

# **Thrombozyten induzieren Apoptose mittels membrangebundenem FasL**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Rebecca Schleicher

aus Villingen-Schwenningen

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

26.04.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Jun.-Prof. Dr. med. Harald Langer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	6
1.2	Thrombozyten-abhängige kardiovaskuläre und andere Erkrankungen.....	6
1.3	Thrombozyten .....	7
1.3.1	Definition .....	7
1.3.2	Thrombozytengranula .....	8
1.3.3	Thrombozytenfunktion.....	9
1.3.4	Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten.....	9
1.3.5	Thrombozyten und Gewebsverletzung.....	11
1.4	Apoptose.....	12
1.4.1	Definition Apoptose und Vergleich zur Nekrose .....	12
1.4.2	Relevanz der Apoptose .....	15
1.4.3	Apoptosemechanismen.....	15
1.4.3.1	Der intrinsische Apoptosesignalweg.....	16
1.4.3.2	Der extrinsische Apoptosesignalweg.....	18
1.4.4	FasL .....	19
1.5	Zielsetzung.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1	Mäuse .....	22
2.2	Zellkultur .....	23
2.2.1	Zelllinien .....	23
2.2.1.1	SH-SY5Y .....	23
2.2.1.2	HeLa.....	23
2.2.2	Kultivierung.....	23
2.2.3	Passagieren .....	24
2.2.4	Einfrieren .....	24
2.2.5	Auftauen.....	24
2.2.6	Aussäen .....	24
2.3	Arbeiten mit Thrombozyten .....	26

2.3.1	Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut .....	26
2.3.2	Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut .....	26
2.3.3	Aktivierung von Thrombozyten .....	28
2.3.4	Thrombozytenmembranproteine .....	29
2.4	Apoptoseinduktion <i>in vitro</i> .....	29
2.5	Isolation von primären murinen Neuronen .....	30
2.6	Isolation von Makrophagen .....	32
2.7	FACS-Analyse .....	32
2.8	Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.8.1	Lyse der Zellen und Thrombozyten .....	34
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
2.8.3	SDS-PAGE .....	35
2.8.4	Western Blot .....	38
2.8.5	Immundetektion .....	39
2.8.6	Strippen der Transfermembran .....	41
2.9	Apoptosedetektion .....	41
2.9.1	Caspase-3/7-Aktivitätsmessung .....	41
2.9.2	TUNEL-Färbung .....	42
2.10	Transwell-Experimente .....	43
2.11	Messung der LDH-Freisetzung .....	44
2.12	<i>In vivo</i> -Apoptosemodelle .....	44
2.12.1	Retinales NMDA-Verletzungsmodell .....	44
2.12.2	Schlaganfallmodell .....	45
2.13	Immunfluoreszenzfärbung .....	46
2.13.1	Konfokale Mikroskopie mit humanen Thrombozyten .....	46
2.13.2	Immunfluoreszenzfärbung im Gewebe .....	48
2.14	Datenpräsentation und Statistik .....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1	Thrombozytendepletion reduziert Gewebeapoptose <i>in vivo</i> .....	50
3.2	Thrombozyten induzieren Apoptose in humanen und murinen neuronalen Zellen .....	58

---

3.3	Aktivierte Thrombozyten exprimieren membrangebundenen FasL.....	68
3.4	Thrombozyten-induzierte Apoptose wird über membrangebundenen FasL vermittelt .....	72
3.5	Thrombozytärer FasL induziert Apoptose <i>in vivo</i> .....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>83</b>
4.1	Thrombozyten und Apoptose .....	83
4.2	Thrombozyten-induzierte Apoptose .....	84
4.3	Apoptoseinduktion in Zellen .....	85
4.4	Thrombozytärer FasL und dessen Regulierung .....	86
4.5	Thrombozytenaktivierung .....	88
4.6	Thrombozyten-beeinflusste Apoptosesignalwege .....	88
4.7	Apoptoseinduktion <i>in vivo</i> .....	89
4.8	Fazit und Therapieansätze.....	90
4.8.1	Thrombozyten-beeinflusste Mechanismen.....	91
4.8.2	Antithrombotische Therapie.....	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>111</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	111
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	113
8.3	Beteiligte und deren Anteil an gemeinschaftlichen Arbeiten .....	116
8.4	Publikationen und Kongressbeiträge.....	117
8.5	Danksagungen .....	120

# **1 Einleitung**

## **1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Laut Statistischem Bundesamt sind Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die häufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2013 verstarben in Deutschland 39,7 % der Menschen an Krankheiten des Herz-/Kreislaufsystems, jedoch nimmt dieser Anteil in den letzten Jahren kontinuierlich ab. Im Jahr 2008 lag die Todesursache durch Kreislauferkrankungen noch bei 42,2 % (Abschnitt: Statistisches Bundesamt).

Auch weltweit sind kardiovaskuläre Krankheiten nach wie vor die Todesursache Nummer 1. Jährlich sterben daran mehr Menschen als an irgendwelchen anderen Ursachen, insbesondere an ischämischen Herzkrankheiten, gefolgt von Schlaganfällen. Kardiovaskuläre Erkrankungen kosteten im Jahr 2012 ungefähr 17,5 Millionen Menschen das Leben, was 31 % der globalen Gesamttodesfälle entspricht. 3 von 10 Todesfällen sind demnach die Folge von kardiovaskulären Erkrankungen (Abschnitt: WHO).

## **1.2 Thrombozyten-abhängige kardiovaskuläre und andere Erkrankungen**

Bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose, ischämischer Herzerkrankung oder Schlaganfall spielen Thrombozyten eine wesentliche Rolle. Sie können mit Blut- und vaskulären Zellen kommunizieren und durch Freisetzung aktiver Chemokine, immunmodulierender Substanzen und Wachstumsfaktoren inflammatorische Prozesse steuern. Dadurch tragen Thrombozyten entscheidend zur Pathogenese und Fortschreitung von Erkrankungen wie beispielsweise der Atherosklerose und Myokardinfarkt bei (Abschnitt beschrieben in (Langer and Gawaz, 2008a; Siddiqui et al., 2013)). Da Myokardinfarkt und Schlaganfall die häufigste Todesursache in entwickelten Ländern darstellt (Ruggeri, 2002), sind

Thrombozyten-abhängige kardiovaskuläre Krankheiten medizinisch als auch sozioökonomisch von enormer Relevanz (OECD, 2007).

Thrombozyten sind aber auch durch Modulierung inflammatorischer Prozesse entscheidend bei der Initiation und Progression inflammatorischer Erkrankungen beteiligt (Gawaz et al., 2005; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Nachman and Rafii, 2008; Ruggeri, 2002; Ruggeri and Mendolicchio, 2007; Stellos et al., 2010; Varga-Szabo et al., 2008). Sie beeinflussen die Pathophysiologie inflammatorischer Krankheiten, wie zum Beispiel die rheumatoide Arthritis (Boilard et al., 2010) und spielen auch bei der multiplen Sklerose eine pathogenetische Rolle (Langer et al., 2012).

Die Aufklärung Thrombozyten-abhängiger pathophysiologischer Mechanismen und Identifizierung ihrer Targets kann innovative Therapiemöglichkeiten für Thrombozyten-assoziierte Erkrankungen aufdecken (siehe auch (Schleicher et al., 2015)).

## **1.3 Thrombozyten**

### **1.3.1 Definition**

Thrombozyten werden auch Blutplättchen genannt und stellen die kleinsten Zellen des Blutes dar. Sie besitzen einen Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  (Frojmovic and Milton, 1982) und sind kernfrei. Sie werden durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark (Thrombopoese) gebildet und nach einer Lebenszeit von durchschnittlich 10 Tagen in der Milz und Leber durch Makrophagen wieder abgebaut (von Bruchhausen, 1997; (George, 2000). Unter normalen Bedingungen zirkulieren  $150-300 \times 10^8/\text{l}$  nicht-adhärenente Thrombozyten im Blutssystem (Gachet, 2006).

Thrombozyten enthalten teilweise mRNA und sind somit in begrenztem Umfang zur Proteinbiosynthese befähigt. Diese kann durch Thrombozytenaktivierung angeregt werden (Lindemann et al., 2001).

### 1.3.2 Thrombozytengranula

Thrombozyten sind reichlich mit sekretorischen Granula versehen. Sie sind für die normale Thrombozytenfunktion essenziell. Es gibt drei Typen sekretorischer Granula:  $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen (Blair and Flaumenhaft, 2009). Die dichten Granula sekretieren ADP und Kalzium und verstärken dadurch Aggregation und Gerinnung der Thrombozyten (George, 2000).

Jeder Thrombozyt besitzt 50-80  $\alpha$ -Granula. Damit machen sie den größten Anteil der Thrombozytengranula aus. Sie umfassen ungefähr 10 % des Thrombozytenvolumens und ihre Größe schwankt zwischen 200-500 nm. Die Entwicklung des  $\alpha$ -Granulums beginnt im Megakaryozyt und endet im zirkulierenden Thrombozyt.  $\alpha$ -Granula Proteine werden zunächst im endoplasmatischem Retikulum synthetisiert. Anschließend gelangen sie zur Reifung in den Golgi-Apparat. Schließlich werden die Proteine im trans-Golgi Netzwerk sortiert und in die intrazellulären Speicher der  $\alpha$ -Granula deponiert. Durch Thrombozytenaktivierung werden diese bioaktiven Proteine freigelassen und können so ihre physiologische Funktion erzielen. Dabei fusionieren  $\alpha$ -Granula mit Membranen des offenen kanalikulären Systems oder der Plasmamembran und setzen ihr Depot frei. Dadurch vergrößert sich die Thrombozytenoberfläche. Der Inhalt der  $\alpha$ -Granula enthält sowohl membrangebundene Proteine, die auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, als auch lösliche Proteine, welche in den extrazellulären Raum freigegeben werden. Die meisten Proteine sind auch auf der ruhenden Plasmamembran vorhanden, wie beispielsweise Integrine, Immunglobulin- und andere Rezeptoren. Andere Proteine, wie z. B. P-Selektin sind jedoch nicht auf der Plasmamembran ruhender Thrombozyten präsent (Abschnitt beschrieben in (Blair and Flaumenhaft, 2009)). Erst nach Aktivierung der Thrombozyten wird P-Selektin durch Translokation der Speichergranulamembranen rasch auf der Membranoberfläche exprimiert (Gawaz et al., 2005).

### **1.3.3 Thrombozytenfunktion**

Die am längsten bekannte Rolle von Thrombozyten ist ihre zentrale Funktion als Steuerzellen der Hämostase und Wundheilung. Nach einer Verletzung der Gefäßwand sind sie blitzschnell zur Stelle und dichten das freigelegte Subendothel ab. Thrombozyten sind außerdem bei wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von großer Bedeutung. Sie sind auf vielfältige Weise an der initialen Entstehung und dem Wachstum arteriosklerotischer Läsionen, am Fortschreiten einer Arteriosklerose sowie an thromboembolischen Komplikationen beteiligt. Die Entstehung arterieller Thrombosen kann letztendlich einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall auslösen.

Zusätzlich sind Thrombozyten bei Entzündungen und in der Immunabwehr entscheidend. Sie können als spezialisierte Zellen Pathogene detektieren und die unspezifische und spezifische Immunabwehr beeinflussen. Weiterhin spielen sie eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der Gewebeintaktheit und sie sind aktive Modulatoren der Angiogenese. Darüber hinaus fördern Thrombozyten die Revaskularisierung von ischämischem Gewebe. Jedoch schützen sie dadurch auch die Metastasierung und das Wachstum von Tumoren. Beide Abschnitte beschrieben in (Jurk and Kehrel, 2008, 2010).

### **1.3.4 Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten**

Die meisten Thrombozyten durchlaufen während ihrer Lebenszeit keine feste Adhäsion. Wird jedoch die Endothelwand von Blutgefäßen durch Verletzung oder pathologische Veränderung, wie bei einer Atherosklerose, geschädigt, werden sie aktiviert und adhären (Varga-Szabo et al., 2008). Zunächst interagieren Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix, welche thrombogenetische Proteine enthält und die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation ermöglicht (Gachet, 2006). Dabei verändern sie ihre Form, werden kompakt und bilden lange verzweigte Ausläufer, welche die Adhäsion erleichtern. Die Formveränderung und Bildung eines Blutgerinnsels wird mithilfe von Aktin und Myosin, das in reichlicher Menge im Zytoplasma vorkommt,

ermöglicht (George, 2000). Dieser Prozess ist für die normale Hämostase entscheidend, jedoch ist es auch möglich, dass er zur Bildung eines pathologischen Thrombus führt, der ischämische Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall verursachen kann (Varga-Szabo et al., 2008).

Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation näher beschrieben.

Der erste Schritt der blutstillenden Kaskade ist die Interaktion der Thrombozyten mit der subendothelialen Extrazellulärmatrix (ECM). Diese enthält eine große Anzahl adhäsiver Makromoleküle, wie Laminin, Fibronectin, Kollagen und von-Willebrand-Faktor (vWF). Der Mechanismus der Thrombozytenadhäsion wird zum größten Teil durch die aktuellen rheologischen Bedingungen bestimmt. Die Geschwindigkeit des Blutflusses ist im Gefäßzentrum höher als an der Gefäßwand, wobei Scherkräfte entstehen, die an der Gefäßwand maximal werden (Abschnitt beschrieben in (Varga-Szabo et al., 2008)). Die initiale Anheftung von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand wird über Membranrezeptoren, welche unabhängig von der Aktivierung funktionieren, vermittelt. Innerhalb von Sekunden haften sich aktivierte Thrombozyten an die Wunde und bedecken diese vollständig (Ruggeri, 2002). Der erste Schritt erfolgt durch die Interaktion des thrombozytären Glykoproteins GPIIb $\alpha$ , eine Leucin-reiche Untereinheit des GPIIb-V-IX Komplexes, mit vWF (Gachet, 2006). VWF ist ein großes multimeres Glycoprotein und ist an die subendothelialen Kollagenfasern gebunden (Gachet, 2006). Diese erste Interaktion ist reversibel und ermöglicht den zirkulierenden Thrombozyten sich zu verlangsamen und die verletzte Gefäßwand zu erreichen (Gachet, 2006). Die feste Adhäsion von Thrombozyten wird durch die direkte Bindung von Kollagen an Integrin- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und GPVI zusammen mit der Bindung von vWF an Integrin- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ermöglicht (Ruggeri, 2002). Die Interaktion von Kollagen mit GPVI und Thrombin ist am stärksten. Gleichzeitig triggern verschiedene Agonisten die Aktivierung von Thrombozyten. Sie werden nach Exposition mit Gewebefaktoren der verletzten Gefäßwand gebildet und aktivieren Thrombozyten durch Protease-aktivierende Rezeptoren (PARs). PARs können verschiedene Signalprozesse induzieren und durch synergistische Wirkung eine vollständige Thrombozytenaktivierung ermöglichen. Die

Thrombozytenaktivierung wird zudem durch die Synthese von Thromboxan A2 (TxA2) sowie der Freigabe großer Menge an ADP und ATP in hohem Maße verstärkt. Die Aggregation von Thrombozyten wird durch die Aktivierung von Integrin- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ermöglicht. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung von Integrin- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf der Thrombozytenoberfläche, sodass lösliche adhäsive Proteine, wie Fibrinogen und vWF daran binden können (Gachet, 2006; Ruggeri, 2002). Letztendlich triggert lokal gebildetes Thrombin die Bildung eines Fibringerinnsels, was den Thrombus stabilisiert (Abschnitt beschrieben in (Gachet, 2006; Ruggeri, 2002; Varga-Szabo et al., 2008)).

### **1.3.5 Thrombozyten und Gewebsverletzung**

Bei einer Gewebsverletzung und einem Endothelschaden sind die Rekrutierung und Akkumulation von Thrombozyten erste Schlüsselschritte, die eine komplexe Antwort zur Wiederherstellung der Gewebeintegrität triggern (Nachman and Rafii, 2008; Ruggeri and Mendolicchio, 2007; Varga-Szabo et al., 2008). Durch Anlagerung von Thrombozyten an die Endothelwand werden diese aktiviert, breiten sich über der Wunde aus, rekrutieren andere Thrombozyten und bilden zur Abdichtung der Wunde einen Thrombus (Andrews et al., 1997; Gawaz et al., 2005).

In letzter Zeit wurden verschiedene Effekte wie Geweberemodellierung, Regulierung der Regeneration, Entzündung und Gewebehomöostase auf Thrombozyten zurückgeführt (Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010). Eine Dysregulation von Thrombozyten trägt wesentlich zur Initiation und Progression von Krankheiten bei (Gawaz et al., 2005; Jackson, 2011; Nieswandt et al., 2011). Dementsprechend wurde die pathogenetische Rolle von Thrombozyten bei Krankheiten mit hoher sozioökonomischer Bedeutung wie Atherosklerosen und ischämischen Schlaganfällen bewiesen (Langer and Gawaz, 2008a; Siddiqui et al., 2013). Jedoch auch bei unerwarteten Krankheiten wie multiplen Sklerosen (Langer et al., 2012) oder Gelenkrheumatismen (Boilard et al., 2010; Langer et al., 2012). Im Letzteren verstärken Thrombozyten durch kollagen-abhängige Produktion von Mikropartikeln Inflammation (Boilard et al., 2010; Langer et al., 2012). Dagegen führt bei multipler Sklerose die Aktivierung von Thrombozyten zur Schädigung von neuronalem

Gewebe durch Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen (Langer et al., 2012). Neben diesen Mechanismen könnten Thrombozyten die Gewebemöostase möglicherweise durch verschiedene bisher unbeachtete Funktionen regulieren. In Anbetracht des räumlich-zeitlichen Zusammenhanges zwischen Thrombozytenaktivierung und der Initiation von Apoptose in verletzten Geweben könnten Thrombozyten infolge einer zerstörten Gewebeintegrität Apoptose induzieren (Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015)).

## **1.4 Apoptose**

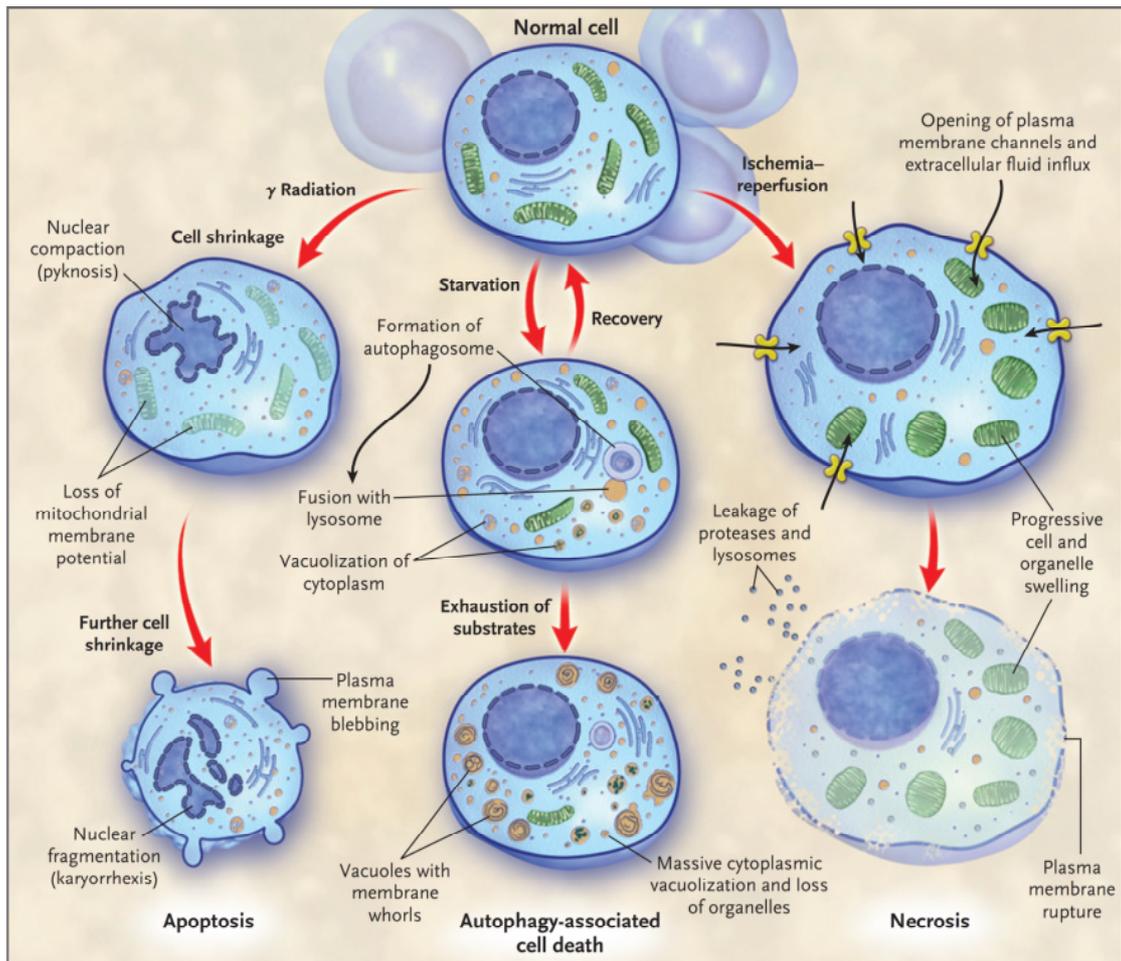
### **1.4.1 Definition Apoptose und Vergleich zur Nekrose**

Apoptose leitet sich von einem altgriechischen Wort ab und bedeutet "Abfallen von Blättern von einem Baum". Kerr et al. beschrieben erstmals 1972 die Apoptose als ein aktiver, natürlich ablaufender programmierter Prozess zur kontrollierten Deletion von Zellen. Sie kann durch äußere physiologische oder pathophysiologische Stimuli initiiert oder inhibiert werden (Kerr et al., 1972).

