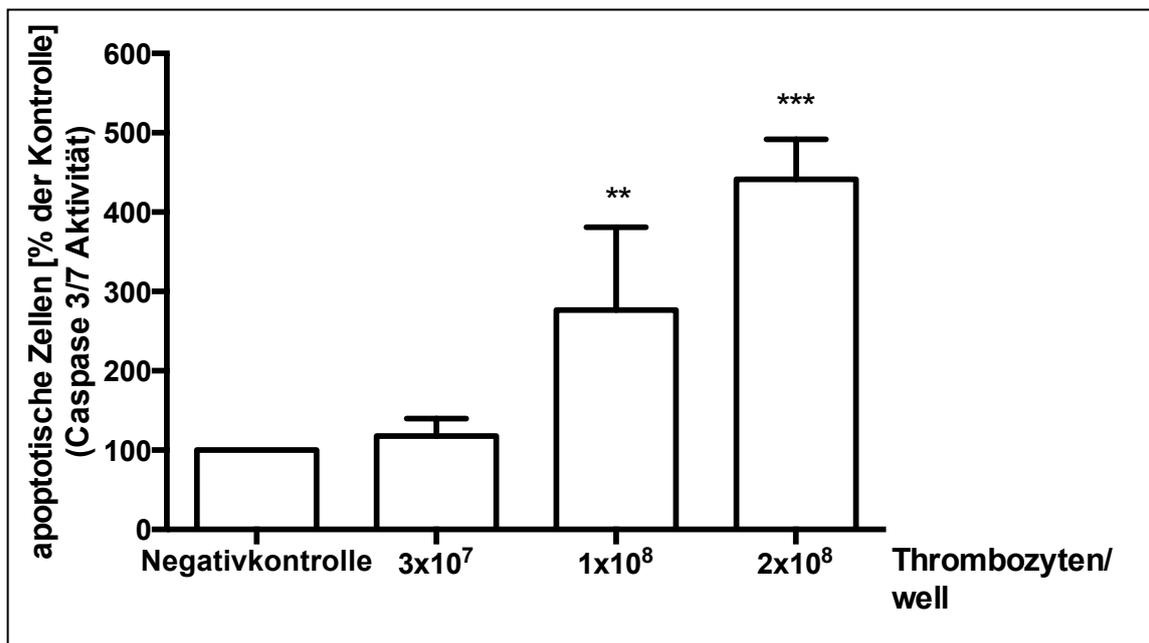


Abb.8 Thrombozyten induzieren konzentrationsabhängig Apoptose in Jurkat J16-Zellen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit Jurkat J16-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. Nach sechsständiger Koinkubation wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den Jurkat J16-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar ($n=3$), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Neben den beiden Zellarten aus der T-Zellreihe wurden KG1-Zellen als myeloische Zellen ausgewählt (siehe 2.2). Auch in diesen kann nachgewiesen werden, dass Thrombozyten Apoptose induzieren.

Abb. 9a zeigt, dass die Apoptoserate in KG1-Zellen nach Inkubation mit Thrombozyten in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration gegenüber der Negativkontrolle signifikant ansteigt. Als Maß für die Apoptoserate wurde die Caspase 3/7 Aktivität verwendet, die Fluoreszenzmessung erfolgte nach sechsständiger Koinkubation von Zellen und Thrombozyten. Dieses Ergebnis konnte in der Durchflusszytometrie reproduziert werden (Abb. 9b), hier wurde die Apoptoserate mittels Annexin-PI-Staining detektiert. Auch in diesem Fall sind nach Inkubation mit Thrombozyten deutlich mehr apoptotische Zellen vorhanden, als in den Negativkontrollen. Im Durchflusszytometer konnten nach Inkubation mit Thrombozyten 21,5% apoptotische Zellen detektiert werden, in der Negativkontrolle mit PBS sind nur 10,22% der Zellen apoptotisch.