Abbildung 1 zeigt drei Mechanismen des Zelltods - die Apoptose, die Autophagozytose und die Nekrose. Eine bestimmte Form des Zelltods kann je nach Verletzung und Zelltyp vorherrschen (Hotchkiss et al., 2009). Im Folgenden werden die Merkmale und Mechanismen der Apoptose im Vergleich zur Nekrose dargestellt (siehe Abbildung 1). Im Gegensatz zur Nekrose läuft der apoptotische Zelltod in individuellen Zellen, welche von gesunden Zellen umgeben sind, ab (Earnshaw, 1995; Kam and Ferch, 2000). Das Hauptmerkmal der Apoptose ist die Schrumpfung der Zelle und ihr Nukleus (Kerr et al., 1972), wobei die Integrität der Plasmamembran lange erhalten bleibt (Hotchkiss et al., 2009). Die Zelle wird systematisch, ATP abhängig aufgebrochen (Earnshaw, 1995; Kam and Ferch, 2000) und Zytoskelettproteine werden durch Aspartat-spezifische Proteasen gespalten, wobei subzelluläre Bestandteile kollabieren (Hotchkiss et al., 2009). Es kommt zum Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials (Hotchkiss et al., 2009). Weitere Kennzeichen sind die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung von Zellkompartimenten und Bildung kleiner zellulärer Körper, die von Nachbarzellen oder

Makrophagen phagozytiert werden (Kerr et al., 1972; Raff, 1992). Durch Eliminierung geschädigter Zellen und deren Inhalt verhindert die Apoptose, im Gegensatz zu anderen Formen des Zelltods, grundsätzlich Gewebeinflammation mit potenziellen langfristigen Schäden (Hotchkiss et al., 2009; Walker et al., 1988).

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zu einem frühen Verlust der Plasmamembranintegrität, was den Einstrom von extrazellulären Ionen und Flüssigkeit ermöglicht. Dies führt zur Anschwellung der Zellen und ihren Organellen. Außerdem strömen Proteasen und Lysosomen aus der Zelle. Nekrose wird gewöhnlicherweise durch metabolische Fehler und daraus resultierendem raschen ATP-Abbau, der klassischerweise bei einer Ischämie auftritt, ausgelöst. Sie ist eine unbeabsichtigte, nicht programmierte Form des Zelltods und die Folge einer akuten hypoxischen oder ischämischen Schädigung, die durch einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall ausgelöst werden kann. Die Exposition von Zellen mit supraphysiologischen Bedingungen (z. B. mechanische Kräfte, Hitze, Kälte und membranpermeabilisierenden Toxinen) löst ebenso Nekrose aus (Abschnitt beschrieben in (Hotchkiss et al., 2009)). Der nekrotische Zelltod ist ein pathologischer Prozess, welcher durch Inflammation und ausgedehntem Schaden charakterisiert ist (Kam and Ferch, 2000).



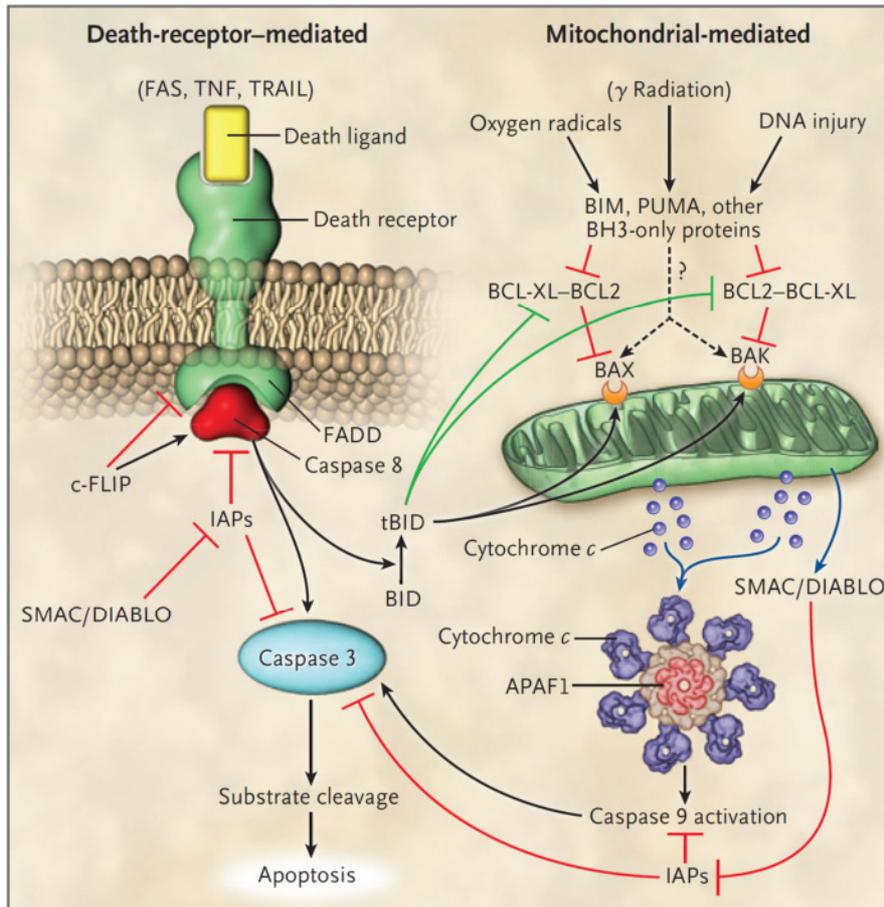
**Abbildung 1: Mechanismen des Zelltods: Apoptose, Nekrose und Autophagozytose.** Reproduced with permission from (Hotchkiss et al., 2009). Copyright Massachusetts Medical Society.

### **1.4.2 Relevanz der Apoptose**

Die Apoptose hat lebenswichtige Funktionen. Sie ist ein natürlicher Prozess zur Regulation der Zellzahl im Gewebe und eine physiologische, programmierte Form des Zelltods während der Embryonalentwicklung (Kerr et al., 1972). In mehrzelligen Organismen werden beschädigte oder überflüssige Zellen durch programmierten Zelltod entfernt (Fuchs and Steller, 2011; Green et al., 2011). Außerdem reguliert Apoptose die Immunantwort und durch ihre Eliminierung defekter Zellen bleibt die Gewebemöostase im Gleichgewicht (Fuchs and Steller, 2011; Hotchkiss et al., 2009; Mc Guire et al., 2011). Dadurch wird im Allgemeinen Gewebeinflammation mit potenziellen langfristigen Schäden verhindert (Hotchkiss et al., 2009; Walker et al., 1988). Die Balance zwischen Leben und Tod einer Zelle steht unter strenger genetischer Kontrolle. Der Mechanismus ist in den Chromosomen codiert und wird durch ein komplexes molekulares Signalsystem reguliert. Eine Dysregulation und mangelnde Apoptose führt zu verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, Autoimmunreaktionen und begünstigt Virusinfektionen. Andererseits ist eine exzessive Apoptose mit ischämischen Herzkrankheiten, Schlaganfällen, neurodegenerativen Krankheiten, Blutvergiftungen und Organstörungen assoziiert (Abschnitt beschrieben in (Kam and Ferch, 2000)).

### **1.4.3 Apoptosemechanismen**

In Säugetieren gibt es zwei Hauptsignalwege der Apoptose. Der Todesrezeptor-abhängige (extrinsische) Signalweg, welcher durch Aktivierung der Todesrezeptoren vermittelt wird, und der mitochondriale (intrinsische) Signalweg, ausgelöst durch schädliche Stimuli, die letztlich zu einer mitochondrialen Verletzung führen. In Abbildung 2 sind die zellulären Mechanismen der Apoptose dargestellt (Eskes et al., 1998; Hotchkiss et al., 2009; Youle and Strasser, 2008).



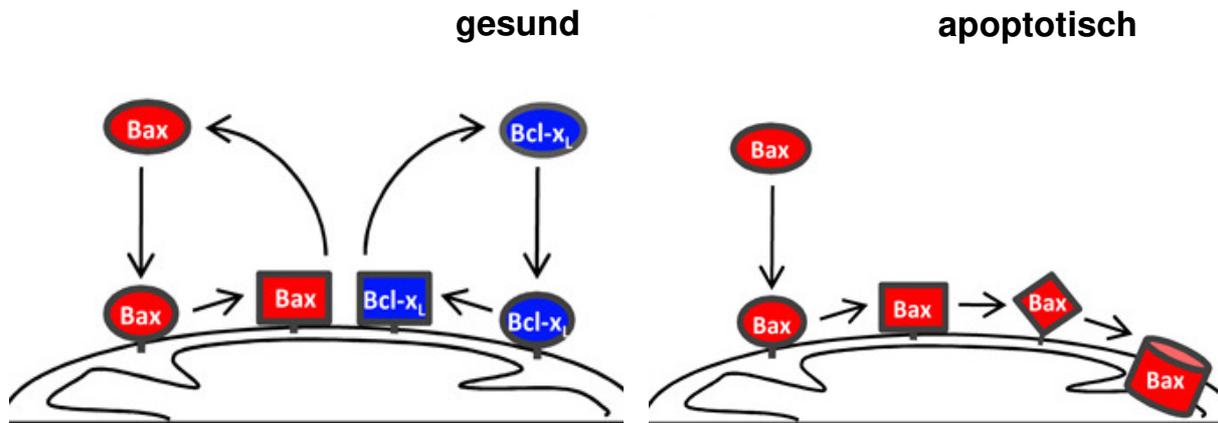
**Abbildung 2: Zelluläre Signalwege der Apoptose.** Reproduced with permission from (Hotchkiss et al., 2009). Copyright Massachusetts Medical Society.

### 1.4.3.1 Der intrinsische Apoptosesignalweg

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird auch Bcl-2-regulierter oder mitochondrialer Signalweg genannt. Er wird durch Zellstress wie DNA-Schäden, freie Sauerstoffradikale, Virusinfektionen oder Mangel an Wachstumsfaktoren ausgelöst und strikt durch Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert (Hotchkiss et al., 2009; Youle and Strasser, 2008). Mitglieder der Bcl-2-Familie werden in die pro-survival Bcl-2-Proteine (z. B. Bcl-2, Bcl-xl) und proapoptotischen Bax-artigen Proteine (z. B. Bax, Bak) gruppiert. Die Funktion der Bcl-2-Familie-Mitglieder wird über verschiedene Gruppen der BH3-only-Proteine (z. B. Bad, Bid, Bim, Puma) reguliert. Diese können Apoptosen

fördern indem sie mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 oder Bcl-xl interagieren und sie inhibieren. Dadurch wird Bak und Bax, was sich normalerweise in gesunden Zellen im Zytosol befindet, frei und an die äußere Mitochondrienmembran (OMM) transloziert. Folglich permeabilisiert die OMM und es werden apoptotische Moleküle wie Cytochrom c aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma freigegeben, was schließlich durch das Apoptosom Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) zur Aktivierung von Caspasen (Caspase-9 und -3) führt. Smac/Diablo wird nach der mitochondrialen Permeabilisation ebenfalls freigelassen und blockiert Inhibitoren der apoptotischen Proteine (IAPs), die Caspase-Aktivierung inhibieren. Somit werden Caspasen aktiv und folglich das Fortschreiten von Apoptose ermöglicht. Aktivierte Caspase-8 (Todesrezeptor Signalweg) und Caspase-9 (mitochondrialer Signalweg) mobilisiert wiederum Caspase-3, -6 und -7. Dies sind Proteasen, welche durch Spaltung zahlreicher Proteine und Aktivierung von DNasen die Vernichtung der Zelle ankündigen (Abschnitt beschrieben in (Annis et al., 2005; Eskes et al., 1998; Hotchkiss et al., 2009; Youle and Strasser, 2008)).

Die Aktivität von Bax und Bak wird durch BH3-only-Proteine getriggert und durch Mitglieder der pro-survival Bcl-2-Regulatoren unterdrückt. Die Steuerung erfolgt über ein komplexes Netzwerk. Abbildung 3 zeigt die Regulierung und den Transport von Bax in gesunden und apoptotischen Zellen. Ist die Zelle gesund inhibiert Bcl-xl das Protein Bax, wobei es konstant von den Mitochondrien ins Zytosol retransloziert und so im Zytosol gehalten wird. Da in einer apoptotischen Zelle freies Bcl-xl fehlt, wird angenommen, dass Bax durch eine Konformationsänderung aktiv und in die Mitochondrienmembran eingebaut werden kann (Abschnitt beschrieben in (Edlich et al., 2011; Llambi et al., 2011)).



**Abbildung 3:** In gesunden Zellen (links) werden Bax und Bcl-xl konstant an die Mitochondrien und wieder zurück in das Zytosol transloziert.

Dadurch wird zytosolisches Bax stabilisiert. Die Retranslokation benötigt eine Konformationsänderung von Bax.

Bei apoptotischen Zellen (rechts) wird in der Abwesenheit von freiem Bcl-xl Bax durch eine weitere Konformationsänderung möglicherweise aktiv und in die Mitochondrienmembran eingebaut. (Edlich et al., 2011)

### 1.4.3.2 Der extrinsische Apoptosesignalweg

Die extrinsische Apoptose, auch der Todesrezeptor-Signalweg genannt, beruht auf der Aktivierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dazu gehört der Todesrezeptor Fas (CD95, APO-1). Fas ist ein Mitglied der TNF(tumor necrose factor)-Familie und besitzt eine intrazelluläre Todesdomäne, welche Trimere bildet (Aggarwal, 2003; Siegel et al., 2000). Während Fas im humanen Gewebe weitgehend exprimiert ist, kommt FasL (CD95L), der Ligand für Fas, in erster Linie in einem Teil aktivierter T-Zellen, NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) und NKT-Zellen (natürlichen Killer-T-Zellen) vor (Kaufmann et al., 2012). Es kommt ebenso konstitutiv an immun-privilegierten Stellen wie den Augen und Hoden vor (Abschnitt beschrieben in (Aggarwal, 2003; Kaufmann et al., 2012; Nagata, 1999)). Es gibt eine lösliche und membrangebundene Form von FasL, wobei

gezeigt wurde, dass nur Letzteres bei der Induktion von Apoptose involviert ist (O' Reilly et al., 2009).

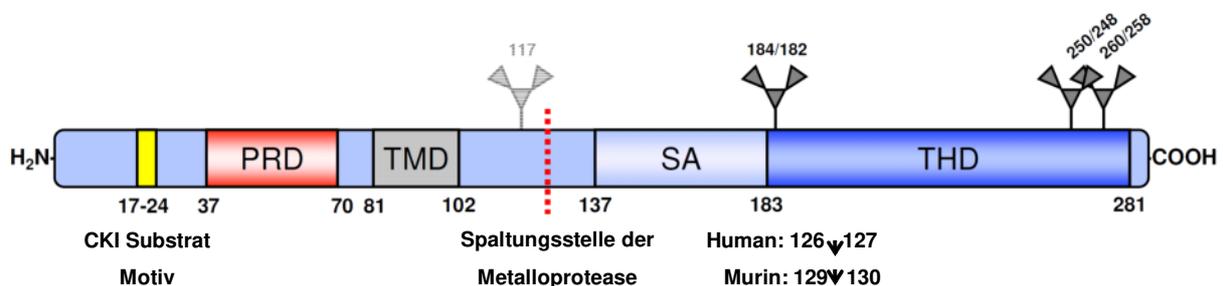
Das Binden von Todesliganden wie Fas, TNF oder TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) an den Todesrezeptor initiiert die Bildung eines Multi-Protein Todes-induzierenden Signalkomplexes. Die Aggregation des Komplexes bewirkt eine Konformationsänderung seiner Komponenten. Dadurch wird die intrazelluläre Adaptorproteindomäne FADD (Fas-associated death domain) aktiviert, was wiederum die Caspase-8 rekrutiert und seine katalytische Aktivität triggert. Dabei kann das zelluläre FLICE-Inhibitorprotein (c-FLIP), je nachdem in welcher Konzentration es vorliegt, die Bindung von FADD und Caspase-8 entweder inhibieren oder verstärken (Abschnitt beschrieben in (Hotchkiss et al., 2009)). Schließlich aktiviert die Caspase-8 das nachgeschaltete Schlüsselprotein Caspase-3, welche letztlich die Zellzerstörung einleitet (Hotchkiss et al., 2009; Youle and Strasser, 2008).

Zusätzlich schneidet die Caspase-8 das BH3-only-Protein Bid zu tBid, von dem angenommen wird, dass es Bax und Bak an der äußeren Mitochondrienmembran aktiviert und so den mitochondrialen Apoptosesignalweg initiiert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

#### **1.4.4 FasL**

Der Apoptose induzierende Fas-Ligand (FasL) ist ein Typ-II-Transmembranprotein und gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie (TNF-Familie) der Todes-induzierenden Cytokine (Suda et al., 1993). Er hat ungefähr 25-30 % Sequenzhomologie zu anderen Superfamilienmitgliedern wie TNF- $\alpha$  (Voss et al., 2008). Die TNF-Familie umfasst FasL, TNF, Lymphotoxin, TRAIL, CD40-, CD27-, CD30- und OX40-Ligand (Tanaka et al., 1998). In Abbildung 4 ist die Struktur von FasL schematisch dargestellt. Der FasL ist durch sein besonderes zytosolisches N-terminales Ende mit einem binären Casein Kinase I (CKI) Substrat, das Ähnlichkeit zu anderen Motiven der TNF-Familienmitglieder aufweist, gekennzeichnet. Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Proteinfamilie besitzt der intrazelluläre Teil von FasL eine ausgedehnte Prolin-reiche-Domäne (PRD). N-terminal befinden sich außerdem mehrere mutmaßliche Phosphorylierungsstellen, die

mit verschiedenen Aspekten der Signaltransduktion in Verbindung gebracht werden. C-terminal zur Transmembranregion (TM) befindet sich bei humanem FasL zwischen der Aminosäure 137 und 183 ein Stück, welches für die Selbstassemblierung (SA) essenziell ist. Dabei wird FasL zu einem homotrimärem Komplex oligomerisiert, wobei vermutet wird, dass es dadurch seine biologische Aktivität erlangt. Dann folgt die TNF-Homologie-Domäne (THD), welche die größte Ähnlichkeit zu anderen TNF-Ligand-Ektodomänen aufweist und spezifisch an cysteinreichen Domänen des Fas-Rezeptors bindet. Innerhalb der Ektodomäne hat der FasL drei mutmaßliche N-gekoppelte Glykolisierungsstellen (N185, N250, N260), wohingegen muriner FasL vier besitzt (N117, N182, N248, N258). Diese Glykolisierung wird möglicherweise zur Reifung und Stabilisierung des Moleküls und zur Sekretion von löslichen FasL benötigt (Abschnitt beschrieben in (Voss et al., 2008)). Um die lösliche Form zu bilden, wird FasL von einer mutmaßlichen Metalloproteinase gespalten (Tanaka et al., 1998). Die Spaltungsstelle befindet sich bei humanem FasL zwischen der Aminosäure 126 und 127 und in der Maus zwischen Aminosäure 129 und 130 (Voss et al., 2008). Jedoch kann nur die membrangebundene Form von FasL Apoptose induzieren (O' Reilly et al., 2009). Studien nehmen an, dass neu synthetisierter FasL in speziellen sekretorischen Lysosomen von T- und NK-Zellen gespeichert und nach ihrer Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert wird (Aggarwal, 2003; Kaufmann et al., 2012; Nagata, 1999).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Typ-II-Membranproteins FasL nach (Voss et al., 2008), modifiziert, original publisher BioMed Central Ltd.

## 1.5 Zielsetzung

Thrombozyten sind nach einer Gewebsverletzung die ersten zellulären Komponenten, die ein Trauma erreichen und Heilungsprozesse initiieren. Deshalb werden Thrombozyten therapeutisch in der regenerativen Medizin eingesetzt (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010; Varga-Szabo et al., 2008). Andererseits führt bei Krankheitsbildern, wie koronarer Herzkrankheit oder Schlaganfall, die Thrombozytenaktivität zu einer Gewebeschädigung und eine ausreichende Thrombozytenhemmung ist die wichtigste Therapiemaßnahme (Langer and Gawaz, 2008a; Siddiqui et al., 2013; Varga-Szabo et al., 2008). Diese Beispiele implizieren eine herausragende Rolle von Thrombozyten in der Gewebshomöostase (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010). Interessanterweise gibt es bisher nur unzureichende Untersuchungen zum Einfluss von Thrombozyten auf Apoptose, einen zentralen Prozess der Gewebshomöostase. Es ist bekannt, dass Apoptose durch gestörte Reparaturmechanismen ausgelöst wird (Hotchkiss et al., 2009) und pathologische Stimuli den Fas-Signalweg verstärken können (Aoudjit and Vuori, 2001). Trotzdem bleibt der Ausgangspunkt für Apoptose, die möglicherweise nach einer Gewebsverletzung entscheidend ist, weiterhin unklar.

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist es, potenzielle Thrombozyten-induzierte Apoptoseprozesse im Gewebe zu identifizieren und zugrunde liegende Mechanismen zu charakterisieren. Die Aufklärung dieser Fragestellungen können Grundlagen für neue therapeutische und diagnostische Ansätze liefern, welche die Geweberemodellierung nach Verletzung und Inflammation positiv beeinflussen. Siehe zu beiden Abschnitten auch (Schleicher et al., 2015).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mäuse

Im Folgenden werden die verwendeten Mäuse beschrieben (siehe auch (Schleicher et al., 2015)).

Die Wildtyp-C57BL/6-Mäuse stammen von Jackson Laboratory (Charles River, Sulzfeld) und wurden in unserer Tierforschungsanlage gezüchtet.

Die FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäuse, bei welchen der membrangebundene FasL fehlt, wurden wie bereits beschrieben generiert und uns freundlicherweise von Prof. Strasser zur Verfügung gestellt (O' Reilly et al., 2009). Es wurden jeweils Wurfgeschwister miteinander verglichen, wobei Wildtyp-C57BL/6-Mäuse als Kontrolle dienten. Die Glycoprotein (GP) Iba-defizienten Mäuse, welche eine Thrombozytopenie aufweisen (Ware et al., 2000), wurden uns von Dr. Jerry Ware (Universität Arkansas) zur Verfügung gestellt.

Alle Experimente mit Mäusen wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

FasL<sup>fl/fl</sup>-Mäuse (beschrieben in der Arbeit von (Mabrouk et al., 2008)) wurden mit PF4-Cre-Mäuse, welche von Jackson Laboratory (C57BL/6-Tg (PF4-Cre) Q3Rsko/J) stammen, gekreuzt. Bei PF4-Cre<sup>+</sup>-FasL<sup>fl/fl</sup>-Mäusen oder PF4-Cre<sup>-</sup>-FasL<sup>fl/fl</sup>-Wurfgeschwistern (Kontrollen) wurde das tMCAO-Schlaganfallmodell angewendet und anschließend Gewebeapoptose untersucht.

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Zelllinien**

#### **2.2.1.1 SH-SY5Y**

Die Zellkulturexperimente wurden mit der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y durchgeführt und von der Firma CLS (Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) bezogen. SH-SY5Y ist ein Neuroblastomklon der Linie SK-N-SH, welcher 1970 aus einem metastasierenden Knochentumor eines Mädchens isoliert wurde (Biedler et al., 1973). Die Zellen wachsen adhärent oder schweben teils frei im Medium und bilden Cluster mit kurzen, dünnen Zellausläufern. Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM mit Ham's 12 Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und 10 % FCS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

#### **2.2.1.2 HeLa**

Die Abkürzung HeLa steht für eine 1951 verstorbene Frau namens Henrietta Lacks. Aus ihrem aggressiven Adenokarzinom der Zervix stammen die HeLa-Zellen. Sie waren die ersten humanen Zellen, welche dauerhaft in Kultur gezüchtet wurden (Gey et al., 1952).

HeLa-Zellen wachsen adhärent und sind einfach zu kultivieren. Bei dem Nährmedium handelte es sich um DMEM mit 10 % FCS, 100 mg/ml Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin.

### **2.2.2 Kultivierung**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zur Ernte in 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen in einem Brutschrank mit 37 °C feuchter Atmosphäre und 5 % Kohlendioxid bzw. unter einer Sterilbank.

### **2.2.3 Passagieren**

Die Zellen wurden bei Konfluenz geerntet oder weiter passagiert. Das Ablösen der Zellrasen in den Zellkulturflaschen konnte nach einmaligem Waschen mit PBS mithilfe einer Glaspipette und durch 5 min Inkubation im Brutschrank mittels Trypsin bewerkstelligt werden. Die Zugabe von Medium inaktivierte das Trypsin, worauf die Zellen durch Abspülen zur Überführung in ein Falcon bereit waren. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zellzählkammer bestimmt.

### **2.2.4 Einfrieren**

Um die Zellen einzufrieren, wurden sie mithilfe von Trypsin abgelöst, in ein Falcon überführt und bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Es folgten ein Abwurf des Überstandes und eine Resuspension der Zellen in frischem Medium mit 10 % DMSO. Anschließend wurden je  $3 \times 10^6$  Zellen in Kryoröhrchen und diese in eine Kryo-Safe-Einfrierbox bei  $-80\text{ °C}$  überführt. Für eine längerfristige Aufbewahrung lagerten die Kryoröhrchen bei  $-150\text{ °C}$ .

### **2.2.5 Auftauen**

Zum Auftauen der Zellen mussten die Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut, sofort in frisches Medium überführt und bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert werden. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspension waren die Zellen wieder bereit in frischem Medium in einem neuen Zellkulturgefäß zu wachsen.

### **2.2.6 Aussäen**

Um eine gewünschte Zellzahl auszusäen, wurden die Zellen pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Anschließend erfolgten eine 1:10 Verdünnung der

Zellsuspension und eine Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zellzählkammer. Das Auszählen zweier 16er-Quadranten und die Multiplikation des Mittelwerts mit  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor ergab die Zellzahl pro ml. So konnte die gewünschte Zellkonzentration in die entsprechende Zellkulturplatte gegeben werden.

#### Medien und Zusätze:

Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit 4,5 g/l Glucose und 2 mM L-Glutamin
Ham's 12 Medium	ohne L-Glutamin; mit 1,176 g/l $\text{NaHCO}_3$ und 10 mg/l Phenolrot (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Fetales Kälberserum	FCS (Fetal Calf Serum, Life Technologies Darmstadt, Deutschland)
Antibiotika Penicillin/Streptomycin	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin	(Life Technologies Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin	Gibco (Life Technologies Darmstadt, Deutschland)
PBS	(Phosphate-Buffered Saline, PAA, Pasching, Österreich)
DMSO	(AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

## **2.3 Arbeiten mit Thrombozyten**

### **2.3.1 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut**

Die Gewinnung von murinen Thrombozyten erfolgte nach einem bereits beschriebenen Protokoll (Lonsdorf et al., 2012) in leicht veränderter Form. Den Mäusen konnte nach Narkotisierung mittels Isofluran mithilfe einer heparinisierten Kapillare retrobulbär Blut entnommen und direkt in ein mit 300 µl ACD-Puffer gefülltes Eppendorfgefäß überführt werden. Anschließend wurde es vorsichtig in ein FACS-Röhrchen pipettiert, mit 2 ml Tyrodes pH 6,5 langsam aufgefüllt und bei Raumtemperatur (RT) und 120 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Das so gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) wurde vorsichtig abgenommen, bis 4 ml mit Tyrodes pH 6,5 aufgefüllt sowie bei RT und 2600 g für 10 min mit Bremse abzentrifugiert. Die Zugabe von Apyrase (0,02 U/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Prostacyclin (0,5 µM, Calbiochem, Schwalbach, Deutschland) in den Puffer verhinderte die Aktivierung der Thrombozyten. Schließlich war es nach Abnahme des Überstandes möglich, das Thrombozytenpellet in Tyrodes pH 6,5 zu resuspendieren und mit gleicher Menge Tyrodes pH 7,4 zu neutralisieren. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte am Sysmex. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### **2.3.2 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut**

Humane Thrombozyten wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll isoliert (Langer et al., 2009). Die Blutabnahme erfolgte an freiwilligen und gesunden Spendern mit einer Spritze, welche, zur Vermeidung vorzeitiger Thrombozytenaktivierung und Gerinnungshemmung, mit 4 ml (bei einer 20 ml großen Spritze) aufgewärmten ACD-Puffer gefüllt war. Die Spritze wurde mit Blut gefüllt, vorsichtig vermischt, je 10 ml in ein 15 ml Falcon gegeben und für 20 min bei RT und 1000 rpm ohne Bremse abzentrifugiert. Dadurch setzte sich PRP ab, das dann mit einer Transferpipette in ein 50 ml Falcon überführt, mit Tyrodes pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt und für 10 min bei RT und 2100 rpm mit Bremse pelletiert werden konnte. Alle Überführungsschritte erfolgten

sehr vorsichtig und langsam, um eine Aktivierung von Thrombozyten zu verhindern. Nach Abgießen des Überstandes war schließlich Thrombozytenpellet gewonnen. Dieses wurde in 250 µl Tyrodes pH 6,5 gut resuspendiert, zur Neutralisation die gleiche Menge Tyrodes pH 7,4 zugegeben und vor der Messung am Sysmex 1:10 verdünnt. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

#### Puffer zur Thrombozytenisolation

##### ACD-Puffer:

- 12,5 g Na<sub>3</sub>-Citrat
- 6,82 g Citronensäure
- 10 g Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 500 ml VE-H<sub>2</sub>O
- mit NaOH auf pH 4,69 eingestellt
- Puffer wurde steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

##### Tyrodes 10 x:

- 80 g NaCl
- 10,15 g NaHCO<sub>3</sub>
- 1,95 g KCl
- 1 l VE-H<sub>2</sub>O
- Puffer wurde steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

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

- 0,2 g BSA (bovines serum albumine, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- 0,2 g Glucose
- 20 ml Tyrodes 10 x

- 180 ml VE-H<sub>2</sub>O
- mit HEPES (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf pH 7,4 eingestellt
- Puffer wurde sterilfiltriert.

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

- 150 ml Tyrodes pH 7,4 + 0,1 % BSA/Glucose
- mit 1 N HCl auf pH 6,5 eingestellt
- Puffer wurde sterilfiltriert.

### **2.3.3 Aktivierung von Thrombozyten**

Die Aktivierung von isolierten Thrombozyten, erfolgte bei Raumtemperatur mit 100  $\mu$ M ADP, 25  $\mu$ M TRAP oder 0,2 U/ml Thrombin. Die Zugabe der gleichen Menge 2%igen Paraformaldehyds (PFA) diente zur Beendigung der Thrombozytenstimulation. Diese Fixierung schloss auch Effekte der Thrombozytenaktivität, welche möglicherweise das Testverfahren stören, aus. Nach 10 min Inkubation wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS restliches PFA und Stimulatoren entfernt sowie die Thrombozyten in PBS resuspendiert. Als Positivkontrolle erfolgte eine Stimulation mit 1  $\mu$ M STS. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

Um die Thrombozytenaktivierung zu überprüfen, wurde in FACS-Analysen die Expression von P-Selektin (CD62P, Antikörper Wug.E9, Emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland) auf der Thrombozytenoberfläche gemessen.

Mithilfe des Leucocount Kits (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) erfolgte die Sicherstellung einer reinen Thrombozytenisolation und der Ausschluss einer möglichen Kontamination mit Leukozyten. Die Quantifizierung wurde wie von Burkhart und Kollegen (Burkhart et al., 2012) beschrieben durchgeführt. Beide Abschnitte (Schleicher et al., 2015).

Thrombozytenstimulanzen:

Adenosin diphosphat	(ADP, Probe & Go Labordiagnostica GmbH, Osburg, Deutschland)
Thrombin Receptor Activating Peptide	(TRAP, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Thrombin	(Roche, Mannheim, Deutschland)
Staurosporin	(STS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

**2.3.4 Thrombozytenmembranproteine**

Zur Isolation von membranständigem FasL aus humanen und murinen Thrombozyten diente das „Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit“ (Thermo Scientific, Rockford, USA).

Die Inhibition des membrangebundenen FasL auf der Thrombozytenoberfläche erfolgte mittels eines blockierenden anti-FasL Antikörpers (3C8.2) der Firma BioCheck (Münster, Deutschland). Dieser wurde nach Isolation der Membranproteine in der Konzentration von 20 µg/ml für 1 h bei RT inkubiert. Beide Abschnitte siehe auch (Schleicher et al., 2015).

**2.4 Apoptoseinduktion *in vitro***

Zur Induktion von Apoptose in den verschiedenen Zellen kamen isolierte ruhende oder aktivierte Thrombozyten von WT- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen zum Einsatz. Des Weiteren wurden extrahierte Membranproteine von ruhenden oder stimulierten Thrombozyten aus WT- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen verwendet. In einem Experiment wurde der membrangebundene FasL auf isolierten Membranproteinen von stimulierten WT-

Thrombozyten blockiert. Die Behandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M STS diene als Positivkontrolle. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### 2.5 Isolation von primären murinen Neuronen

Die Gewinnung neuronaler Zellen von Wildtyp-C57BL/6-Mausembryonen (18 Tage alte Embryonen) erfolgte mithilfe bereits beschriebener Protokolle (Herrmann et al., 2010). Dabei wurden zunächst trächtige Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen entnommen, in erwärmtes HBSS überführt, Hippocampi freigelegt und in 5 ml HBSS mit 0,25 % Trypsin gegeben. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C folgte zweimaliges Waschen der Gewebe in HBSS und eine Zerkleinerung mittels Drckung von jeweils 1 ml Neuronenmedium durch Pasteurpipetten. Die Verdünnung der Neuronen erfolgte in Medium und das Ausshen in einer Dichte von 60 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläsern auf 4-well-Platten. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und vor Verwendung 5–7 Tage kultiviert.

Die Inkubation hippocampaler Zellkulturen mit verschiedenen verdnnnten Thrombozytenlysaten erfolgte 24 h. Um Apoptose zu untersuchen, wurden die Kulturen mit 0,5  $\mu$ g/ml DAPI oder Primärantikörper gegen NeuN (1:1000) und aktiver Caspase-3 (1:800) inkubiert. Als Sekundärantikörper kam Cyanin 2 (Cy2) markierter Esel anti-Maus und Cy3 markierter Ziege anti-Ratte, jeweils 1:100 verdünnt, zum Einsatz. Die Negativkontrollen ohne Primär- oder Sekundärantikörper zeigten keine detektierbaren Signale (Daten nicht gezeigt). Eine Untersuchung der Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ermöglichte eine Quantifizierung. Bei der Analyse war die Zugehörigkeit der einzelnen Proben nicht bekannt. Beide Abschnitte siehe auch (Schleicher et al., 2015).

#### Neuronenmedium:

10 % 10 x modified Earle's medium (MEM) mit folgenden Zusätzen:

- 0,22 % Natriumbicarbonat (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- 1 mM Natriumpyruvat (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

- 2 mM L-Glutamin	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- 2 % B27 Zusatz	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- 3,8 mM Glucose	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1 % Penicillin/Streptomycin	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
Hank's Balanced Salt Solution	(HBSS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
Poly-D-Lysin	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
4-well-Platten	(Nunc, Thermo Scientific, Rockford, USA)
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole, (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Geräte	Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
<u>Primärantikörper:</u>	
NeuN	neuronal nuclei (Millipore Bioscience, Darmstadt, Deutschland)
Caspase-3	(Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland)
<u>Sekundärantikörper:</u>	
Cyanin 2 (Cy2)-Esel anti-Maus	(Dianova, Hamburg, Deutschland)

Cyanin 3 (Cy3)-Ziege anti-Ratte

(Dianova, Hamburg, Deutschland)

## 2.6 Isolation von Makrophagen

Die Isolation muriner Makrophagen aus dem Knochenmark ist bereits von Langer und Kollegen beschrieben und dementsprechend durchgeführt worden (Langer et al., 2010). In den Kulturen erfolgte jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel. Nach einer Woche wurden die nicht adhärennten dendritischen Zellen (DCs) entfernt, die adhärennten Makrophagen geerntet und für Experimente verwendet. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

## 2.7 FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Antibody Cell Sorter) ist ein Verfahren, welches ermöglicht, verschiedene Zellen morphologisch zu unterscheiden sowie Zellantigene zu analysieren. Bei der Analyse im FACS wird jede einzelne Zelle mit großer Geschwindigkeit in einem Flüssigkeitsstrahl an einem Laser vorbeigeführt, wodurch Streulicht entsteht. Dabei wird mithilfe des Vorwärtsstreulichtes (FSC = Forward Scatter) die Beugung des Lichtes im flachen Winkel gemessen. Diese hängt vom Zellvolumen ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) hingegen ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel. Dieses hängt von der Größe, Granularität und inneren Struktur der Zelle ab.

Um die Expression bestimmter Zellantigene zu analysieren, werden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt, welche Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Die jeweiligen Fluorophore werden entsprechend ihres Absorptionsspektrums mit einem Laser angeregt und das emittierte Licht mit geeigneten Detektoren gemessen. Dadurch können Zelleigenschaften abgeleitet und die Expression von Proteinen quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die FACS-Analysen der humanen und murinen Proben gemäß einem bereits beschriebenen Standardprotokoll durchgeführt (Shattil et al., 1987; Stellos et al., 2012).

Die Verdünnung lebender oder fixierter Blutzellen erfolgte 1:25 in FACS-Puffer. Isolierte Thrombozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  in FACS-Puffer (ohne Natriumazid) verdünnt, mit anti-Maus FasL PE, anti-Maus FasL Biotin, anti-Human FasL PE Antikörper oder mit dem zugehörigen IgG Kontrollantikörper für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen der Proben mit FACS-Puffer (ohne Natriumazid) folgte eine Färbung der murinen Proben mit Streptavidin Alexa Fluor 488 für 30 min bei RT im Dunkeln.

Die Färbung von murinen Makrophagen und Thrombozyten mit einem anti-FasL PE Antikörper oder zugehörigen IgG Kontrollantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln diente dem Vergleich des Expressionsniveaus von FasL. Ein anti-CD11b PerCP Antikörper kam als Makrophagen-Marker zum Einsatz. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte laut Angaben des Herstellers. Schließlich wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und im FACS-Calibur Durchflusscytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Beide Abschnitte siehe auch (Schleicher et al., 2015).

#### FACS-Puffer:

0,5 % BSA und 0,1 % Natriumazid in PBS

#### Primärantikörper:

anti-Maus FasL Biotin	(MFL-3, eBioscience, San Diego, USA)
anti-Maus FasL PE	(MFL-3, Biolegend, San Diego, USA)
anti-Human FasL PE	(NOK-1, eBioscience, San Diego, USA)
anti-Maus CD11b PerCP	(Biolegend, San Diego, USA)

IgG Kontrollantikörper:

Armenischer Hamster IgG	(Biolegend, San Diego, USA)
Maus IgG1	(eBioscience, San Diego, USA)
Ratte IgG2b	(Biolegend, San Diego, USA)

Sekundärantikörper:

Streptavidin Alexa Fluor 488	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
------------------------------	--------------------------------------

## **2.8 Proteinbiochemische Methoden**

In diesem Kapitel werden die verwendeten proteinbiochemischen Methoden beschrieben (siehe auch (Schleicher et al., 2015)).

### **2.8.1 Lyse der Zellen und Thrombozyten**

Nach Ernte und Waschen von Thrombozyten konnten aus ihnen Lysaten hergestellt werden. Dafür wurden sie in RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,1; 50 mM NaCl; 1 % Triton X-100; 0,5 % Natriumdeoxycholat; 0,1 % SDS), welcher ein Protease-Inhibitor Mix (Roche, Mannheim, Deutschland) in der Verdünnung 1:100 enthielt, resuspendiert. Die Lyse der Thrombozyten erfolgte bei 4 °C unter zwischenzeitlichem vortexen. Anschließend wurden die aufgebrochenen Zellen für 30 min bei 13 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren oder direkt einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen.