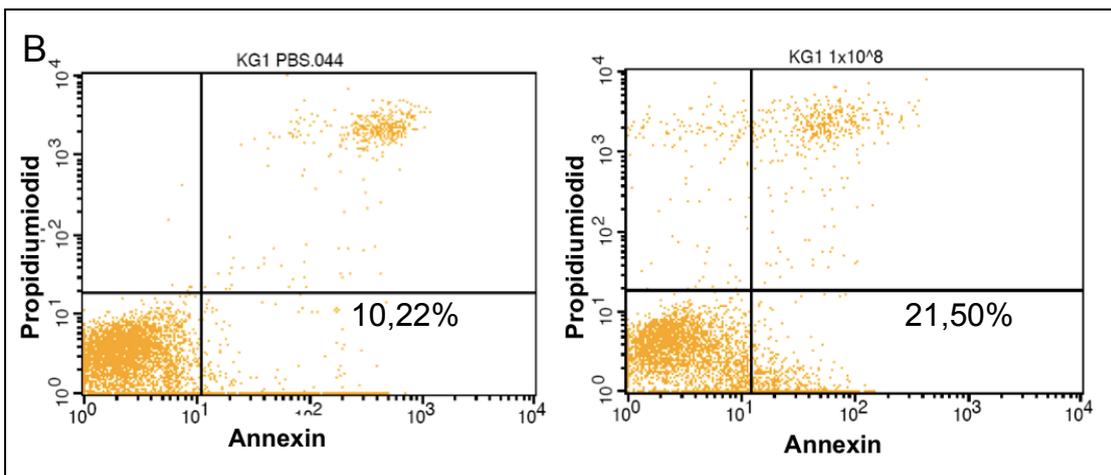
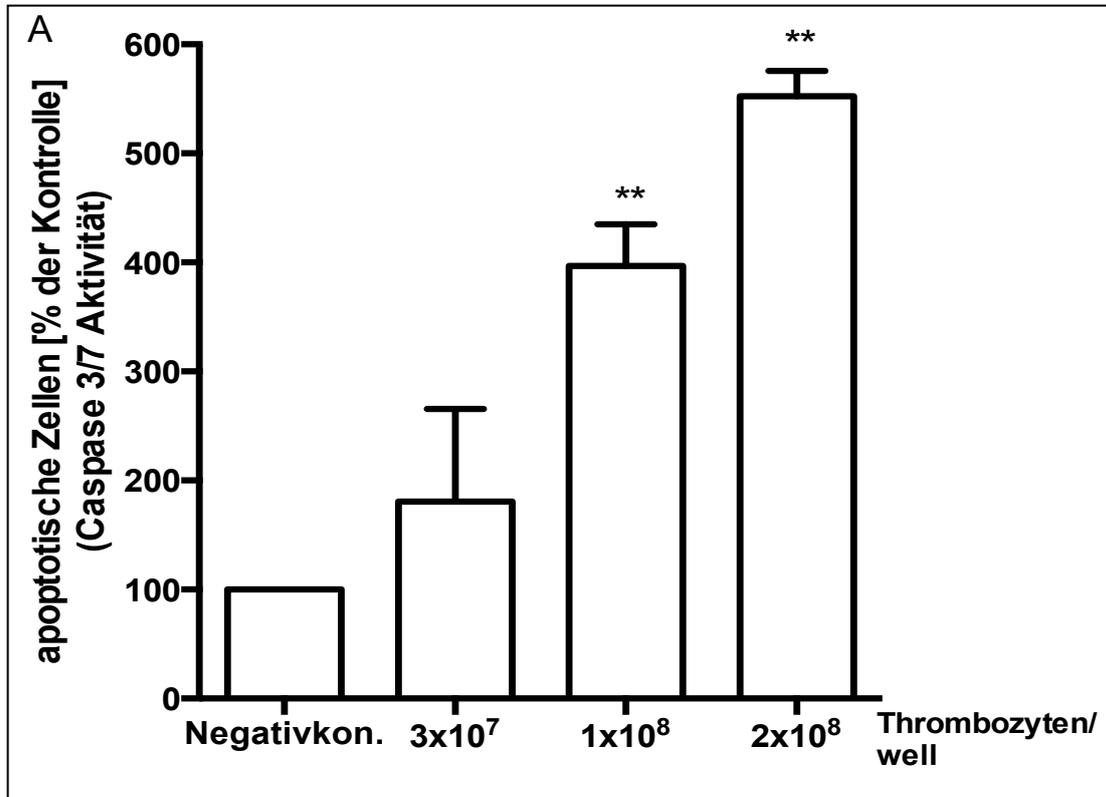


Abb.9A+B Thrombozyten induzieren konzentrationsabhängig Apoptose in KG1-Zellen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit KG1-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. **A** Nach sechs Stunden wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den KG1-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar ($n=3$), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. ** $p < 0,01$.

B Darstellung der Durchflusszytometrie, Negativkontrolle enthält 10,22% apoptotische Zellen (links), nach Inkubation mit Thrombozyten sind 21,5% apoptotische Zellen enthalten(rechts).

Um die Bedeutung der Thrombozyten-induzierten Apoptose für murine Zellen zu untersuchen, wurde die Zelllinie HL-1 ausgewählt (siehe 2.2). Auch in HL-1-Zellen konnte durch Inkubation mit murinen Thrombozyten Apoptose ausgelöst werden (Abb 10). Die Apoptoserate wurde mittels TUNEL-Staining ermittelt.

Abb. 10a zeigt den Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation mit murinen Thrombozyten sowie in den Positiv- und Negativkontrollen. Die Auswertung erfolgte nach 16-stündiger Koinkubation von Zellen und Thrombozyten. Die Negativkontrolle wurde mit PBS durchgeführt, in der Positivkontrolle wurden die Zellen mit DNase I behandelt, um Apoptose auszulösen.

Nach Inkubation mit Wildtyp-Thrombozyten sind unter dem Fluoreszenzmikroskop signifikant mehr apoptotische Zellen erkennbar, als in den Kontrollen.

Abb. 10b-d zeigen die Thrombozyten-induzierte Apoptose in HL-1 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in 20-facher Vergrößerung. Die Fotos der beiden Filter DAPI und Fluorescein sind überlagert dargestellt: Zellkerne sind blau angefärbt, apoptotische Zellen stellen sich rot dar. Bei den mit Thrombozyten inkubierten Zellen können signifikant mehr apoptotische Zellen detektiert werden, als in der Negativkontrolle

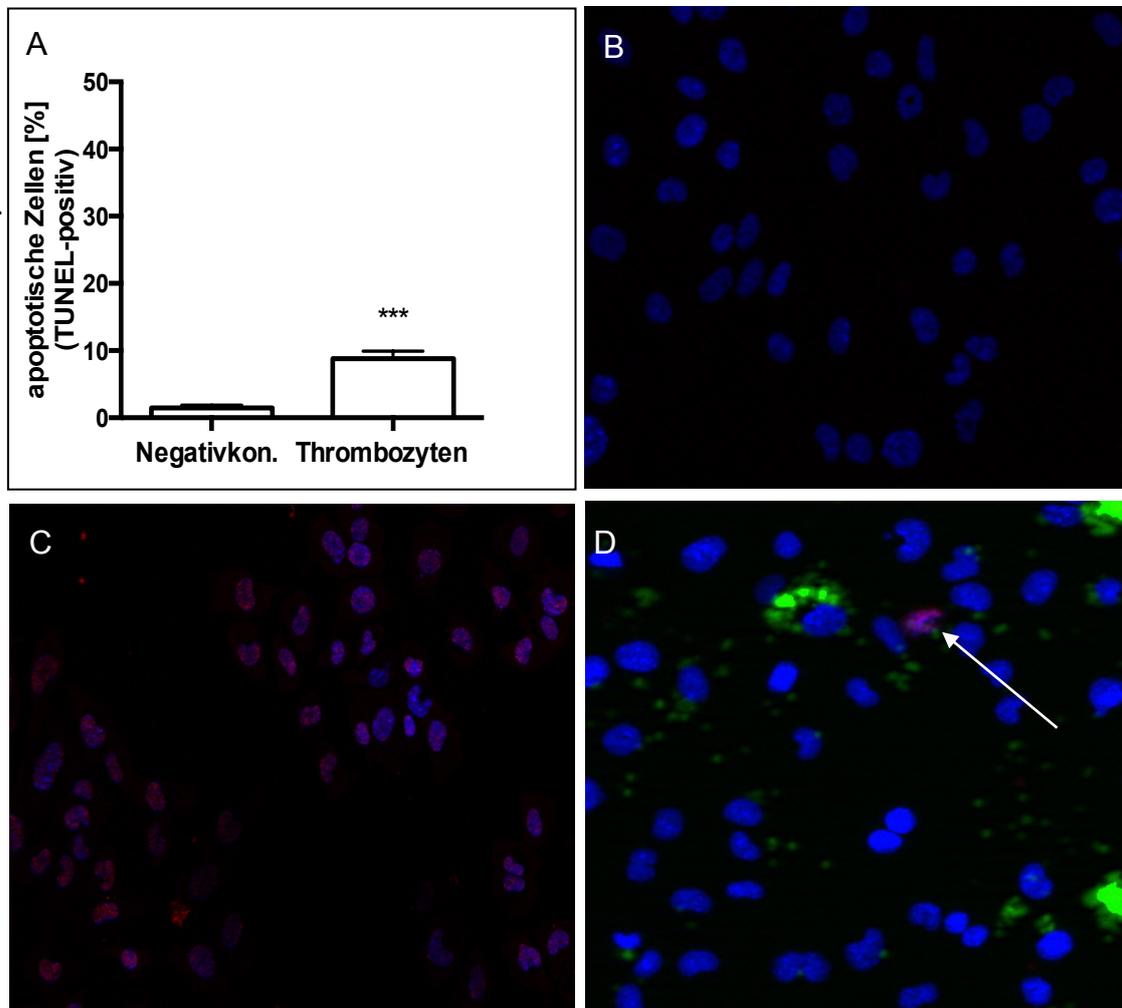


Abb.10A-D: Murine Thrombozyten induzieren Apoptose in HL-1 Zellen

A Isolierte murine Thrombozyten wurden mit HL-1-Zellen inkubiert, in der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. In der Positivkontrolle wurden die Zellen mit DNase I behandelt, um Apoptose auszulösen. Nach 16 Stunden wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wobei TUNEL-positive HL-1-Zellen als apoptotisch gewertet wurden. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=7). ***p <0,001. **B-D:** HL-1-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in 20facher Vergrößerung **B** Negativkontrolle: Zellkerne sind blau angefärbt, **C** Positivkontrolle: apoptotische Zellkerne sind rot markiert (=TUNEL-positiv), **D** nach Inkubation mit WT-Thrombozyten (grün). TUNEL-positive Zelle siehe Pfeil.

3.2 Effekt von ASS, Angiox und NPlate auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose

Um Schlussfolgerungen über die Auswirkungen von Medikamenten, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen, auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose zu treffen, wurden die Thrombozyten mit Aspirin, Angiox und NPlate vorbehandelt. Danach erfolgte die Koinkubation der behandelten Thrombozyten mit Jurkat A3-Zellen. Als Kontrollen dienten Jurkat A3-Zellen, die mit unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden. Zur Messung der Apoptoserate wurden Caspase-Assays und Annexin V-FITC – Propidiumjodid – Färbungen verwendet.

Experimente mit ASS ergeben, dass mit ASS vorbehandelte Thrombozyten eine signifikant höhere Apoptoserate in Jurkat A3-Zellen erzielen, als unbehandelte Thrombozyten (Abb. 11a). Als Maß wurde die Caspase 3/7 Aktivität verwendet. Es wurde mit ASS-Konzentrationen von 100 μ M und 500 μ M vorbehandelt, wobei ein Effekt nur bei 500 μ M feststellbar ist. Nach Behandlung der Thrombozyten mit 100 μ M ist kein Unterschied zur Inkubation mit unbehandelten Thrombozyten messbar (nicht abgebildet). Der gleiche Effekt ist in der Durchflusszytometrie zu beobachten, hier wurde die Apoptoserate mittels Annexin-PI-Staining ermittelt (Abb 11c). Auch hier erzielen mit ASS vorbehandelte Thrombozyten in Jurkat A3-Zellen höhere Apoptoseraten als unbehandelte Thrombozyten. Abbildung 11c zeigt, dass Jurkat A3-Zellen nach Inkubation mit ASS-behandelten Thrombozyten zu 78,25% apoptotisch sind, in der Kontrolle mit unbehandelten Thrombozyten sind nur 67,87% der Zellen apoptotisch. In der Durchflusszytometrie zeigt sich außerdem, dass mit ASS vorbehandelte Thrombozyten die Anzahl lebender Zellen in den Proben signifikant reduzieren, verglichen mit unbehandelten Thrombozyten:

Abb. 11b zeigt, dass in den Proben signifikant weniger intakte Zellen vorhanden sind, als in den Kontrollen.