### **2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes verschiedener Proben wurde das „Pierce BCA Protein Assay Kit“ der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA) verwendet.

Die Methode von Smith und Kollegen (Smith et al., 1985) zur Bestimmung der Proteinkonzentration basiert auf der Beobachtung, dass Proteine im alkalischen Medium  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduzieren.  $\text{Cu}^{1+}$  bindet an BCA (bicinchoninic acid), wobei ein violett gefärbtes Reaktionsprodukt entsteht, welches bei der Wellenlänge 562 nm kolorimetrisch detektiert werden kann. Die Proteinproben wurden je nach erwarteter Konzentration unterschiedlich stark mit PBS verdünnt und zusammen mit dem Standard in Duplikate auf eine 96-well-Platte pipettiert. Zu den Proben wurde 200  $\mu\text{l}$  frisch angesetztes BCA Reagenz gegeben und bei 37 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Abkühlung der Platte folgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät. Anhand der Absorptionwerte konnte die Proteinkonzentration in den Proben gemäß einer Standardkurve ermittelt werden. Als Standard diente 2 mg/ml BSA, welches fortlaufend bis zu einer Konzentration von 125  $\mu\text{g/ml}$  1:2 verdünnt wurde. Die Einstellung der Proben mit RIPA-Puffer auf die jeweils gleiche Proteinkonzentration ermöglichte es, die gleiche Proteinmenge auf das SDS-Gel aufzutragen.

### **2.8.3 SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht. Dies erfolgt im elektrischen Feld und die Größenbestimmung der Proteine über den Vergleich der Wanderungsstrecke von Proteinen bekannten Molekulargewichtes. SDS baut sich in Peptidketten ein und verleiht ihnen eine negative Ladung. Es denaturiert ebenfalls sekundäre und tertiäre Strukturen, um sicherzustellen, dass die Proteine nur nach Gewicht und nicht nach Konformation aufgetrennt werden. Jede Probe wurde 1:5 mit 5 x Laemmli-Lade-Puffer verdünnt, die Mischung bei 95 °C für 10 min aufgekocht (Eppendorf Thermomixer) und kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Proben entweder zur Aufbewahrung

eingefroren oder zusammen mit einem Proteinmarker direkt auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel, hergestellt nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970), aufgetragen. Das Gel bestand aus einem Sammelgel (1 M Tris-HCl, pH 6,8; 10 % SDS; 30 % w/v Acrylamid:Bisacrylamid; 10 % APS; TEMED; VE-H<sub>2</sub>O) und einem darübergeschichteten Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 10 % SDS; 30 % w/v Acrylamid:Bisacrylamid; 10 % APS; TEMED; VE-H<sub>2</sub>O). Das APS dient als Polymerisationsinitiator. Die verwendeten SDS-Gele wurden in der gewünschten Prozentzahl an Acrylamid selbst gegossen sowie APS und SDS, als Letztes zupipettiert. Nachdem die Trenngellösung gut gemischt und luftblasenfrei war, konnte es in eine Plastikgellkassette pipettiert und zur Glättung mit Isopropanol überschichtet werden. Nach 30 min war das Gel auspolymerisiert, das Isopropanol wurde abgegossen und die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert. Zur Formung von Geltaschen diente das vorsichtige Einsetzen eines Kamms. Anschließend wurde das Gel zur Polymerisation 30 min stehen gelassen, danach in eine Elektrophorese-Kammer gegeben und mit 1 x Laufpuffer überschichtet. Dann folgten die Entfernung des Kamms und das Ausspülen der Geltaschen mit Puffer. Schließlich wurden die Proteinproben für die Auftrennung zusammen mit 7 µL des Molekulargewichtsstandards (BenchMark Pre-stained Protein Ladder) in die Taschen aufgetragen. Um einen geraden Lauf der Proben zu erzielen, diente die Auffüllung leerer Geltaschen mit Laemmli-Ladepuffer. An das Gel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, und nachdem die Lauffront der Proben das Trenngel erreicht hatte, für ca. 2 h auf 125 V erhöht.

5 x Laemmli-Ladepuffer

6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)  
1 ml Glycerol (Applichem, Darmstadt, Deutschland)  
2 ml 10 % SDS (Fluka, Taufkirchen, Deutschland)  
Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)  
10 % β-Mercaptoethanol

---

30 % (w/v) Acrylamid-Lösung	(Rothiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
1,5 M Trisaminomethan	(Tris-Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); pH 8,8
1 M Trisaminomethan	(Tris-Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); pH 6,8
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
10 % SDS	(Na <sup>+</sup> -Dodecylsulfat, Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
10 % APS	(Ammoniumperoxodisulfat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Isopropanol	(SAV LP, Flintsbach, Deutschland)
10 x Laufpuffer	30 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 144 g Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland) 10 g (w/v) SDS (Fluka, Taufkirchen, Deutschland)

	in 1 l VE-H <sub>2</sub> O, pH 8,5-8,7. Puffer wurde vor Verwendung 1:10 mit VE-H <sub>2</sub> O verdünnt.
BenchMark Pre-stained	(Protein Ladder, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
VE-H <sub>2</sub> O	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Geräte	vertikale SDS-Gelapparatur Novex Mini-Cell (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Netzgerät (Gibco, Darmstadt, Deutschland)

### 2.8.4 Western Blot

Western Blot ist eine immunologische Nachweismethode, die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert und durch eine chemilumineszente Enzymreaktion sichtbar macht. Die Proteine werden durch Elektrotransfer von Kathode zur Anode aus dem Gel auf eine Membran geblottet und durch hydrophobe Wechselwirkung fixiert. Dazu wurden zwei Filterpapiere und das Gel mit Transferpuffer befeuchtet sowie die Transfermembran 10 min mit Methanol äquilibriert. Anschließend wurde von Anode zu Kathode ein Filterpapier, die Membran, das Gel und erneut ein Filterpapier gestapelt. Nach der Entfernung von Luftblasen konnten die Proteine je nach Größe bei 10-15 V und konstanter Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> 60-90 min im Trans-Blot SD semi-dry transferiert werden.

---

10 x Transferpuffer	24 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 112,6 g Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland) in 1 l VE-H <sub>2</sub> O. Vor Verwendung wurde der Puffer mit 20 % (v/v) Methanol (Merck) versetzt und mit 70 % VE- H <sub>2</sub> O verdünnt.
PVDF-Transfermembran	6,5 cm x 8,5 cm (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Filterpapier	Gel-Blotting-Filterpapier; 6,5 cm x 8,5 cm (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland)
Geräte	Trans-Blot SD semi-dry (Bio-Rad, München, Deutschland) Netzgerät (Gibco, Darmstadt, Deutschland)

### 2.8.5 Immundetektion

Zur gezielten Detektion von Proteinen und Absättigung unspezifischer Bindungsstellen diente das Blocken der Membran in 5%iger-Milchpulverlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach dem Blockieren wurde die Membran bei 4 °C über Nacht oder für 1 h bei RT mit dem auf das zu untersuchende Protein gerichteten, primären Antikörper (gegen murines FasL, TRAIL und Tom20 Protein in der Konzentration gemäß Herstellerangaben) auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach dreimaligem 10 min Waschen mit PBST folgte eine Inkubation der Membran für 1 h bei RT unter Schütteln mit dem entsprechenden farbstoffmarkierten infraroten „LI-COR IRDye (infrared dye)“ Sekundärantikörper im Dunkeln. Dieser 1:15 000 in 5%iger-Milchpulverlösung verdünnte Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies des primären Antikörpers.

Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen und anschließend zwischen zwei Filterpapieren im Dunkeln getrocknet. Die Antikörpermarkierten Proteine konnten dann am „Odyssey Infrared Imaging Scanner“ detektiert werden.

PBS	Phosphate-Buffered Saline (PAA, Pasching, Österreich), 1 PBS Tablette in 500 ml VE-H <sub>2</sub> O aufgelöst
PBST	Waschlösung: 0,1 % (v/v) Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1 x PBS gelöst
Blockierungslösung	5 % (w/v) Milchpulver (Bio Milchpulver, fettarm, Heirler, Radolfzell, Deutschland) in PBST gelöst
Geräte	Odyssey Infrared Imaging Scanner (LI-COR, Bad Homburg, Deutschland)
<u>Antikörper:</u>	
anti-Maus FasL	(Abnova, Heidelberg, Deutschland)
anti-Maus TRAIL	(Abcam, Cambridge, Großbritannien)
anti-Maus Tom20	(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)

### **2.8.6 Strippen der Transfermembran**

Durch Strippen der Membran, d. h. chemisches Ablösen gebundener Antikörper, kann diese zur spezifischen Detektion von Proteinen erneut verwendet werden. Dabei trennt Mercaptoethanol die Disulfidbrücken von Immunglobulinen, welche leichte und schwere Ketten verbinden. Die bereits verwendete Membran wurde nach Waschen in PBS in 20 ml Stripping-Puffer + 20 % Methanol für 30 min im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Nach gründlichem Waschen durch häufigen Austausch von PBST für etwa 30 min (bis der Geruch des Mercaptoethanols verschwunden war), konnte erneut mit dem Blocken und einer anschließenden Detektion weiterverfahren werden.

#### Stripping-Puffer:

62,5 mM Tris-HCl

2 % SDS

0,7 % 2-beta-Mercaptoethanol

## **2.9 Apoptosedetektion**

Für die verschiedenen verwendeten Zelltypen variierte der Zeitpunkt der Apoptosedetektion.

Die Apoptose wurde mit verschiedenen im Folgenden beschriebenen Assays detektiert. Siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### **2.9.1 Caspase-3/7-Aktivitätsmessung**

Die Messung der Caspase-3/7-Aktivität erfolgte mit dem „Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay“ der Firma Promega. Das Prinzip beruht auf dem Substrat Z-DEVD Rhodamine 110, welches durch die aktive Caspase-3/7 in ein fluoreszierendes Produkt gespalten wird und im Fluoreszenzmessgerät detektiert werden kann. Die Thrombozyten wurden hierfür in eine 96-well-Platte in 100 µl Tyrodes Puffer ausgesät,

mit einem Volumen 2 % Paraformaldehyd fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Koinkubation der Thrombozyten mit den jeweiligen Zielzellen erfolgte für 6 h bei 37 °C. Die Behandlung der Zellen mit 1 µM STS diente als Positivkontrolle. Vor der Messung wurde das „Apo-ONE Caspase-3/7 Reagent“ zugegeben und entsprechend der Herstellerangaben unter 350 rpm Schütteln bei RT und im Dunkeln inkubiert. Folglich konnte das Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 490 nm und der Emissionswellenlänge von 520 nm in einem Plattenlesegerät gemessen werden. Zur Ermittlung einer Kinetik der Apoptoseinduktion wurde in 1 min Intervallen gemessen. Die ansteigende Fluoreszenz korreliert linear mit der Menge an Caspase-3/7-Aktivität in den Proben. Aufgrund von Puffereffekten wurde die Apoptoseaktivität mit der entsprechenden Probe mit Puffer-stimulierten Thrombozyten normalisiert. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### **2.9.2 TUNEL-Färbung**

Durch die TUNEL(terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labeling)-Methode können apoptotische Zellkerne detektiert werden. Das Prinzip beruht auf der DNA-Fragmentierung während des späten Stadiums der Apoptose. Dabei werden Hydroxygruppen an den DNA-Bruchstellen frei, an die sich in einer Enzymreaktion markierte Nukleotide anlagern, welche im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können (Kyrylkova et al., 2012). Das verwendete „In Situ Cell Death Detection Kit TMR red“ wurde von der Firma Roche bezogen und gemäß Herstellerangaben angewendet. Hierfür wurden  $2 \times 10^4$  Zellen auf Objektträgern mit aufgesetzten Kammern ausgesät. Am nächsten Tag folgte eine Koinkubation der Zielzellen mit stimulierten, fixierten und gewaschenen Thrombozyten (je  $1 \times 10^8$ ) für 16 h. Die Stimulation der Zellen mit Puffer diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellproben luftgetrocknet und mit 4 % PFA für 1 h bei RT fixiert. Danach zweimal für 15 min mit PBS gewaschen und anschließend 2 min in Permeabilisationslösung (0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat in PBS) auf Eis inkubiert. Die Behandlung von Zellen ohne Thrombozyten mit DNase I (1000 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mg/ml BSA) für 10 min bei RT diente als Positivkontrolle. Der

TUNEL-Reaktionsmix (Enzym- + Markierungslösung) und die Markierungslösung alleine (für eine weitere Negativkontrolle) wurde für 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Proben dreimal je 5 min mit PBS gewaschen, für 3 min mit DAPI (0,5 µg/ml) angefärbt und mit Mounting Medium (Dako, Carpinteria, USA) eingebettet. Nach Trocknung konnten die Proben schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Färbung der gefriergetrockneten Hirnschnitte von Mäusen nach Schlaganfallinduktion erfolgte nach dem gleichen Ablauf. Zur Quantifizierung wurden acht verschiedene Mikroskopausschnitte pro Hirnschnitt ausgezählt und der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Zellen ermittelt. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

## 2.10 Transwell-Experimente

Für Transwell-Assay-Experimente diente die Boyden-Kammer-Methode. Dafür wurden Polykarbonatmembranfilter mit Poren in einer Größe von 5 µm (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) verwendet. Ruhende oder ADP-aktivierte Thrombozyten ( $2 \times 10^8$ ) wurden in die untere Kammer, SH-SY5Y ( $2 \times 10^4$ ) in die obere Platte oder SH-SY5Y ( $2 \times 10^4$ ) Zellen zusammen mit aktivierten Thrombozyten in die untere Kammer gegeben. Nach 16 h Inkubation folgte eine Annexin-Färbung mithilfe des "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I" nach Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf dem Verlust der Zellmembranasymmetrie während des frühen Apoptosestadiums, wobei Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Plasmamembran transloziert wird. FITC Annexin V kann daran binden und so im FACS apoptotische Zellen detektieren. Vitale Zellen werden dabei nicht gefärbt. Apoptotische Zellen sind FITC Annexin V-positiv, tote Zellen FITC Annexin V- und PI-positiv (Prinzip beschrieben in (Koopman et al., 1994; Martin et al., 1995; Riccardi and Nicoletti, 2006)). Für die Färbung wurden die Zellen abtrypsiniert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 100 µl 1 x Bindungspuffer aufgenommen. Dann wurde je 7 µl FITC Annexin V und PI zugegeben, sanft gevortext und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte 400 µl 1 x Bindungspuffer zugegeben und die Proben innerhalb einer Stunde im FACS analysiert werden. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

Apoptose Kits:

Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Mannheim, Deutschland)

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)

In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Mannheim, Deutschland)

## 2.11 Messung der LDH-Freisetzung

Um das freigesetzte LDH zu messen, wurden SH-SY5Y-Zellen oder MEFs auf eine 96-well-Platte ausgesät und mit verschiedenen verdünnten Proteinfractionen aus humanen oder murinen Wildtyp- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Thrombozyten behandelt. Nach 6 h Inkubation und Zugabe von „CytoTox 96 Reagent“ (Promega) konnte die Absorption bei 490 nm in einem Plattenlesegerät gemessen werden. Die Lyse unbehandelter Zellen diente zur Bestimmung der Gesamtmenge an zellulärem LDH. Um die Bedeutung des intrinsischen Apoptosesignalweges bei der Thrombozyten-induzierten Apoptose zu evaluieren, wurden Bax- und Bak-defiziente murine MEFs (Bax/Bak-Doppel-Knockout-Zellen, erstmals beschrieben von (Scorrano et al., 2003)) verwendet. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

## 2.12 *In vivo*-Apoptosemodelle

### 2.12.1 Retinales NMDA-Verletzungsmodell

Für das NMDA-Modell wurden alle Experimente von der Tierschutzkommission des National Eye Institutes, National Institutes of Health (NIH; Tierversuchsantrag 06-553, 06-570, und 07-608) genehmigt und gemäß der NIH Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Das retinale NMDA(N-Methyl-D-aspartic acid)-Verletzungsmodell sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gemäß dem bereits beschriebenen Protokoll (Li et al., 2008).

Dabei wurde durch Injektion von NMDA in den Glaskörperaum des Auges der Maus retinale neuronale Apoptose induziert. Die Applikation von Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (10 µl in PBS i. p., Accurate Chemical und Scientific, Westbury, USA) 24 h vor der Apoptoseinduktion ermöglichte die Depletion von Thrombozyten. Um die Thrombozytendepletion zu überprüfen, wurde den mit kontrollseren- oder thrombozytendepletionsseren-behandelten Mäusen nach ihrer Euthanasie Blut abgenommen und die Anzahl der Thrombozyten in einem automatisierten Zellzähler (Sysmex) bestimmt. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### **2.12.2 Schlaganfallmodell**

Alle Schlaganfallmodellexperimente wurden in Übereinstimmung der kürzlich publizierten ARRIVE Richtlinien (nc3rs) durchgeführt. Die Zuordnung der Behandlungsgruppen einzelner Tiere erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Zur Thrombozytendepletion wurde den Mäusen Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (10 µl in PBS i. p.) appliziert und am nächsten Tag tMCAO (transient middle cerebral artery occlusion) durchgeführt. (Kleinschnitz et al., 2013). Durch Verschluss der mittleren Zerebralarterie mittels der intraluminalen Fadenverschluss-Technik konnte ein Schlaganfall induziert werden (Kraft et al., 2013b; Langhauser et al., 2012). Die Tiere wurden mit 2,5 % Isofluran (Abbott, Rangendingen, Deutschland) in einer 70 % N<sub>2</sub>O/30 % O<sub>2</sub>-Atmosphäre betäubt und die Körpertemperatur während der Operation konstant bei 37 °C gehalten. Nach einem Hautschnitt in die Nackenmitte folgte die Ligation der proximalen und außen liegenden Karotis. Es wurde ein Standard Silikongummi, verbunden mit einem Nylonfaden (6021; Docol, Sharon, USA), eingesetzt und über die rechte innen liegende Karotis geschoben, um den Anfang der mittleren zerebralen Arterie zu verschließen. Das Zurückziehen des Fadens nach 60 min ermöglichte wieder eine Reperfusion. 24 h nach tMCAO wurden die Mäuse geopfert, die Gehirne zügig entfernt und mittels einer Maushirnscheibenmatrix (Harvard Apparatus, Holliston, USA) in drei 2-mm dicke koronale Scheiben geschnitten. Nach Waschen der Schnitte mit 2 %

2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS waren die Infarkte sichtbar. Die Infarktvolumen konnten dann unter Berücksichtigung von Ödemen (ImageJ software, National Institutes of Health) gemäß folgender Gleichung berechnet:  $Volumen V (mm^3) = V_{Infarkt} \times (1 - (VI - VC)/VC)$ , wobei  $(VI - VC)$  die Volumendifferenz zwischen der ischämischen Gehirnhälfte und der Kontrollgeirnhälfte darstellt.  $(VI - VC)/VC$  zeigt den prozentualen Unterschied zur Kontrollgeirnhälfte (Kleinschnitz et al., 2013). Schließlich wurden die Gehirnschnitte eingebettet und Kryoschnitte hergestellt. Um Apoptose zu analysieren, wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit TMR red“ (Langer et al., 2010) verwendet und gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

### 2.13 Immunfluoreszenzfärbung

#### 2.13.1 Konfokale Mikroskopie mit humanen Thrombozyten

Zur intrazellulären Lokalisation von FasL in Thrombozyten diente eine Immunfluoreszenzfärbung. Dafür wurden Deckgläser in Ethanol gewaschen, getrocknet und für 2 h mit 0,01 % Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur in einer feuchten Umgebung beschichtet. Humane Thrombozyten wurden wie beschrieben isoliert und für 20 min mit 1 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, für 10 min bei 1200 g und RT pelletiert und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Anschließend konnte die Zellzahl auf  $1 \times 10^7/ml$  eingestellt und je  $100 \mu l$  ( $1 \times 10^6$ ) der Thrombozytensuspension auf Poly-L-Lysin benetzten Deckgläsern, die sich in einer 24-well-Platte befanden, bei 1200 g für 5 min abzentrifugiert werden. Die Permeabilisation der Thrombozyten erfolgte durch Zugabe von 0,3 % Triton X-100 für 10 min. Nach 5 min waschen in Waschpuffer wurde erst für 1 h mit 1 % BSA und dann für 30 min bei RT mit Eselserum blockiert. Es folgte die Inkubation der Thrombozyten mit  $150 \mu l$  anti-CD62P und anti-FasL Antikörper, beide 1:100 mit Puffer verdünnt, oder mit IgG Maus und IgG Kaninchen in der entsprechenden Konzentration über Nacht bei  $4^\circ C$ . Am nächsten Tag wurden die Proben innerhalb einer Stunde fünfmal in Waschpuffer gewaschen und mit Esel anti-Maus Alexa 488 [ $3 \mu g/ml$ ] und Esel anti-Kaninchen DyLight 649 [ $1,8 \mu g/ml$ ] für eine

Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde innerhalb einer Stunde fünfmal mit Waschpuffer im Dunkeln gewaschen. Schließlich konnten die Deckgläser mit Mounting Medium (Dako, Carpinteria, USA) auf Glasplättchen eingedeckt und nach deren Trocknung im konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

Poly-L-Lysin	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Waschpuffer	(PBS mit 1 % BSA + 0,3 % Triton X 100 + 0,1 % Tween)
Verdünnungspuffer	(PBS mit 1 % BSA + 0,3 % Triton X-100)
Paraformaldehyd	(Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland)
<u>Primärantikörper:</u>	
anti-FasL	(Abcam, Cambridge, Großbritannien)
anti-CD62P	(Abcam, Cambridge, Großbritannien)
<u>Sekundärantikörper:</u>	
Esel anti-Maus Alexa 488	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
Esel anti-Kaninchen DyLight 649	(Dianova, Hamburg, Deutschland)

### 2.13.2 Immunfluoreszenzfärbung im Gewebe

Um die Anwesenheit von Thrombozyten *in vivo* im Gehirngewebe mit Schlaganfall zu untersuchen, wurden murine Hirnschnitte mit dem CD31 Endothelmarker (1:20), dem neuronalen Marker NeuN (5 µg/ml) und dem Thrombozytenmarker GPIIb/IIIa (10 µg/ml) kogefärbt. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht und die der Sekundärantikörper in der Konzentration gemäß Herstellerangaben für 1 h bei Raumtemperatur. Die Nuklei wurden mit DAPI angefärbt und die Proben an einem konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

Des Weiteren wurden im Schlaganfallgewebe Thrombozyten und apoptotische Zellen kogefärbt. Apoptotische Zellen wurden mittels einer TUNEL-Färbung, Thrombozyten mit einem anti-GPIIb/IIIa (10 µg/ml) und einem sekundären Alexa Fluor 488 gekoppeltem Antikörper (Konzentration entsprechend Herstellerangaben) sowie Nuklei mit DAPI sichtbar gemacht. Die Untersuchung der gefärbten Schnitte erfolgte an einem Standardfluoreszenzmikroskop.