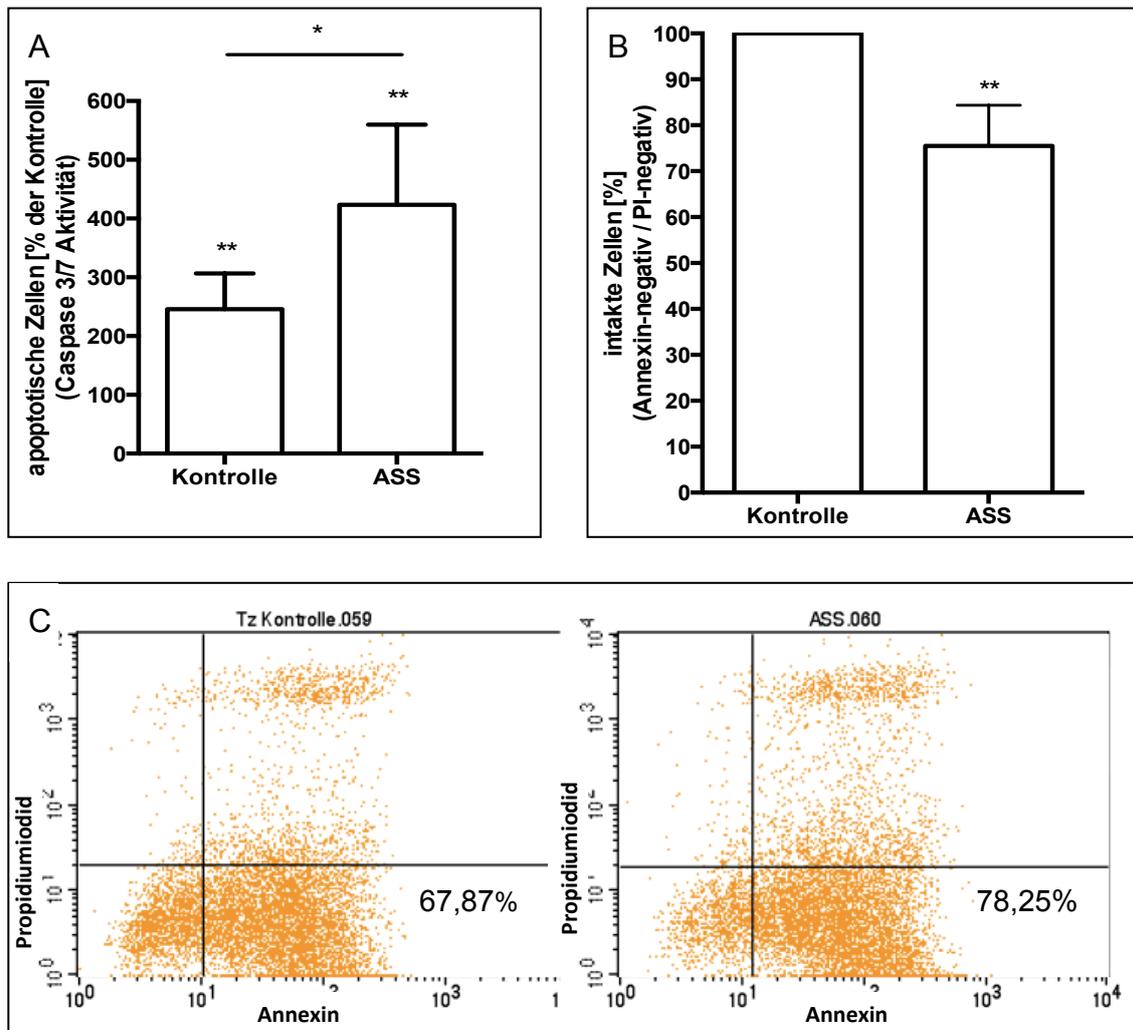


Abb. 11A-C: Mit ASS behandelte Thrombozyten induzieren höhere Apoptoseraten in Jurkat A3-Zellen und reduzieren die Anzahl der intakten Zellen, verglichen mit unbehandelte Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 500 μ M-ASS behandelt und mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, als Kontrolle dienten Jurkat A3-Zellen, die mit unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden. In der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. **A** Nach 5 Stunden wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den Jurkat A3-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=4), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. *p <0,05, **p<0,01. **B** intakte Zellen in der Durchflusszytometrie. Annexin-positive und PI-negative Zellen wurden als intakte Zellen gewertet. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=10). ** p <0,01. **C** Jurkat A3 inkubiert mit ASS-behandelten Thrombozyten (rechtes Bild), Kontrolle mit Jurkat A3-Zellen, die mit unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden (linkes Bild). Nach 5 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht, wobei Annexin-positive und PI-negative Zellen als apoptotisch gewertet wurden (rechter unterer Quadrant).

Es wurde versucht, diese Ergebnisse auf murine Zellen zu übertragen, indem murine Thrombozyten mit ASS vorbehandelt und anschließend mit HL-1 Zellen inkubiert wurden. In der Durchflusszytometrie mit HL-1-Zellen ergibt sich jedoch kein Unterschied in der Apoptoserate nach Inkubation mit ASS-behandelten- und unbehandelten murinen Thrombozyten.

Als weiteres Medikament mit Wirkung auf die Thrombozytenfunktion wurde der Thrombin-Inhibitor Angiox ausgewählt. Die Untersuchung ergibt, dass Angiox die Thrombozyten-induzierte Apoptose nicht signifikant beeinflusst (Abb 12). Als Maß für die Apoptoserate wurde Caspase 3/7 Aktivität verwendet. In Abb. 12 ist dargestellt, dass beide Proben sich zwar signifikant von der Negativkontrolle unterscheiden, jedoch kein Unterschied in der Apoptoserate nach Inkubation mit Angiox-behandelten Thrombozyten und unbehandelten Thrombozyten messbar ist.

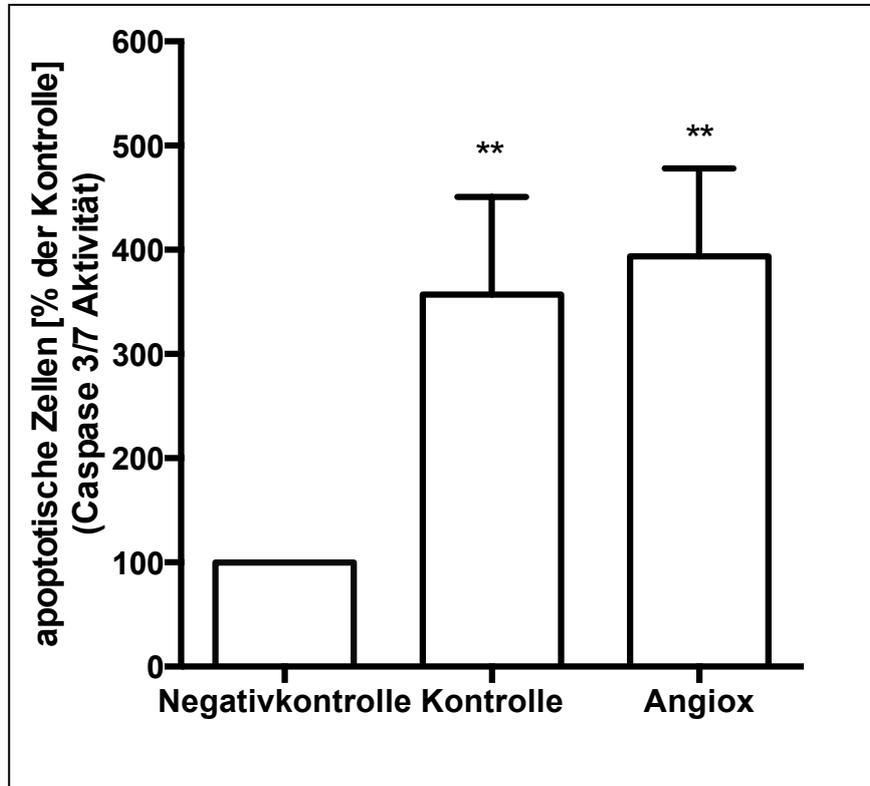


Abb.12 Mit Angiox behandelte Thrombozyten haben den gleichen Effekt auf Jurkat A3-Zellen wie unbehandelte Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 50mg/ml Angiox behandelt und mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, als Kontrolle dienten Jurkat A3-Zellen, die mit unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden. In der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. Nach sechs Stunden wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den Jurkat A3-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=3), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. **p<0,01.

Eine ganz andere Wirkung auf Thrombozyten hat der Thrombopoetin-Rezeptor-Agonist NPlate, der ebenfalls für Experimente herangezogen wurde. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die mit NPlate-behandelten und unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden: In Abbildung 13 ist dargestellt, dass sich nach Inkubation mit Nplate-behandelten Thrombozyten eine signifikant niedrigere Apoptoserate ergibt, als in der Kontrolle mit unbehandelten Thrombozyten. Als Maß für die Apoptoserate wurde die Caspase 3/7 Aktivität herangezogen.

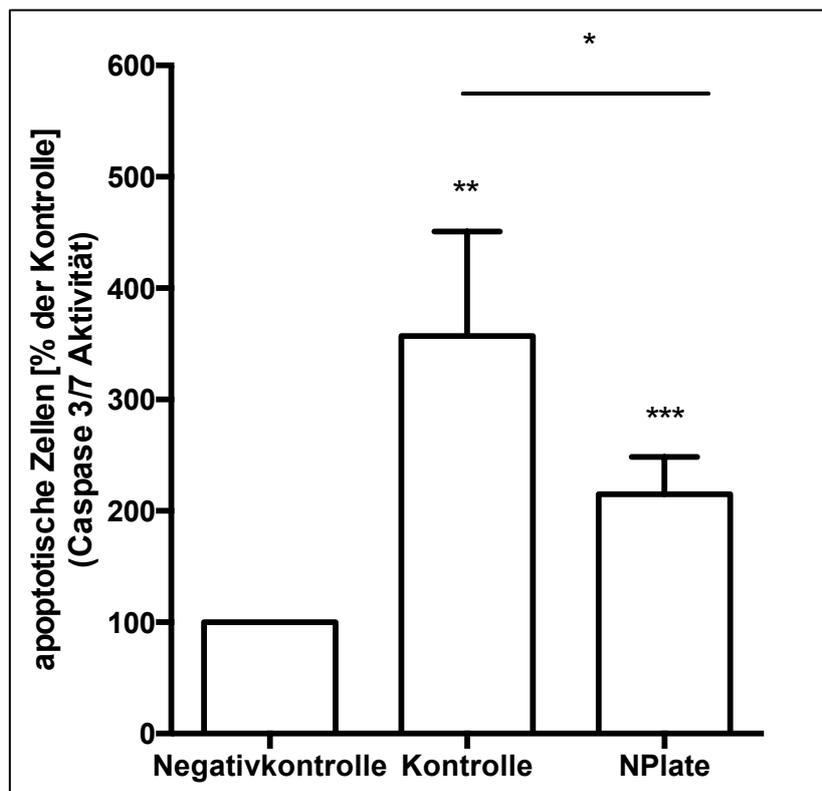


Abb.13 Mit NPlate behandelte Thrombozyten induzieren niedrigere Apoptoseraten in Jurkat A3-Zellen als unbehandelte Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 500 μ g/ml NPlate behandelt und mit Jurkat A3-Zellen inkubiert, als Kontrolle dienten Jurkat A3-Zellen, die mit unbehandelten Thrombozyten inkubiert wurden. In der Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. Nach sechs Stunden wurde die zelluläre Caspase 3/7 Aktivität in den Jurkat A3-Zellen gemessen. Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar (n=3), die Negativkontrolle wurde 100% gesetzt. *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001.

4. Diskussion

Thrombozyten enthalten verschiedene biologisch aktive Stoffe, durch die sie auf unterschiedliche Weise auf andere Zellen einwirken können. Sie besitzen außerdem eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, die ihnen erlauben, mit anderen Zellen und Liganden in Kontakt zu treten. Diese Voraussetzungen ermöglichen ihnen die Beteiligung an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, zum Beispiel an der Hämostase und der Entstehung von Thrombosen, an entzündlichen Prozessen⁸ sowie an der Gewebereparatur¹¹ und der Immunabwehr¹². Ahmad et. al haben im Jahr 2001 beschrieben, dass Thrombozyten große Mengen an Fas-Ligand enthalten, diesen bei Aktivierung auf der Membran exprimieren und in Fas-positiven humanen Tumorzellen über Fas-L Apoptose induzieren können⁷. Die Fas-L induzierte Apoptose spielt an anderer Stelle eine entscheidende Rolle in der Gewebemöostase, der Aufrechterhaltung der Immunabwehr und der Kontrolle von malignen Zellen⁷. Die Beobachtungen von Ahmad et al. legen nahe, dass die Fas-L induzierte Apoptose auch eine Rolle im Funktionsbereich von Thrombozyten spielen könnte. Vor dem Hintergrund ihrer Multifunktionalität und der Beteiligung an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ist es denkbar, dass Thrombozyten, zum Beispiel im Rahmen der Hämostase oder bei der Entstehung und Progression von Atherosklerose, in bestimmten anderen Zellen Apoptose induzieren. Apoptose spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Gewebemöostase² und Thrombozyten könnten über die Fas-L induzierte Apoptose darauf Einfluss nehmen.