#### Primärantikörper:

anti-GPIIb/IIIa	(POP/B, Emfret Analytics, Würzburg Deutschland)
anti-CD31	(Abcam, Cambridge, Großbritannien)
anti-NeuN	(Millipore Bioscience, Darmstadt, Deutschland)

#### Sekundärantikörper:

Esel anti-Ratte 488	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
---------------------	--------------------------------------

Esel anti-Kaninchen 488	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
Esel anti-Maus Cy5	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
Esel anti-Ratte 549	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole, (0,5 µg/ml in PBS), (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

## 2.14 Datenpräsentation und Statistik

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Um die Mittelwerte der einzelnen Gruppen zu vergleichen, diente der Student t-Test oder die one-way ANOVA Analyse. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

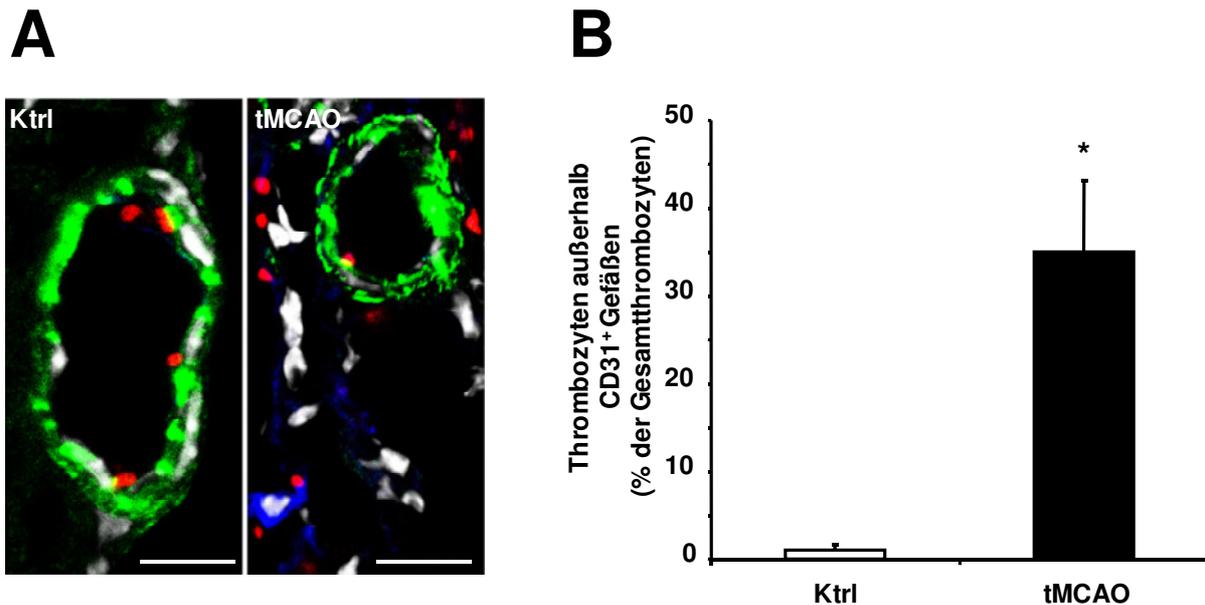
Für die Analysen wurden die Programme EXCEL, Image J, LightCycler 480 und Acrobat Adobe Photoshop 7.0 verwendet.

### 3 Ergebnisse

Diese Arbeit beschreibt eine neuartige Rolle von Thrombozyten, die im geschädigten Gewebe über membrangebundenen FasL Apoptose induzieren können. Siehe auch (Schleicher et al., 2015).

#### 3.1 Thrombozytendepletion reduziert Gewebeapoptose *in vivo*

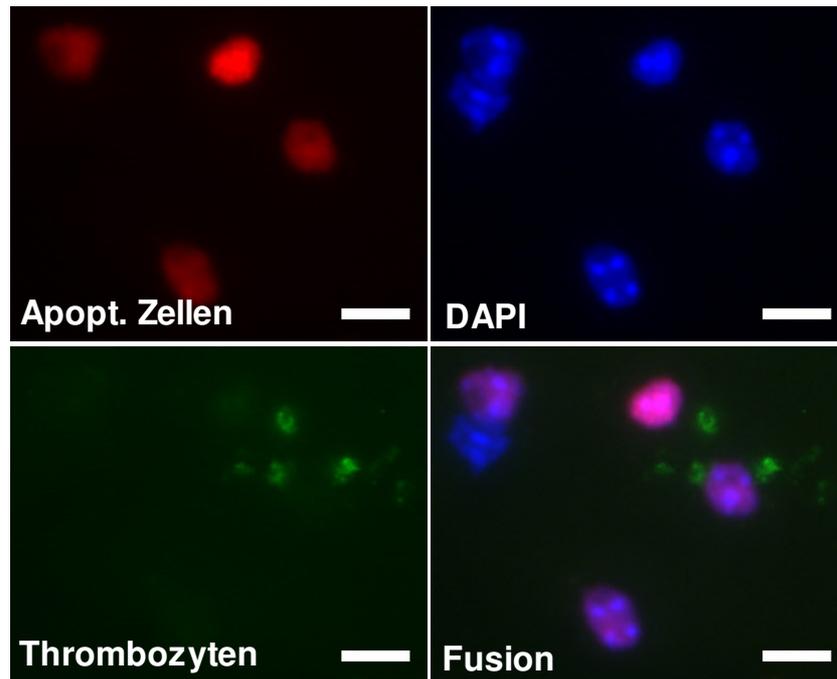
Gefäß- und Gewebsverletzungen führen zur Thrombusgenerierung und anschließend zur Bildung von neuem Gewebe. In diesem Prozess spielt Apoptose eine Hauptrolle, die geschädigte Zellen gezielt entfernt. Es ist derzeit nicht bekannt, ob Thrombozyten neben Thrombusformation auch Prozesse beeinflussen, die zum Gewebeschaden und zur Gewebeneubildung führen. Auffallenderweise haben wir im ischämischen Gehirngewebe von Mäusen, bei denen mittels tMCAO (transient middle cerebral artery occlusion) Schlaganfall induziert wurde, Thrombozyten außerhalb von Blutgefäßen detektiert (Abbildung 5). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Thrombozyten im ischämischen Gewebe in enger Nachbarschaft zu apoptotischen Zellen lokalisiert sind (Abbildung 6). In Folge dessen haben wir Gewebeapoptose in der An- oder Abwesenheit von Thrombozyten untersucht. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit Thrombozytendepletionsserum (PLT Depletion) oder Kontrollserum (Ktrl) behandelt und am nächsten Tag ihre mittleren Zerebralarterien für 60 min verschlossen (tMCAO). Nach Applikation des Thrombozytendepletionsserums erfolgte eine effiziente Depletion von Thrombozyten (Abbildung 8). Nach tMCAO wurden bei Puffer-behandelten Tieren etwa 30 % TUNEL (terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labeling) positive apoptotische Zellen detektiert (Abbildung 7 A und B). Dagegen war bei Thrombozyten-depletierten Tieren die Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach tMCAO-induziertem Zellschaden im Vergleich zu Puffer-behandelten Mäusen um etwa die Hälfte reduziert (Abbildung 7 A und B). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 5: Thrombozyten befinden sich im ischämischen Hirngewebe außerhalb von Blutgefäßen.**

(A, B) In C57BL/6-Mäusen wurde durch 60 min Verschluss der mittleren Zerebralarterie (tMCAO) ein Schlaganfall induziert. Im ischämischen Gehirngewebe erfolgte eine Kofärbung von thrombozytärem GPIIb/IIIa (rot), neuronalen Zellen (NeuN = neuronal nuclei, blau) und Endothelzellen (CD31, grün). Nuklei wurden mittels DAPI sichtbar gemacht (weiß). (A) zeigt repräsentative Bilder der gefärbten Gewebeproben. Maßstabbalken 20  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Thrombozyten außerhalb von Blutgefäßstrukturen. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM und den Prozentsatz der Gesamthrombozyten pro Schnitt ( $n = 6$ , pro Tier wurden drei nicht aufeinanderfolgende Schnitte analysiert).

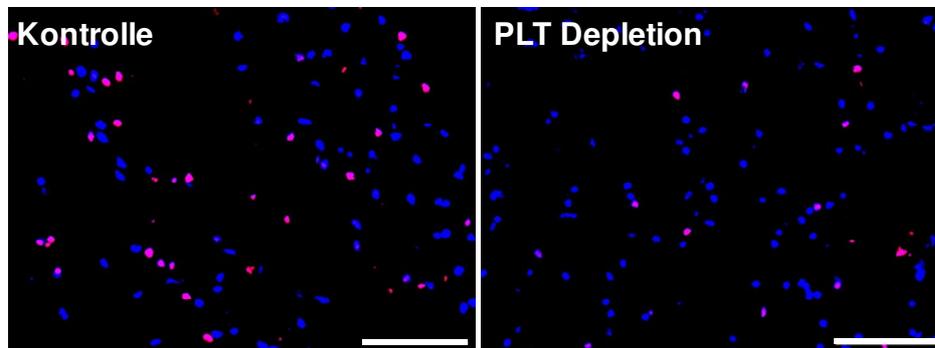
\* $P < 0,05$  vs. Kontrolle (Ktrl). (Schleicher et al., 2015)



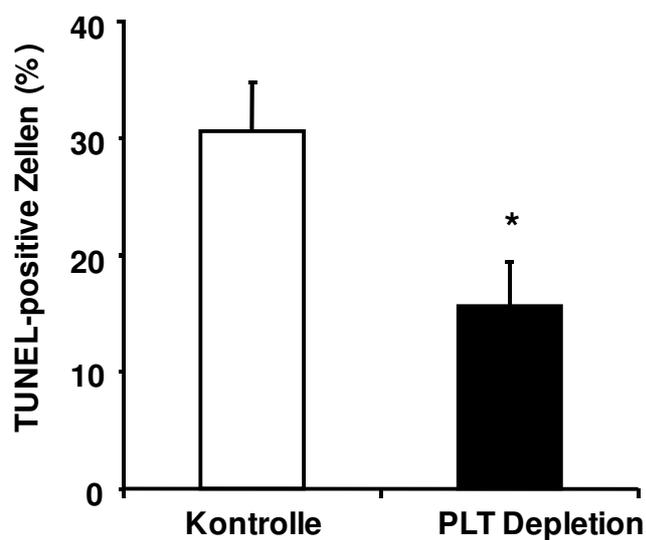
**Abbildung 6: Thrombozyten in direkter Nachbarschaft zu apoptotischen Zellen im ischämischen Gewebe.**

Nach Schlaganfallinduktion in C57BL/6-Mäusen wurden Thrombozyten mit GPIIb/IIIa (grün), apoptotische Zellen mittels TUNEL-Färbung (rot) und Nuklei mit DAPI (blau) angefärbt. Im überlagerten Bild (Fusion) sind apoptotische Zellen (DAPI + TUNEL-positiv) in Pink dargestellt. Maßstabbalken 10  $\mu\text{m}$ .

**A**



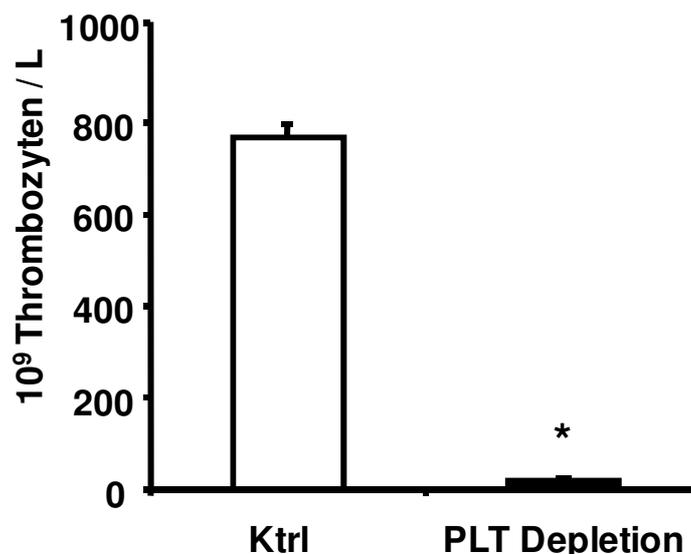
**B**



**Abbildung 7: Thrombozytendepletion reduziert Apoptose im murinen Schlaganfallmodell in vivo.**

(**A, B**) Durch 60 min Verschluss der mittleren Gehirnarterie (tMCAO) wurde bei C57BL/6-Mäusen ein Schlaganfall induziert. 24 h vorher erfolgte die Behandlung der Tiere entweder mit Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (PLT Depletion), das 90 % der Blutplättchen depletiert (Abbildung 8). In ischämischen Gehirngeweben wurden TUNEL-Färbungen durchgeführt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie Gewebeapoptose visualisiert und quantifiziert. (**A**) zeigt repräsentative Bilder der

gefärbten Gewebeschnitte von einer mit Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (PLT Depletion) behandelten Maus nach Schlaganfallinduktion. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. TUNEL-positive Zellen sind in Pink dargestellt. Maßstabbalken 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Quantifizierung von apoptotischen Zellen nach Injektion von Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (PLT Depletion). Zur Quantifizierung wurde die Färbung in willkürlich gewählten Gehirnschnitten im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und pro Tier acht beliebige Mikroskopausschnitte analysiert. Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM und den prozentualen Anteil an TUNEL-positiven Zellen von der Gesamtzellzahl pro Ausschnitt dar ( $n = 6$ ). \* $P < 0,05$  vs. kontroll-behandelter Tiere. (Schleicher et al., 2015)

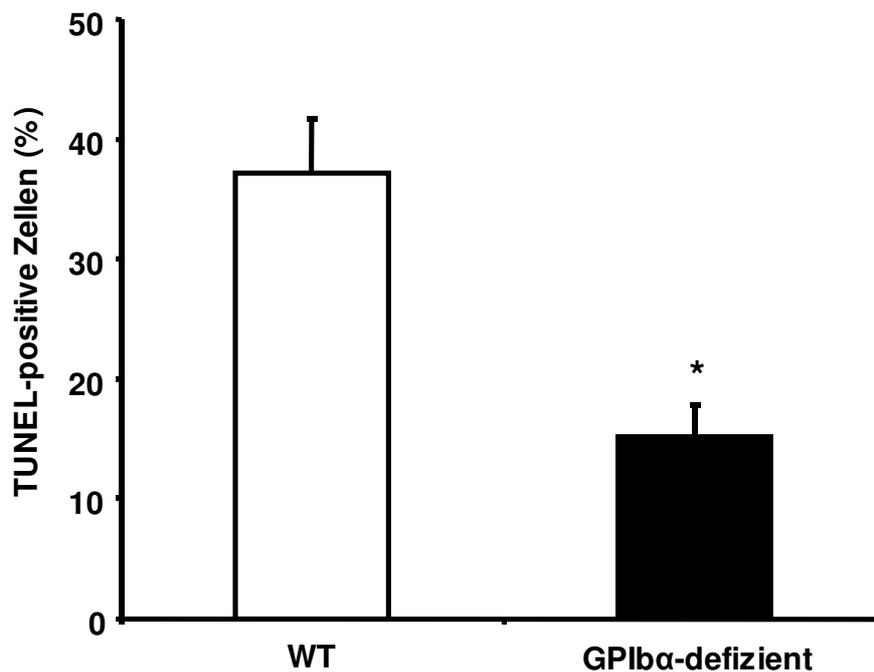


**Abbildung 8: Thrombozyten werden effizient depletiert.**

Im murinen Vollblut wurde die Effizienz der Thrombozytendepletion überwacht. Die Thrombozytenzahl von kontroll- (Ktrl) oder thrombozytendepletionsseren-behandelter Mäuse (PLT Depletion) wurde in einem automatisierten Zellzähler bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. Ktrl. (Schleicher et al., 2015)

In einem weiteren *in vivo*-Depletionsmodell kamen GPIIb/IIIa-defiziente Mäuse, welche eine starke Thrombozytopenie aufweisen, zum Einsatz. In gleicher Weise war nach Schlaganfallinduktion bei diesen Tieren die Gewebeapoptose im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 9) (Schleicher et al., 2015).