Es ist eine spannende Frage, in wieweit diese Annahme die Einschätzung der bisher bekannten Funktionen von Thrombozyten beeinflusst. Diese Überlegungen werfen interessante Fragen für die Bedeutung der Thrombozyten-induzierten Apoptose in vivo auf und waren Grund für die durchgeführten Versuche.

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass Thrombozyten in der Lage sind, in verschiedenen Fas-positiven Zellen Apoptose zu induzieren. Damit wird die oben genannte Hypothese von Ahmad et. al bestätigt. Ahmad und Kollegen haben Thrombozyten mit Fas-positiven Leukämiezellen inkubiert. Zur Messung der Apoptoserate wurden Phosphatidylinositol-Färbungen und Proliferationsassays verwendet, sowie die H-Thymidinaufnahme der Zellen dargestellt. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Methoden angewendet, die jeweils spezifisch apoptotische Zellen darstellen. Dagegen haben Ahmad et al. lediglich eine sinkende Proliferation der Leukämiezellpopulation beweisen können.

Die vorliegenden Daten haben die Hypothese von Ahmad et al. an mehreren Zelllinien bestätigt. Konkret konnte gezeigt werden, dass humane Thrombozyten bei Inkubation mit den Leukämie-Zellen Jurkat A3- und Jurkat J16 sowie mit myeloischen KG1-Zellen in diesen Zellen Apoptose auslösen. Je mehr Thrombozyten bei der Inkubation verwendet werden, umso höher ist die Apoptoserate in den Zellen. Außerdem zeigt sich, dass die Inkubation mit Thrombozyten die Anzahl an toten Zellen signifikant erhöht. Diese Zellen haben vermutlich bereits das Endstadium der Apoptose erreicht und sind nur noch als tote Zellen detektierbar.

Dass auch murine Thrombozyten in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, kann im Experiment mit murinen HL-1 Zellen dargestellt werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass diese Versuche nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind, da sich murine Thrombozyten in einigen Aspekten wesentlich von humanen Thrombozyten unterscheiden. So besitzen Mäuse zum Beispiel eine höhere Anzahl an Thrombozyten pro Mikroliter Blut, zudem ist das Expressionsmuster ihrer thrombozytären Oberflächenrezeptoren anders¹⁶.

Der Sachverhalt, dass Thrombozyten in anderen Zellen Apoptose induzieren, könnte bisher ungeahnte Aspekte im Funktionsbereich der Blutplättchen eröffnen. In zwei Studien konnte bereits ein konkreter Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Apoptose beschrieben werden, nämlich dass Thrombozyten im Rahmen der Sepsis in der Lage sind, Apoptose in bestimmten Zellen auszulösen: Sharron et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten bei einer Sepsis über die Expression der Serinprotease Granzym B eine zytotoxische Funktion annehmen und Apoptose in Zellen von Milz und Lunge auslösen können³⁸. Gambim et al. inkubierten Endothelzellen und glatte Muskelzellen mit thrombozytären Partikeln septischer Patienten und erzielten dadurch ebenfalls eine Apoptoseinduktion in diesen Zellen³⁹. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme einer Thrombozyten-induzierten Apoptose in vivo. Es wäre daher aufschlussreich, zu untersuchen, ob es in vivo auch unter nicht-septischen Bedingungen zur Thrombozyten-induzierten Apoptose an bestimmten Zellen kommt.

Thrombozyten interagieren während ihrer etwa zehntägigen Lebenszeit mit einer Reihe anderer Zellen, wie z.B. Endothelzellen und Leukozyten. Thrombozyten-induzierte Apoptose wäre an diesen Zellen denkbar, da Endothelzellen und Leukozyten den Fas-Rezeptor exprimieren^{40, 41} und Ziel der

Fas-induzierten Apoptose sind^{42,41, 43}. Die Fas-L/Fas-Interaktion spielt in vielen Zellen eine Rolle, mit denen Thrombozyten kommunizieren. Es ist daher denkbar, dass die Thrombozyten-induzierte Apoptose über Fas-L ein zentraler Mechanismus ist, mit dem Thrombozyten Einfluss auf verschiedene Geschehen nehmen können. Dazu gehören beispielsweise die Hämostase, inflammatorische Prozesse oder die Entstehung und Progression von Atherosklerose.