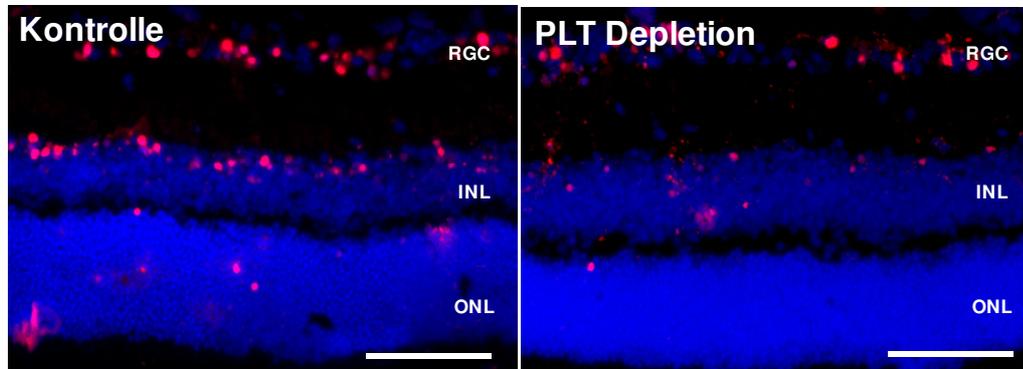
Es ist anerkannt, dass Thrombozyten durch Erhöhung inflammatorischer Prozesse möglicherweise Gewebeschäden verstärken können (Gawaz et al., 2005; Langer et al., 2012). Um weiter die Rolle von Thrombozyten bei der Apoptose in einem *in vivo*-Experiment mit vernachlässigbarer Gewebeinflammation zu analysieren, haben wir ein NMDA-induziertes retinales Apoptosemodell verwendet (Li et al., 2008). Für diesen Zweck wurde NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) in den Glaskörperraum des Auges von C57BL/6-Mäusen injiziert. Die retinale Apoptose war bei Mäusen, welche mit Thrombozytendepletionsserum vorbehandelt wurden, um ca. 40 % reduziert (Abbildung 10 A und B). Dies zeigt, dass Thrombozyten auch bei geringer Gewebeinflammation am programmierten Zelltod einen Beitrag leisten. Die Anwesenheit von Thrombozyten trägt also zur Apoptose im neuronalen Gewebe *in vivo* bei. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



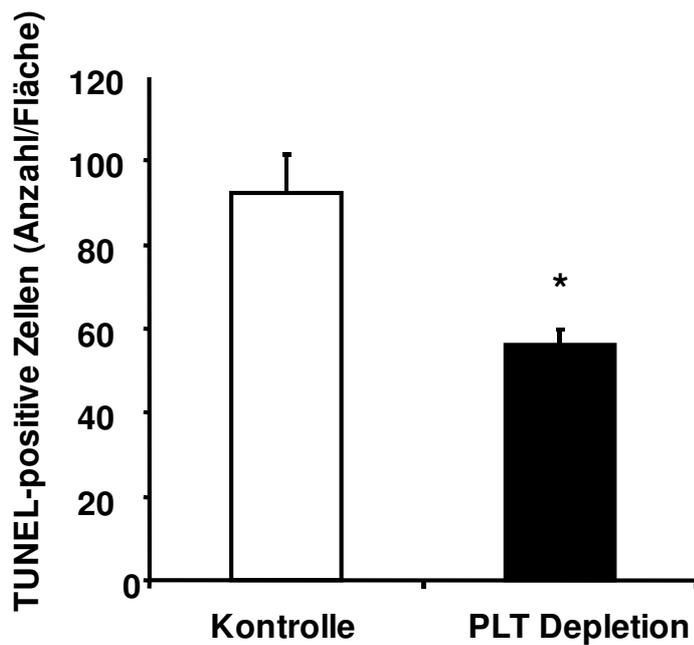
**Abbildung 9: Färbung von apoptotischen Zellen (TUNEL) in thrombozytopenischen GPIIb/α-defizienten Mäusen nach Schlaganfallinduktion.**

Durch 60 min Verschluss der mittleren Zerebralarterie (tMCAO) erfolgte in WT- oder GPIIb/α-defizienten Mäusen die Induktion eines Schlaganfalls. Im ischämischen Gewebe wurde mittels TUNEL-Färbung und Immunfluoreszenzmikroskopie Gewebeapoptose visualisiert. Zur Quantifizierung wurden apoptotische Zellen in willkürlich gewählten Gehirnschnitten analysiert und pro Tier sechs beliebige Mikroskopausschnitte ausgezählt. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM und stellen den Prozentsatz der TUNEL-positiven Zellen von der Gesamtzellzahl pro Schnitt dar ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. WT-Kontrolle. (Schleicher et al., 2015)

**A**



**B**



**Abbildung 10: Thrombozytendepletion reduziert NMDA-induzierte Apoptose von retinalen Neuronen in vivo.**

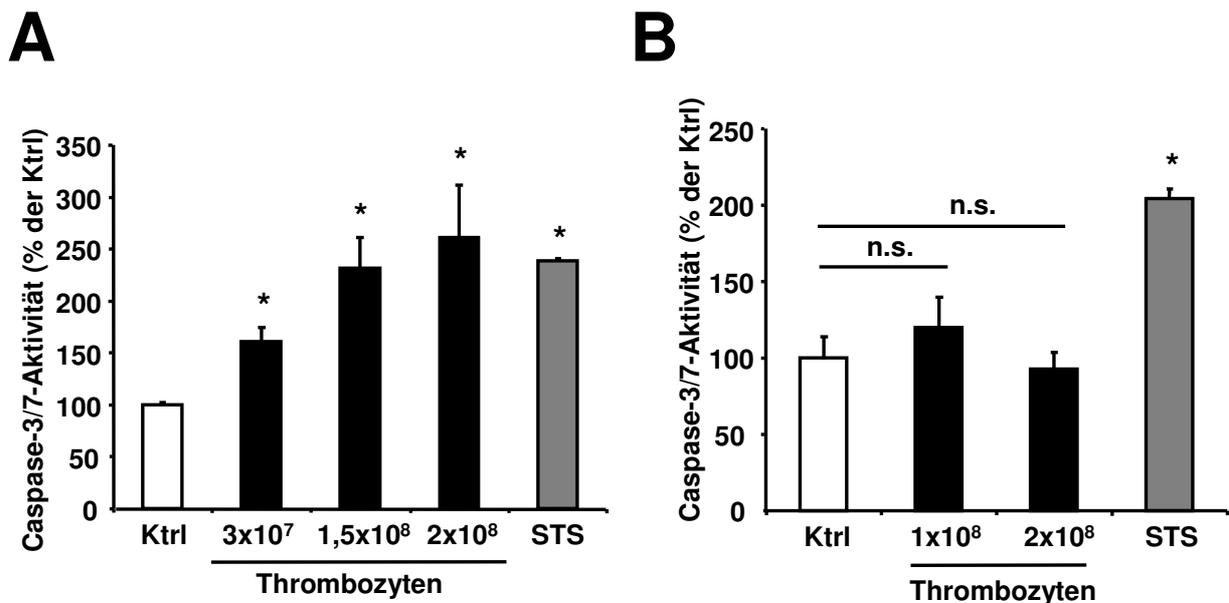
(**A, B**) WT-Mäuse wurden mit Kontroll- (Kontrolle) oder Thrombozytendepletionsseren (PLT Depletion) behandelt. Dann erfolgte die Induktion von neuronaler Apoptose durch intravitreale Injektion von NMDA. In diesem Gewebeapoptosemodell ist der Grad an

*Gewebeinflammation vernachlässigbar. In den Retinaschnitten wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. (A) zeigt repräsentative Bilder der gefärbten Retinaschnitte von einer mit Kontroll- oder Thrombozytendepletionsserum (PLT Depletion) behandelten Maus nach Apoptoseinduktion. RGC = retinal ganglion cell, INL = inner nuclear layer, ONL = outer nuclear layer. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt, TUNEL-positive Zellen sind in Pink dargestellt. Maßstabbalken 100 µm. (B) Quantifizierung von apoptotischen Zellen nach Injektion von Kontroll- oder Thrombozytendepletionsseren (PLT Depletion). Pro Tier wurden acht zufällig gewählte Mikroskopausschnitte analysiert. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM dar und zeigen die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen pro Fläche (n = 8). \*P < 0,05 vs. kontroll-behandelter Tiere. (Schleicher et al., 2015)*

### **3.2 Thrombozyten induzieren Apoptose in humanen und murinen neuronalen Zellen**

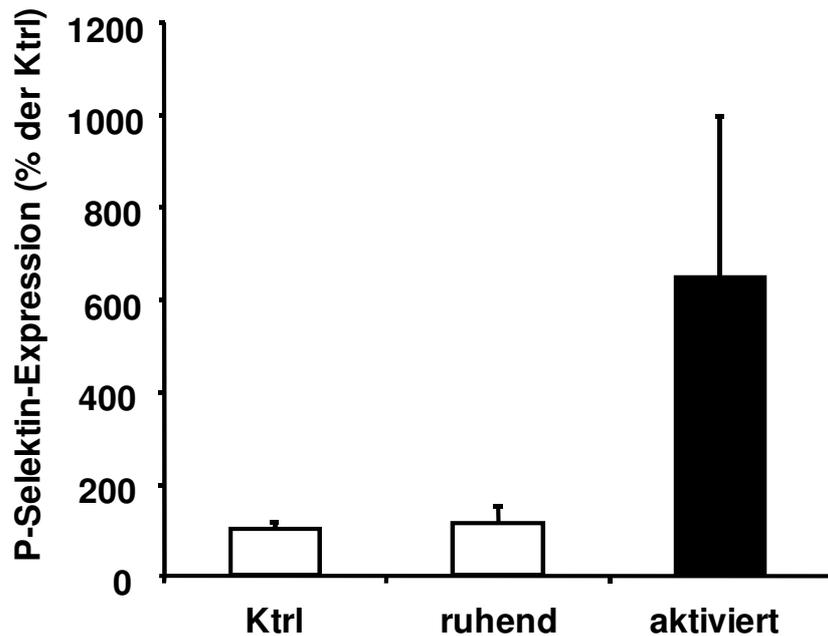
Um die Rolle von Thrombozyten bei der Apoptose zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro*-Experimente durchgeführt. Der direkte Einfluss von Thrombozyten auf humane Zellen wurde durch Inkubation von ADP(adenosine diphosphate)-aktivierten Thrombozyten mit kultivierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen getestet. Eine signifikante Kontamination mit Leukozyten in den Thrombozytenpräparaten (weniger als ein Leukozyt pro 10<sup>6</sup> Thrombozyten) wurde ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Caspase-3/7-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen zeigte, dass Thrombozyten konzentrationsabhängig Apoptose in Neuroblastomzellen induzierten (Abbildung 11 A), wohingegen die Stimulation der Zellen mit ADP allein keinen Effekt zeigte (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung von Thrombozyten wurde durch die oberflächliche Expression des Aktivierungsmarkers P-Selektin bestätigt (Abbildung 12). Die Thrombozyten-induzierte Caspase-3/7-Aktivität war mit der durch Staurosporin (STS, 1 µM als Positivkontrolle) stimulierten Apoptose vergleichbar. In gleicher Weise führte die Anwesenheit von ADP-aktivierten Thrombozyten zu einem signifikanten Anstieg von TUNEL-positiven SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 13). Interessanterweise induzierten Thrombozyten keine Apoptose in HeLa-

Zellen, was auf einen Zelltyp spezifischen Prozess hindeutet (Abbildung 11 B). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



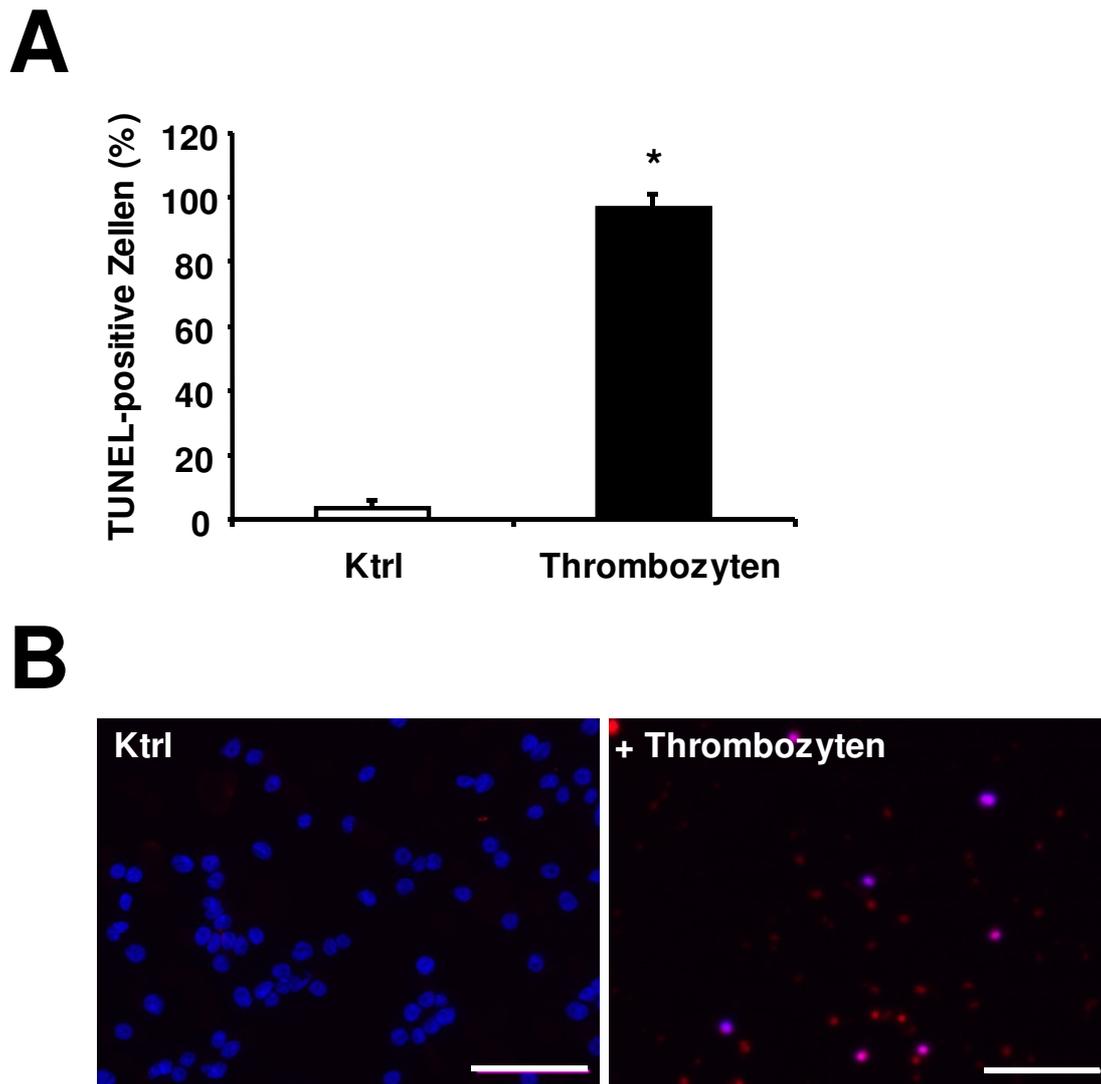
**Abbildung 11: Thrombozyten induzieren konzentrationsabhängig und zellspezifisch Apoptose.**

(A) Isolierte humane Thrombozyten wurden mit ADP stimuliert und um Thrombozyten-abgeleitete Signale auszuschließen mit PFA fixiert. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen mit SH-SY5Y-Neuroblastomzellen inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin (STS) diente als Positivkontrolle, mit Puffer als Negativkontrolle (Ktrl). Nach 6 h wurde die Caspase-3/7-Aktivität gemessen und als Mittelwert  $\pm$  SEM berechnet ( $n = 6$ ).  $*P < 0,05$  vs. Ktrl. (B) HeLa-Zellen wurden in gleicher Weise behandelt und auf Caspase-3/7-Aktivität hin untersucht ( $n = 4$ ). n. s. = kein signifikanter Unterschied,  $*P < 0,05$  vs. Ktrl. Ergebnisse in (A, B) sind als Prozentsatz der Kontrolle dargestellt. Puffer-behandelte Zellen repräsentieren die 100 % Kontrolle (Ktrl). Siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 12: Kontrolle der Thrombozytenaktivierung durch Messung der P-Selektin-Expression.**

Die Aktivierung von Thrombozyten wurde durch Ermittlung der P-Selektin (CD62P) Expression im FACS überwacht. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) und zeigen den Prozentsatz der IgG Kontrolle, welche die 100 % Kontrolle darstellt (Ktrl). (Schleicher et al., 2015)

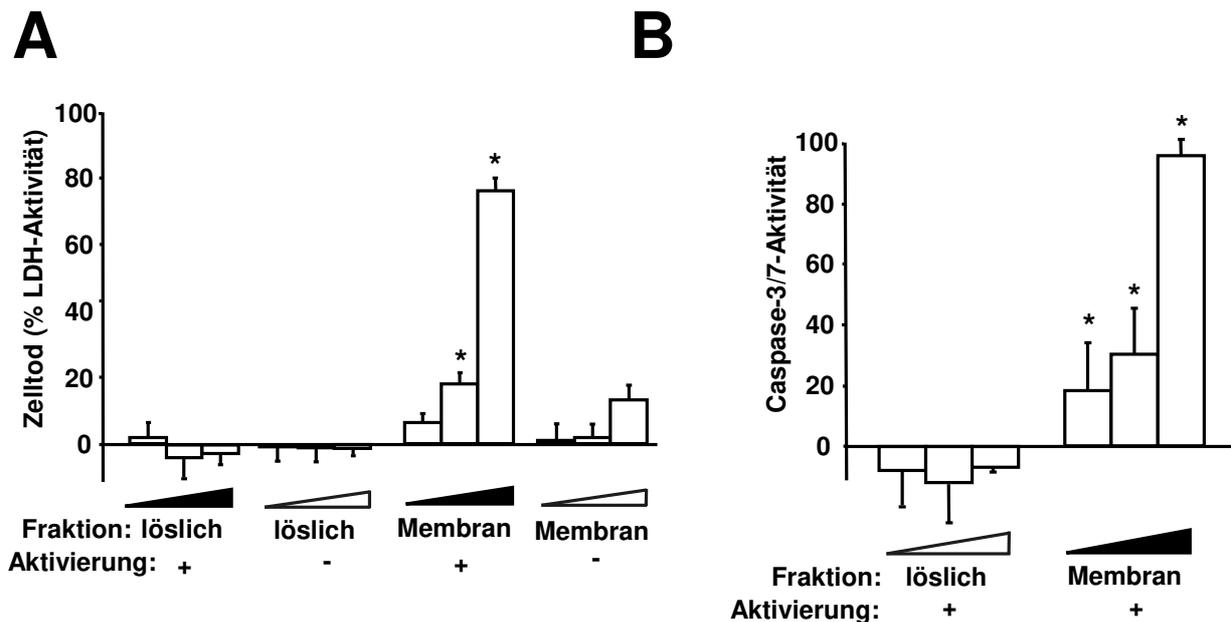


**Abbildung 13: Thrombozyten induzieren Zellapoptose – gemessen mittels TUNEL-Färbung.**

(**A, B**) Isolierte humane Thrombozyten wurden mit ADP stimuliert und für 16 h mit SH-SY5Y inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels einer TUNEL-Färbung sichtbar gemacht. (**A**) Quantitative Analyse TUNEL-positiver apoptotischer Zellen die mit Puffer (Ktrl) oder aktivierten Thrombozyten behandelt wurden. Dargestellt ist der Prozentsatz an TUNEL-positiven Zellen von der Gesamtzellzahl pro Mikroskopauschnitt. Je Probe wurden acht verschiedene, zufällig gewählte Fluoreszenzmikroskopauschnitte analysiert. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3-5$ ). \* $P < 0,05$  vs. Ktrl. (**B**) zeigt

*repräsentative Bilder der Zellen die mit Puffer (Ktrl) oder aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden. Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt, TUNEL-positive Zellen sind in Pink dargestellt. (Schleicher et al., 2015)*

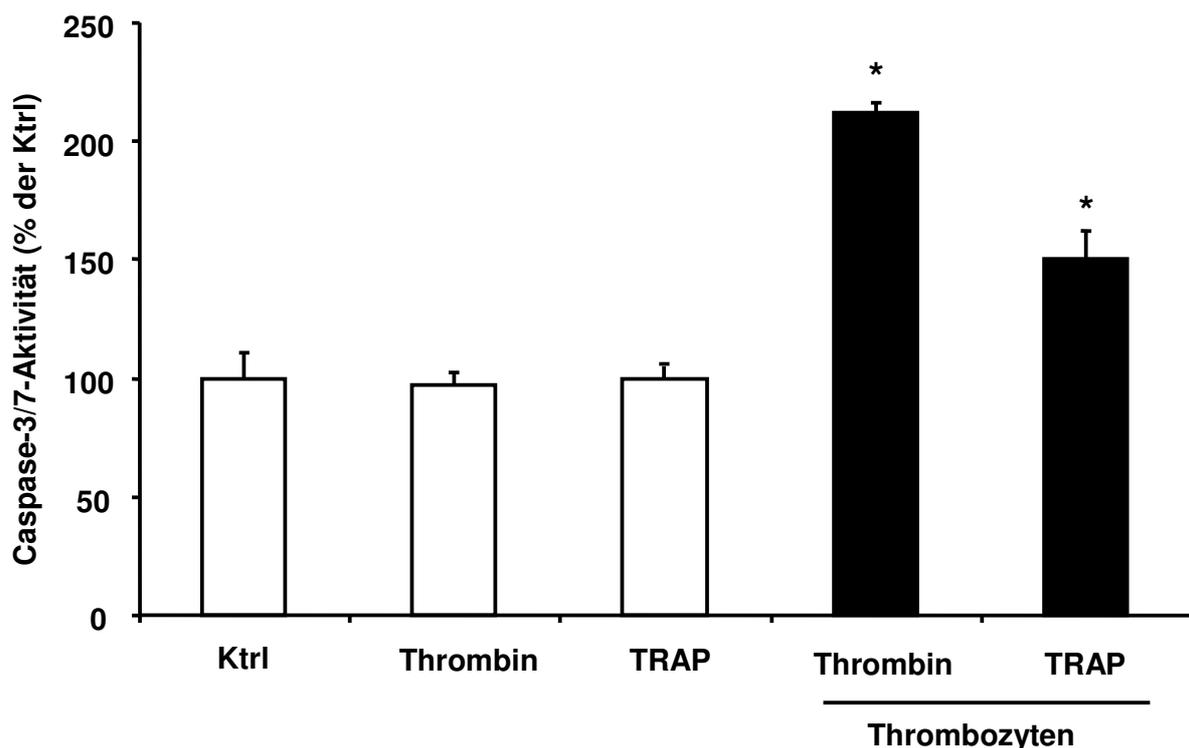
Im Folgenden sollte unterschieden werden, ob die Thrombozyten-induzierte Apoptose über den intrazellulären oder Membran-assoziierten Mechanismus abläuft. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit Membranproteinen oder der löslichen Proteinfraction von ADP-stimulierten oder unstimulierten humanen Thrombozyten inkubiert. Die Induktion von Zelltod wurde mittels LDH(lactate dehydrogenase)-Freisetzung (Galluzzi et al., 2009) gemessen. Die Membranproteinfraction von ADP-stimulierten Thrombozyten induzierte stabil und konzentrationsabhängig einen Zelltod in Neuroblastomzellen (Abbildung 14 A). Im Gegensatz dazu wurde eine niedrige LDH-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit löslichen Proteinfractionen oder Membranproteinen von unstimulierten Thrombozyten gemessen (Abbildung 14 A). Der Thrombozyten-induzierte Zelltod korrelierte außerdem mit einem Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen, die mit Membranproteinen von ADP-stimulierten Thrombozyten behandelt wurden (Abbildung 14 B). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 14: Membranproteine von aktivierten Thrombozyten induzieren Apoptose.**

(A) Isolierte Membranproteine oder lösliche Proteinfractionen (je  $4 \times 10^{-4}$ ;  $4,5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ) von Puffer- (-) oder ADP-stimulierten (+) humanen Thrombozyten wurden mit kultivierten SH-SY5Y-Zellen für 6 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen. Die Daten wurden auf die Gesamtmenge an LDH aus der gleichen Anzahl unbehandelter lysierter Zellen normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) und Prozentsatz der gesamten zellulären LDH-Menge unbehandelter Zellen. \* $P < 0,05$  vs. zugehörige lösliche Fraktion oder Membranfraktion von ruhenden Thrombozyten. (B) Caspase-3/7-Aktivitätskinetik der SH-SY5Y-Zellen, die mit verschiedenen Membran- oder löslichen Proteinkonzentrationen ( $4 \times 10^{-4}$ ;  $4,5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$  isolierte Proteinfractionen) von ADP-stimulierten humanen Thrombozyten für 6 h inkubiert wurden. Die Daten wurden auf die jeweilig zugehörige Probe der mit Puffer-stimulierten Thrombozyten (Kontrolle) normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ) und den Prozentsatz der Kontrolle. \* $P < 0,05$  vs. der jeweils zugehörigen löslichen Fraktion. (Schleicher et al., 2015)

In weiteren Experimenten haben wir Thrombozyten auch mit Thrombin oder TRAP (thrombin receptor activating peptide) aktiviert. In gleicher Weise wie ADP induzierten sowohl TRAP- als auch Thrombin-behandelte Thrombozyten Apoptose in Neuroblastomzellen (Abbildung 15). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

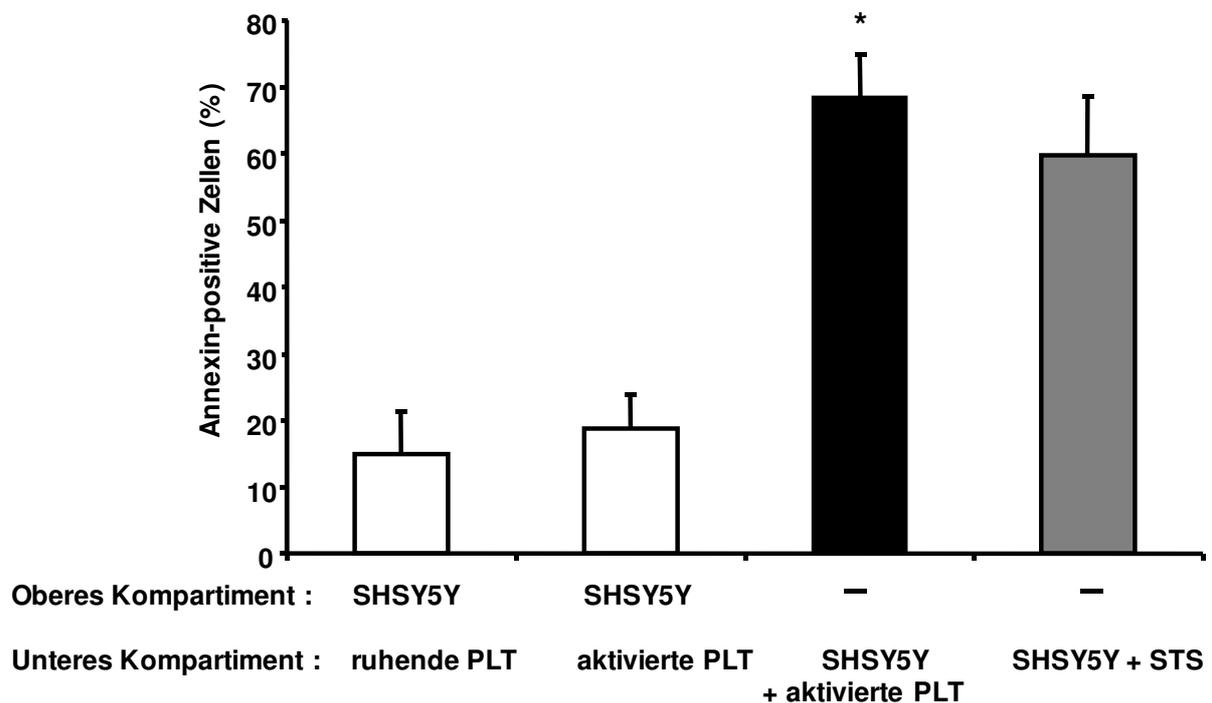


**Abbildung 15: Thrombozyten, stimuliert mit verschiedenen Aktivatoren, induzieren Apoptose.**

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit Thrombin oder TRAP stimuliert und für 6 h mit SH-SY5Y-Zellen inkubiert. Als Kontrolle diente die Stimulation der SH-SY5Y-Zellen mit Puffer, Thrombin, TRAP oder STS. Danach wurde die Caspase-3/7-Aktivität in den Zellen gemessen. Die Daten zeigen den Prozentsatz der Puffer-behandelten Kontrolle (Ktrl, 100 % gesetzt) und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0,05$  vs. Ktrl. (Schleicher et al., 2015)

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass aktivierte Thrombozyten im Kontakt mit Zellen in diesen Apoptosen auslösen. Um herauszufinden, ob stimulierte Thrombozyten möglicherweise bioaktive Substanzen freisetzen, die zur Apoptose führen, wurden Boyden-Kammer-Experimente durchgeführt.

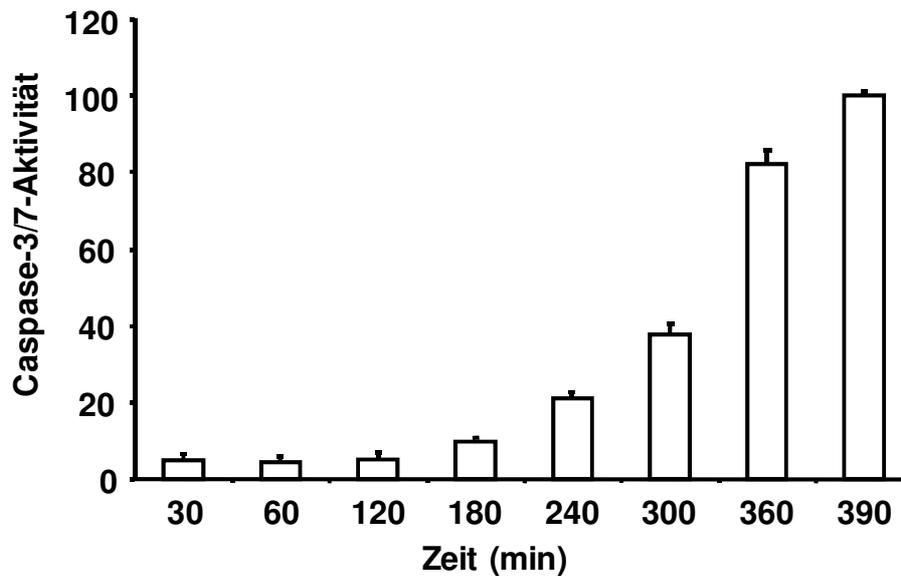
Mithilfe einer Boyden-Kammer konnten Thrombozyten und Zielzellen in getrennten Kompartimenten inkubiert werden, sodass sie nur über das Medium in Kontakt standen und es ihnen möglich war, auf freigesetzte Stoffe zu reagieren. Die Induktion von apoptotischen Zelltod, war nur zu beobachten, wenn Thrombozyten und Neuroblastomzellen im gleichen Kompartiment inkubiert wurden (Abbildung 16). In den Proben, bei denen sich Thrombozyten und SH-SY5Y-Zellen in getrennten Kompartimenten befanden und nur über das Medium in Kontakt treten konnten, wurde keine Apoptose induziert (Abbildung 16). Beide Abschnitte siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 16: Apoptoseinduktion durch Thrombozyten im direkten Kontakt mit der Zielzelle oder in getrennten Kompartimenten.**

Ruhende oder ADP-aktivierte Thrombozyten (PLT) wurden in das untere und SH-SY5Y-Zellen in das obere Kompartiment einer Boyden-Kammer ausgesät. Die dritte Säule repräsentiert Experimente, bei denen aktivierte Thrombozyten mit SH-SY5Y-Zellen im gleichen Kompartiment inkubiert waren. Die Behandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M STS diente als Positivkontrolle. Es wurde eine Annexin-Färbung durchgeführt und der Prozentsatz Annexin-positiver Zellen gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. Experimente mit Zellen in getrennten Kompartimenten. (Schleicher et al., 2015)

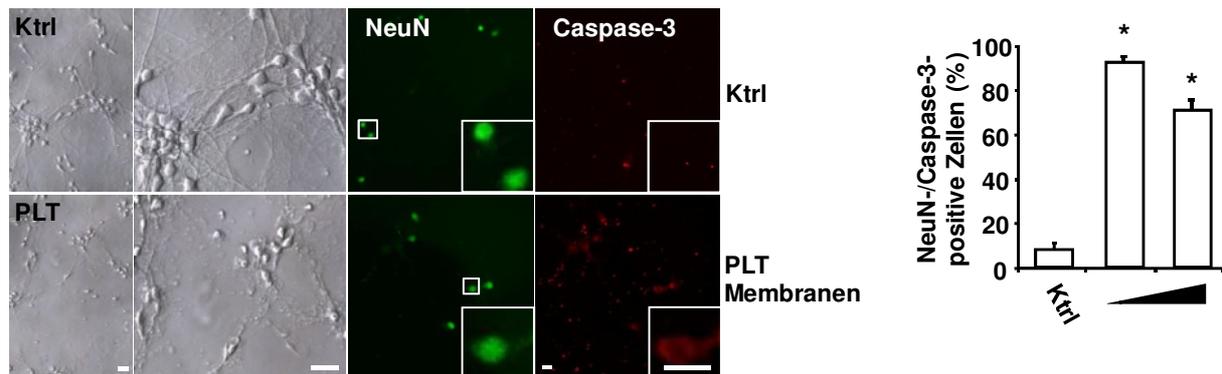
Um zu untersuchen, nach welcher Zeit Thrombozyten Apoptose in Zielzellen auslösen, wurden Zeitreiheexperimente durchgeführt. Thrombozyten induzierten den Apoptosesignalweg in Neuroblastomzellen innerhalb von sechs Stunden (Abbildung 17). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 17: Induktion zellulärer Caspase-3/7-Aktivität durch Membranproteine aktivierter Thrombozyten.**

Messung von Caspase-3/7-Aktivitätskinetiken in SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit isolierten Membranproteinen ( $5 \times 10^{-4}$ ) von ADP-aktivierten humanen Thrombozyten. Die Daten wurden jeweils auf die zugehörigen Puffer-stimulierten Thrombozytenproben (Kontrolle) normalisiert. Sie zeigen den Prozentsatz der Kontrolle und den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (Schleicher et al., 2015)

Weitere Versuche sollten Aufschluss geben, ob Thrombozyten-induzierte Apoptose auch in primären murinen Zellen stattfinden kann. Dafür erfolgte die Messung von Apoptose in neuronalen Zellen, die aus dem Hippocampus von Mausembryonen (Embryotag 18) stammen, nach Exposition mit Membranproteinen ADP-aktivierter muriner Thrombozyten. In gleicher Weise wie Experimente mit Zelllinien induzierten Thrombozyten gesteigerte Caspase-3 Aktivitäten in primären neuronalen Zellen (Abbildung 18). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



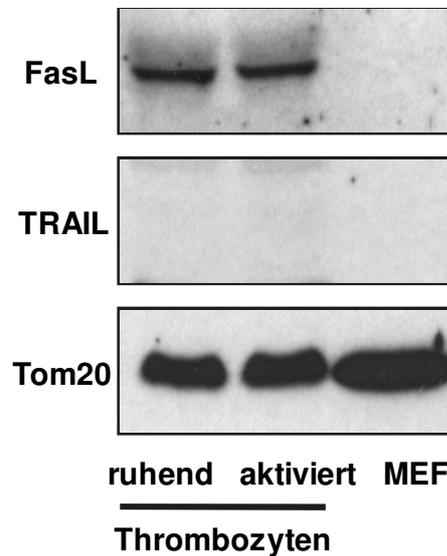
**Abbildung 18: Membranproteine aktivierter Thrombozyten induzieren Apoptose in primären murinen Neuronen.**

Primäre murine neuronale Zellen wurden mit Puffer (Ktrl) oder Membranproteinen von ADP-aktivierten murinen Thrombozyten (PLT Membranen aus  $0,5 \times 10^8$  oder  $2,5 \times 10^8$  Thrombozyten) inkubiert. Um Apoptose zu untersuchen, erfolgte in den Kulturen eine Kofärbung mit NeuN (neuronal nuclei) und Caspase-3. Zur Quantifizierung wurde die Färbung durch zufällige Probenwahl mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) und den Prozentsatz der Gesamtzellzahl pro Schnitt. \* $P < 0,05$  vs. Ktrl. Maßstabbalken  $20 \mu\text{m}$ . (Schleicher et al., 2015)

### 3.3 Aktivierte Thrombozyten exprimieren membrangebundenen FasL

Die stabile Stimulation von Zelltod durch Thrombozyten weist auf eine spezifische Induktion von Apoptose durch direkten Zellkontakt mit aktivierten Thrombozyten hin. Interessanterweise ist in einer vorherigen Studie eine kleine Menge aktivierter Thrombozyten mit einer Fas-abhängigen zellulären Tumorapoptose in Verbindung gebracht worden (Ahmad et al., 2001). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Anwesenheit von Todesrezeptorliganden auf Thrombozyten mittels Western Blot untersucht. Wir haben FasL, jedoch nicht den Todesrezeptorliganden TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) in murinen Thrombozyten detektiert (Abbildung 19). Vorherige

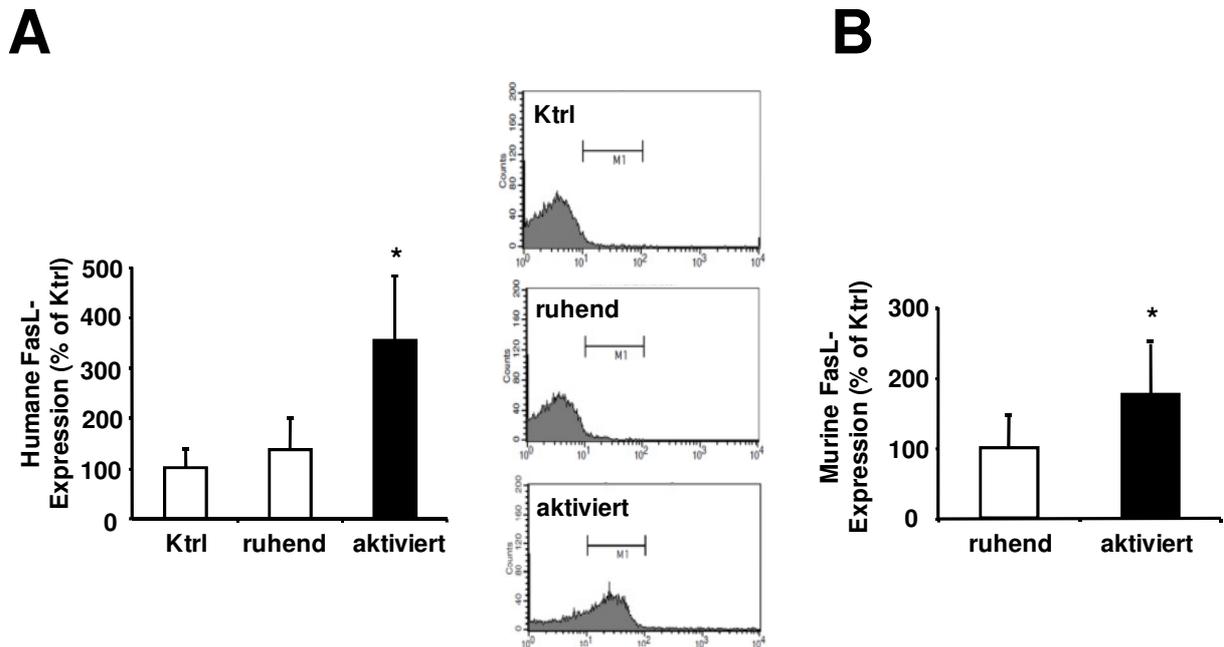
Thrombozytenaktivierung beeinflusste die Expression nicht (Abbildung 19). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 19: Thrombozyten exprimieren FasL.**

*Expression der Todesliganden FasL und TRAIL in ruhenden, ADP-aktivierten murinen Thrombozyten und Mausembryofibroblasten (MEFs) im Western Blot. Als Ladekontrolle diente Tom20. (Schleicher et al., 2015)*

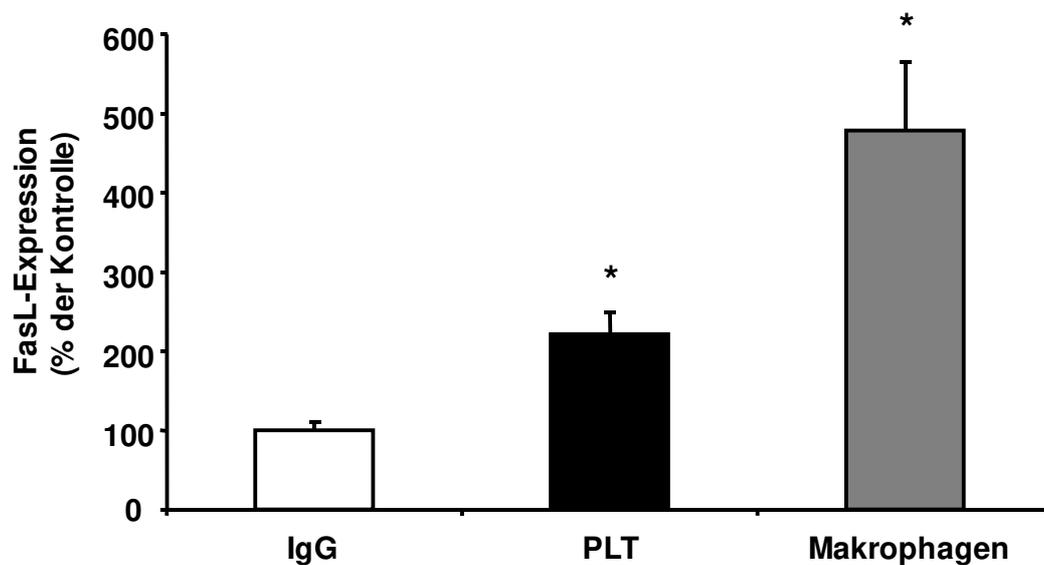
Im Gegensatz zu Fas, welches eine weitere Verteilung im Gewebe aufweist, beschränkt sich die Expression von FasL hauptsächlich auf einen Teil aktivierter T-Zellen, natürlicher Killer-T-Zellen und natürlicher Killerzellen (Aggarwal, 2003; Nagata, 1999). In FACS-Analysen konnten wir beobachten, dass ruhende humane Thrombozyten geringe Mengen FasL auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Aktivierung von Thrombozyten mit ADP bewirkte hingegen eine signifikante Hochregulierung von membranständigem FasL (Abbildung 20 A). Gleichzeitig konnten wir auch auf muriner Thrombozyten eine Hochregulation der FasL Oberflächenexpression in Folge einer ADP-Aktivierung beobachten (Abbildung 20 B). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 20: Aktivierung von Thrombozyten reguliert membrangebundenen FasL hoch.**

(A) Humanes Vollblut wurde mit ADP (aktiviert) oder Puffer (ruhend) stimuliert, mit PFA fixiert und im FACS analysiert. Die Eingrenzung von Thrombozyten erfolgte durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreuungseigenschaften. Die FasL-Expression wurde durch Verwendung eines PE-gekoppelten FasL Antikörpers analysiert. Die Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) dar und zeigen den Prozentsatz der IgG Kontrolle, welche die 100 % Kontrolle (Ktrl) repräsentiert. \* $P < 0,05$  vs. Ktrl (B) Murine Thrombozyten wurden mit ADP stimuliert und im FACS auf oberflächliche FasL-Expression untersucht. Die Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ) dar und zeigen den Prozentsatz der Kontrolle. Ruhende Thrombozyten repräsentieren die 100 % Kontrolle (Ktrl). \* $P < 0,05$  vs. Ktrl. (Schleicher et al., 2015)

Abbildung 21 zeigt das relative Expressionsniveau des FasL auf der Oberfläche muriner ADP-aktivierter Thrombozyten im Vergleich zu murinen CD11b-positiven Makrophagen (Schleicher et al., 2015).