Unterstützt wird diese Vermutung durch verschiedene Studien zur Fas-L induzierten Apoptose an Zellen, mit denen auch Thrombozyten interagieren. So haben Aoudjit et al. beschrieben, dass die Empfänglichkeit von Endothelzellen für die Fas-L induzierte Apoptose unter Anwesenheit bestimmter pathologischer Stimuli gesteigert werden kann⁴⁰. Sata et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit von oxidiertem LDL die Expression von Fas auf Endothelzellen erhöht und dadurch deren Sensitivität gegenüber der Fas-L induzierten Apoptose deutlich steigert⁴⁴. Choy et al. haben zudem beschrieben, dass oxidativer Stress die Fas-L induzierte Endothelzellapoptose fördert⁴¹. Stimuli dieser Art rufen in vivo eine Thrombozytenaktivierung hervor¹³, somit wäre es denkbar, dass Thrombozyten in dieser Konstellation eine Fas-L induzierte Apoptose in Endothelzellen auslösen. Diese Annahme könnte auch im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose relevant sein, da Endothelzellen bei diesem Prozess eine besondere Rolle spielen. Die Atherogenese beginnt mit einer endothelialen Dysfunktion⁴⁵ und geht im Verlauf mit massiver Endothelzellapoptose^{41, 43} einher. Thrombozyten-induzierte Apoptose an Endothelzellen könnte also auch mit dieser Entwicklung zusammenhängen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können auch auf die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten übertragen werden. Zwischen den beiden Zellarten besteht eine komplexe Beziehung, die sowohl bei der Thrombenbildung als auch bei inflammatorischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielt^{46, 47}. Thrombozyten sind zum Beispiel in der Lage, sich über eine Reihe verschiedener Rezeptoren an Monozyten und Neutrophile anzulagern und dadurch deren Aktivierung im Rahmen von Entzündungsreaktionen zu bewirken. Dies ist relevant bei Gefäßverletzungen, der Entstehung von atherosklerotischen Plaques oder bei der Immunantwort⁴⁶. Leukozyten sind Fas-positive Zellen⁴² und es wäre somit vorstellbar, dass Thrombozyten über Fas-L auch in Leukozyten Apoptose induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde von Apoptoseinduktion über die Fas-L/Fas-Interaktion ausgegangen. Daneben wären jedoch auch andere Mechanismen der Thrombozyten-induzierten Apoptose denkbar, die an dieser Stelle nicht untersucht wurden. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli eingeleitet werden, zum einen durch das Fehlen von Überlebenssignalen (intrinsischer Weg), und zum anderen durch Ligandenbindung an Todesrezeptoren der Zelle (extrinsischer Weg)². Die Fas-L/Fas-Interaktion ist eine Form der extrinsischen Apoptoseinduktion. Daneben können auch andere Moleküle der TNF-Superfamilie über den extrinsischen Weg Apoptose induzieren, zum Beispiel TNF α und TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), mit ihren zugehörigen Rezeptoren. Der intrinsische Weg wird bei Schädigung der Zelle eingeleitet und durch Regulatorproteine der Bcl-Familie kontrolliert. Diese koordinieren den Ablauf über eine Beeinflussung des Membranpotentials der Mitochondrien und Freisetzung proapoptotischer Faktoren³. In wie weit Thrombozyten Einfluss auf den intrinsischen oder extrinsischen Aktivierungsweg nehmen können, müsste weiter untersucht werden.

Um mögliche therapeutische Konsequenzen aus der Thrombozyten-induzierten Apoptose abzuleiten, wurden Untersuchungen mit Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ASS und NPlate den Vorgang signifikant verändern, wohingegen Angiox keinen Unterschied in der Apoptoseinduktion bewirkt. Die Vorbehandlung von humanen Thrombozyten mit ASS führt zu einer signifikant höheren Apoptoserate der Zellen und reduziert den Anteil an lebenden Zellen. Der Thrombin-inhibitor Angiox hingegen scheint keinen Einfluss auf die Thrombozyten-induzierte Apoptose zu haben. Der Thrombopoetin-Agonist NPlate steigert durch Wirkung auf Megakaryozyten die Thrombozytenproduktion. Es scheint jedoch auch eine direkte Wirkung auf Thrombozyten zu geben, da die Thrombozyten-induzierte Apoptose nach Behandlung der Plättchen mit NPlate signifikant zurückgeht. Es kann nur spekuliert werden, welcher Wirkmechanismus dieser Beobachtung zu Grunde liegt, daher sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Beobachtung, dass die Vorbehandlung von humanen Thrombozyten mit ASS zu einer signifikant höheren Apoptoserate der Zellen führt, wirft besonders im Kontext mit Atherosklerose Fragen auf. ASS bewirkt über die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase I eine Thrombozytenaggregationshemmung²⁷. In der antithrombozytären Therapie wird das Präparat seit Jahrzehnten eingesetzt, um die Atheroskleroseprogression bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu begrenzen²⁷. Die Annahme, dass ASS Thrombozyten dazu veranlasst, die Apoptoseinduktion in bestimmten Zellen, etwa Endothelzellen, zu erhöhen, könnte klinisch relevante Erkenntnisse hervorbringen und sollte daher weiter untersucht werden. Besonders im Hinblick auf die Entwicklung neuer Substanzen in der antithrombozytären Therapie könnte dieses Ergebnis bedeutsam sein.

Es ist eine spannende Frage, in wieweit die Erkenntnisse dieser Arbeit die Einschätzung der bisher bekannten Funktionen von Thrombozyten beeinflussen. Wie Thrombozyten auf andere Zellen einwirken, hängt letzten Endes von verschiedenen Faktoren wie den Umgebungsbedingungen, den agierenden Zelltypen und der Verteilung der Oberflächenrezeptoren ab⁴⁸. Ob es in vivo im Rahmen der oben genannten Prozesse eine Thrombozyten-induzierte Apoptose an anderen Zellen gibt und wie dies therapeutisch genutzt werden kann, müsste weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozyten-induzierte Apoptose, ausgelöst durch Koinkubation von verschiedenen Fas-positiven Zellen mit Thrombozyten, mittels Caspase-Assays, Annexin-PI- und TUNEL-Stainings untersucht.

Erkenntnisse dieser Arbeit sind, dass Thrombozyten die Fähigkeit besitzen, in bestimmten Fas-positiven Zellen Apoptose auszulösen. Zudem beeinflussen ASS und NPlate Thrombozyten in Bezug auf ihre Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, deutlich. Besonders relevant erscheint dabei, dass die Vorbehandlung der Thrombozyten mit ASS zu einer signifikant höheren Apoptoserate der Zellen führt.

Thrombozyten sind multifunktional und neben ihrer wichtigsten Aufgabe, der Hämostase, an vielen anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt⁹. So spielen sie unter anderem auch eine Rolle bei der Gewebereparatur¹¹, der Immunabwehr¹² und der Entstehung von Inflammation und Atherosklerose. Der genaue Mechanismus ist Gegenstand der aktuellen Forschung^{8, 13}. Ob und wie Thrombozyten auf andere Zellen einwirken, hängt letztendlich von den Umgebungsbedingungen, dem Zelltyp und dessen Oberflächenrezeptoren ab⁴⁸.

Thrombotische Prozesse und Entzündungsreaktionen besitzen teilweise gleiche molekulare Schlüsselmechanismen⁴⁹, die Thrombozyten-induzierte Apoptose könnte einer davon sein. Es ist daher denkbar, dass die Befunde dieser Arbeit eine entscheidende Rolle im Funktionsbereich der Thrombozyten spielen. Um diese Beobachtungen besser einordnen zu können, sind weiterführende Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und möglichen Zielzellen nötig. Besonders im Hinblick auf neue therapeutische Möglichkeiten ist ein besseres Verständnis dieser Mechanismen unabdingbar.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACD	acid citrate dextrose
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fas-L	Fas-Ligand
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ICAM1	intracellular adhesion molecule
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate based saline
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI	Phosphatidylinositol
STS	Staurosporin
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
VCAM1	vascular adhesion molecule
vWF	von Willebrand Faktor

7. Literaturverzeichnis

1. Kerr JFRW, A. H. ; Currie, A. R. . Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetik. 1972
2. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35:495-516
3. Hotchkiss RSS, A.; McDunn, J.E.; Swanson, P.E. Cell death. 2009
4. Lu Y, Chen GQ. Effector caspases and leukemia. *International journal of cell biology*. 2011;2011:738301
5. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37:719-727
6. Waring PM, A. Cell death induced by the fas/fas ligand pathway and its role in pathology. 1999
7. Ahmad R, Menezes J, Knafo L, Ahmad A. Activated human platelets express fas-l and induce apoptosis in fas-positive tumor cells. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69:123-128
8. Kaplan ZSJ, S.P. The role of platelets in atherosclerosis. *Hematology*. 2011
9. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood reviews*. 2005;19:111-123
10. Gawaz MP. *Blood platelets: Physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases*. Thieme Verlag, Stuttgart; 2001.
11. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S13-33
12. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997;25:951-968; quiz 969-970
13. Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*. 2007;357:2482-2494
14. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: Role of integrins and their ligands. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2003;28:257-264

15. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*. 2002;8:1227-1234
16. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:3378-3384
17. Chakrabarti S, Blair P, Freedman JE. Cd40-40l signaling in vascular inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:18307-18317
18. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364:1746-1760
19. WHO. The classification of atherosclerotic lesions. *Report of a study group. WHO Technical Report Series No. 143*. 1958
20. Curtiss LK. Reversing atherosclerosis? *The New England journal of medicine*. 2009;360:1144-1146
21. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*. 1999;138:S419-420
22. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516
23. Gawaz MP. *Blood platelets: Physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases*. 2001.
24. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196:887-896
25. Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: Diagnosis and management, part i. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 2009;84:917-938
26. Angiolillo DJ, Guzman LA, Bass TA. Current antiplatelet therapies: Benefits and limitations. *American heart journal*. 2008;156:S3-9
27. Dai Y, Ge J. Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease. *Thrombosis*. 2012;2012:245037
28. Gawaz MG, T. Update orale plättchenhemmer positionspapier der deutschen gesellschaft für kardiologie. *Der Kardiologe*. 2012;6:195–209
29. Braun D, Schulz C, Sibbing D, Massberg S. [periinterventional antiplatelet therapy: From bench to bedside]. *Herz*. 2012;37:128-135
30. Dinicolantonio JJ, D'Ascenzo F, Tomek A, Chatterjee S, Niazi AK, Biondi-Zoccai G. Clopidogrel is safer than ticagrelor in regard to bleeds: A closer look at the plato trial. *International journal of cardiology*. 2013

31. Yeung J, Holinstat M. Newer agents in antiplatelet therapy: A review. *Journal of blood medicine*. 2012;3:33-42
32. Lyseng-Williamson KA. Bivalirudin: A pharmacoeconomic profile of its use in patients with acute coronary syndromes. *PharmacoEconomics*. 2011;29:343-359
33. Keating GM. Romiplostim: A review of its use in immune thrombocytopenia. *Drugs*. 2012;72:415-435
34. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/fllice in the initiation of the fas-induced apoptotic cascade. *Current biology : CB*. 1998;8:1001-1008
35. Tepper AD, Ruurs P, Borst J, van Blitterswijk WJ. Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on cd95-induced ceramide production and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280:634-639
36. Furley AJ, Reeves BR, Mizutani S, Altass LJ, Watt SM, Jacob MC, van den Elsen P, Terhorst C, Greaves MF. Divergent molecular phenotypes of kg1 and kg1a myeloid cell lines. *Blood*. 1986;68:1101-1107
37. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. HI-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:2979-2984
38. Sharron M, Hoptay CE, Wiles AA, Garvin LM, Geha M, Benton AS, Nagaraju K, Freishtat RJ. Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by gpiib/iiiia blockade. *PloS one*. 2012;7:e41549
39. Gambim MH, do Carmo Ade O, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: Experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical care*. 2007;11:R107
40. Aoudjit F, Vuori K. Matrix attachment regulates fas-induced apoptosis in endothelial cells: A role for c-flip and implications for anoikis. *The Journal of cell biology*. 2001;152:633-643
41. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33:1673-1690
42. Mincheff M, Loukinov D, Zoubak S, Hammett M, Meryman H. Fas and fas ligand expression on human peripheral blood leukocytes. *Vox sanguinis*. 1998;74:113-121

43. Filippatos G, Ang E, Gidea C, Dincer E, Wang R, Uhal BD. Fas induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells in vitro. *BMC cell biology*. 2004;5:6
44. Sata M, Walsh K. Oxidized ldl activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102:1682-1689
45. Gutierrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elizaga J, Lerman A, Fernandez-Aviles F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *European heart journal*. 2013
46. Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:2357-2361
47. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis research*. 2012;129:263-266
48. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: Control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013
49. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:2131-2137

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die Möglichkeit, in der kardiologischen Abteilung der Universität Tübingen promovieren zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Harald Langer möchte ich mich herzlich für die Überlassung des spannenden Themas und die hervorragende Betreuung als Doktorvater bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Rebecca Schleicher, die mir während meiner gesamten Promotionsphase kompetent mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie hat mich anfangs sorgfältig in alle notwendigen Methoden eingearbeitet und hatte stets ein offenes Ohr für inhaltliche und methodische Fragen. Auch für das mühevollen Korrekturlesen möchte ich mich bedanken. Ohne ihre Anregungen und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe Langer für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele gute Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Zuletzt möchte ich von Herzen meinen Eltern danken, deren uneingeschränkte Unterstützung mir sowohl fachlich, als auch moralisch, sehr geholfen hat.