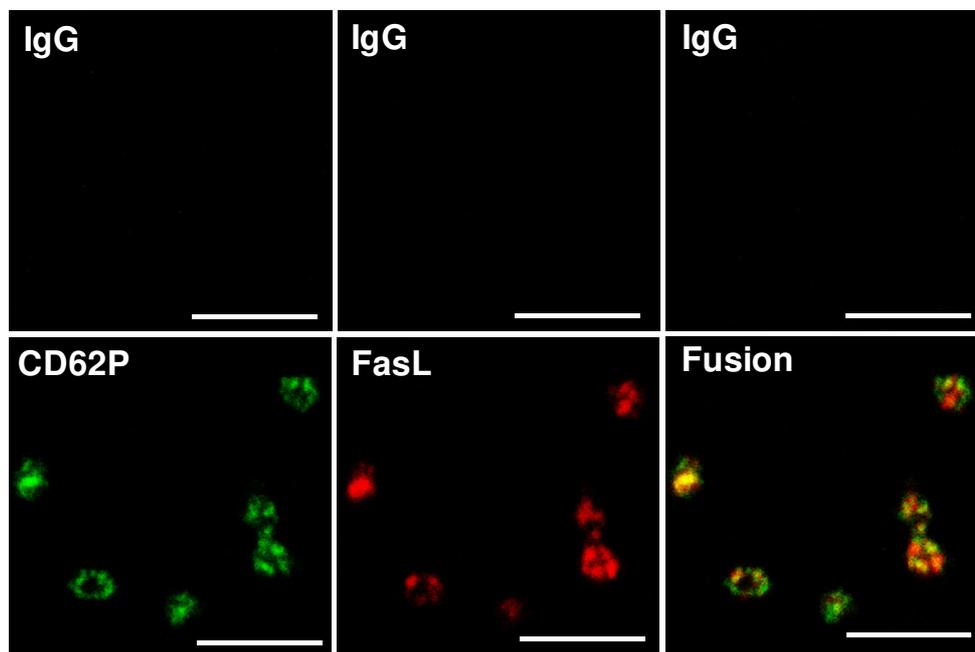


**Abbildung 21: Expression von FasL auf aktivierten Thrombozyten und Makrophagen.**

Murine ADP-aktivierte Thrombozyten und Makrophagen wurden isoliert und mit einem anti-FasL Antikörper oder einer IgG Kontrolle angefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung von Makrophagen mit einem anti-CD11b Antikörper als Myeloid-Marker. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM und zeigen den Prozentsatz der IgG Kontrolle, welche die 100 % Kontrolle dargestellt ( $n = 5$ ). \* $P < 0,05$  vs. IgG Kontrolle.

(Schleicher et al., 2015)

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der Proteingehalt von FasL in ruhenden und aktivierten Thrombozyten sich nicht verändert. In FACS-Analysen konnten wir beobachten, dass FasL in Folge einer Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche hochreguliert wird (Abbildung 20). Folgeversuche sollten nun über die Lokalisation bzw. den Speicherort von FasL im Thrombozyt Aufschluss geben. Eine konfokale Bildgebung zeigte teilweise eine Kolokalisation von FasL mit CD62P, was darauf hindeutet, dass FasL in Thrombozytengranula gelagert ist (Abbildung 22). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



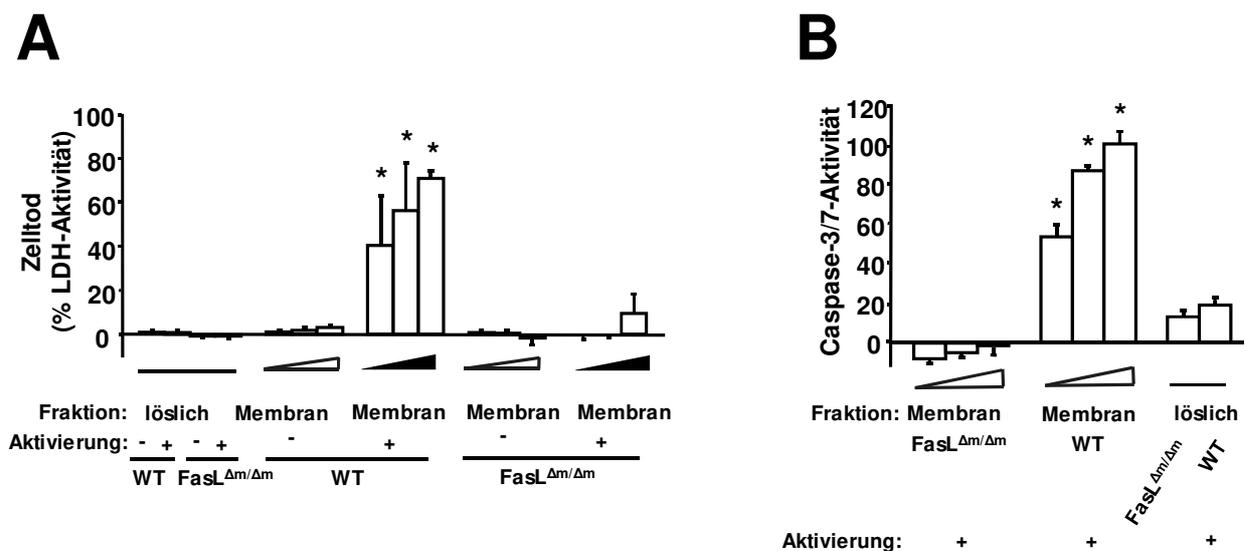
**Abbildung 22: Partielle Kolokalisation von FasL mit CD62P in Thrombozyten.**

Kofärbung humaner fixierter Thrombozyten mit dem alpha-Granula-Marker CD62P (grün) und FasL (rot). Das fusionierte Bild zeigt partielle Kolokalisation von FasL mit CD62P (Überlagerung in gelber Fluoreszenz). Die Färbung wurde im konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Maßstabbalken 5  $\mu\text{m}$ . (Schleicher et al., 2015)

### 3.4 Thrombozyten-induzierte Apoptose wird über membran-gebundenen FasL vermittelt

Um weiter den Einfluss des thrombozytären FasL zu evaluieren, haben wir Mäuse genutzt, welche für membrangebundenen aber nicht für löslichen FasL defizient sind (FasL <sup>$\Delta\text{m}/\Delta\text{m}$</sup> -Mäuse, (O' Reilly et al., 2009)). Die Auswirkung von Thrombozyten aus diesen und WT-Mäusen auf die Apoptoseinduktion in murinen Embryofibroblasten (MEFs) wurde analysiert. Interessanterweise induzierten die Membranproteinfraktionen von ADP-stimulierten WT-Thrombozyten stabil und konzentrationsabhängig Apoptose, während lösliche Proteinfraktionen oder Membranproteine von ruhenden Thrombozyten

keinen Zelltod auslösten (Abbildung 23 A). Im Gegensatz induzierten Membranproteine von ADP-stimulierten Thrombozyten aus FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen keine Apoptose in MEFs, gezeigt anhand der Messung der LDH-Freisetzung und Caspase-3/7-Aktivität (Abbildung 23 A und B). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

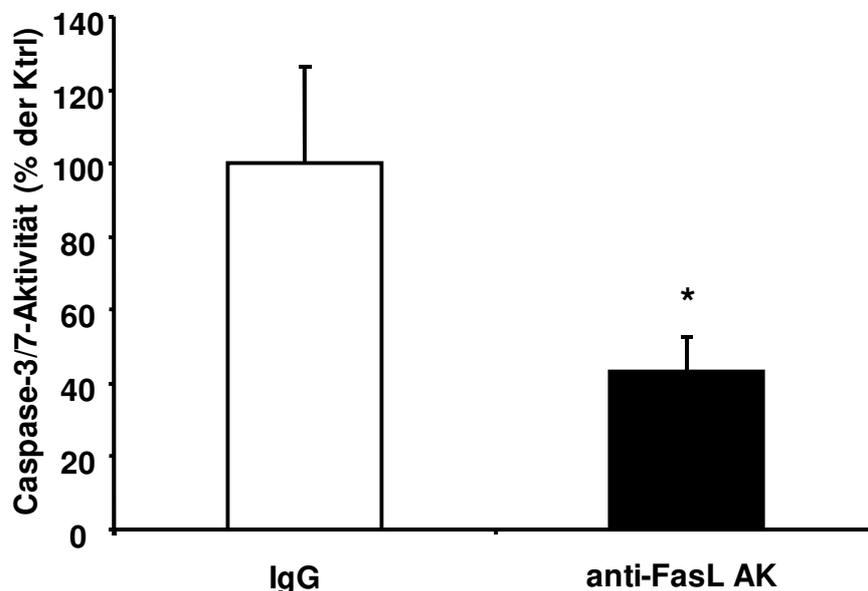


**Abbildung 23: Thrombozytenmembranproteine induzieren Apoptose mittels FasL.**

(A) MEFs wurden mit verschiedenen Membranproteinkonzentrationen (je  $4 \times 10^{-4}$ ;  $4,5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$  der Membranfraktion) von Puffer- (-) oder ADP-aktivierten (+) Thrombozyten aus Wildtyp- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen (bei denen der membrangebundene FasL fehlt) für 6 h inkubiert. Isolierte lösliche Proteine (lösliche Proteinfraction) von Puffer- oder ADP-stimulierten Thrombozyten aus WT- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen wurden in der Verdünnung  $5 \times 10^{-4}$  inkubiert. Anschließend wurde die LDH-Aktivität gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) und den Prozentsatz des gesamten zellulären LDH-Gehaltes unbehandelter Zellen. \* $P < 0,05$  vs. FasL<sup>Δm/Δm</sup>, löslicher oder Membranfraktion ruhender WT-Thrombozyten. (B) Caspase-3/7-Aktivitätskinetik in MEFs, welche 6 h mit verschiedenen Verdünnungen ( $4 \times 10^{-4}$ ;  $4,5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ) isolierter Membranproteinfractionen aus ADP-stimulierten

Thrombozyten von Wildtyp- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen inkubiert wurden. Isolierte lösliche Proteine (lösliche Fraktion) kamen in der Verdünnung 5 x 10<sup>-4</sup> zum Einsatz. Die Daten wurden jeweils auf die zugehörigen Proben ruhender Thrombozyten normalisiert. Sie zeigen den Prozentsatz der Kontrolle und stellen den Mittelwert ± SEM (n = 3) dar. \*P < 0,05 vs. FasL<sup>Δm/Δm</sup> oder löslicher Fraktionen. (Schleicher et al., 2015)

Thrombozyten, denen der membrangebundene FasL fehlt, können also keine Apoptose induzieren. Zusätzlich haben wir in einem *in vitro*-Versuch den thrombozytären FasL blockiert. Das Ergebnis war eine Inhibition der Thrombozytenmembranprotein-induzierten Apoptose in Zielzellen (Abbildung 24). Die Caspase-3/7-Aktivität der SH-SY5Y-Zellen war nach Stimulation mit thrombozytären Membranproteinen, die mit einem blockierenden anti-FasL Antikörper inkubiert wurden, im Vergleich zur Inkubation mit IgG behandelten Membranproteinen reduziert (Abbildung 24). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

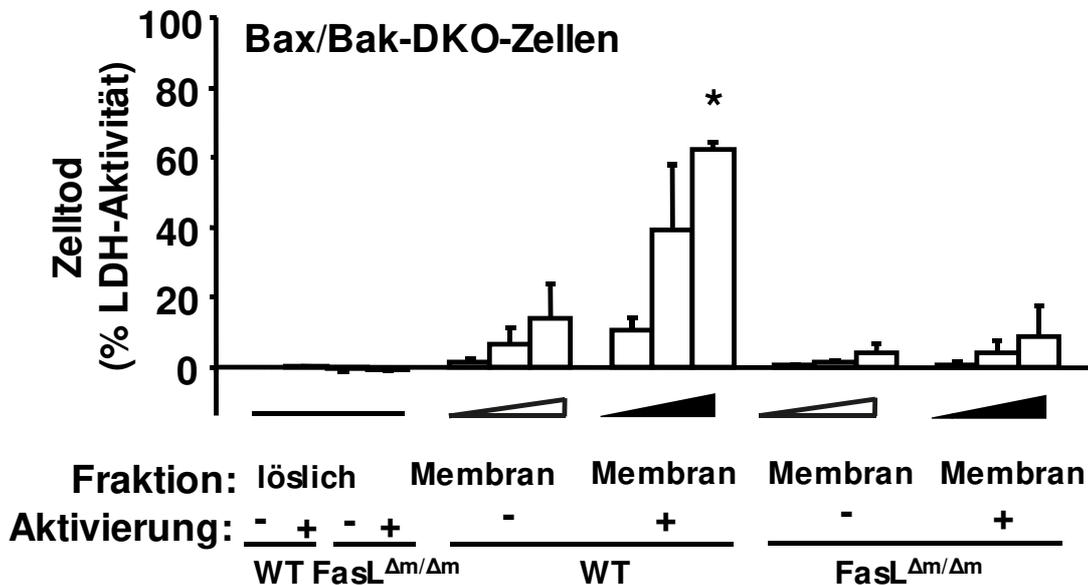


**Abbildung 24: Inhibition von FasL reduziert Thrombozytenmembranprotein-induzierte Apoptose.**

---

*Membranproteine von ADP-stimulierten Thrombozyten wurden isoliert und mit einem blockierenden anti-FasL Antikörper (AK) oder einer IgG Kontrolle inkubiert. Diese wurden jeweils in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-3}$  zu SH-SY5Y-Neuroblastomzellen gegeben und in diesen die Caspase-3/7-Aktivität gemessen. Die Daten zeigen den Prozentsatz der IgG Kontrolle (100 % gesetzt) und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. IgG Kontrolle. (Schleicher et al., 2015)*

Diese Ergebnisse zeigen, dass der auf Membranen ADP-stimulierter Thrombozyten exprimierte FasL Apoptose induziert. Dass zur Apoptoseinduktion FasL notwendig ist, brachte die Frage hervor, ob Thrombozyten-induzierte Apoptose ausschließlich durch den extrinsischen Apoptosesignalweg vermittelt wurde oder auch mitochondriale Signalwirkung in der Zielzelle involviert war. Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak können durch Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran Zellen verpflichten, in mitochondriale Apoptose zu gehen (Lindsten et al., 2000). Die Auswirkung mitochondrialer Apoptose auf Thrombozyten-induzierten Zelltod wurde durch Verwendung löslicher Proteine oder Membranproteinfraktionen von aktivierten oder ruhenden WT- oder FasL <sup>$\Delta m/\Delta m$</sup> -Thrombozyten auf Bax/Bak-Doppel-Knockout-MEFs (Bax/Bak-DKO-MEFs) untersucht. LDH-Aktivitätsmessungen zeigten eine stabile und konzentrationsabhängige Induktion von Zelltod durch Membranproteinfraktionen aktivierter Thrombozyten aus Wildtyp, jedoch nicht durch solche von FasL <sup>$\Delta m/\Delta m$</sup> -Mäusen (Abbildung 25). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

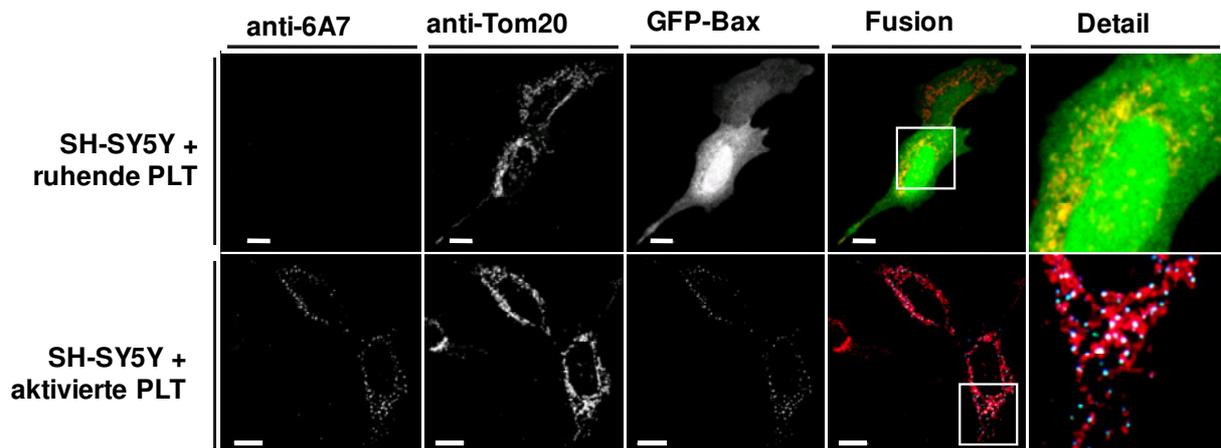


**Abbildung 25: Membranproteine aktivierter Thrombozyten induzieren mittels FasL Apoptose in Bax/Bak-DKO-Zellen.**

LDH-Aktivität wurde nach 6 h im Überstand von Bax/Bak-DKO-MEFs (bei denen eine mitochondriale Apoptose nicht möglich ist) gemessen. Diese Zellen wurden mit verschiedenen Membranproteinkonzentrationen (je  $4 \times 10^{-4}$ ;  $4,5 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$  der Membranfraktion) von ruhenden oder ADP-stimulierten Thrombozyten aus Wildtyp- oder FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen inkubiert. Lösliche Proteine (lösliche Fraktion) kamen in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  zum Einsatz. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) und den Prozentsatz der Gesamtmenge an zellulärem LDH unbehandelter Zellen. \* $P < 0,05$  vs. FasL<sup>Δm/Δm</sup>, löslicher Fraktion oder Membranfraktion ruhender WT-Thrombozyten. (Schleicher et al., 2015)

Anschließend exponierten wir GFP-Bax exprimierende SH-SY5Y-Zellen mit Thrombozyten und visualisierten in diesen mittels konfokaler Mikroskopie mitochondriale Apoptosesignalisierung. Nach Exposition mit ADP-stimulierten Thrombozyten translozierten apoptotische Zielzellen Bax zu den Mitochondrien. In

Anwesenheit ruhender Thrombozyten erfolgte keine Bax Translokation (Abbildung 26). Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).



**Abbildung 26: Thrombozyten aktivieren Bax.**

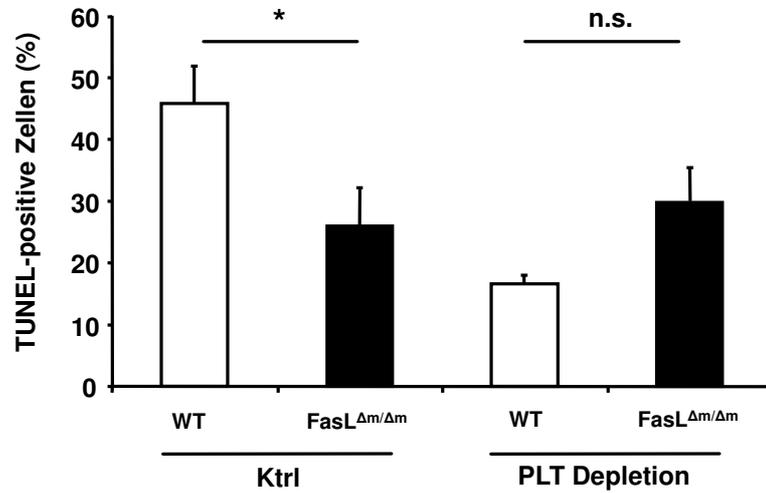
GFP-Bax transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden mit ruhenden (obere Reihe) oder ADP-stimulierten (untere Reihe) und PFA-fixierten Thrombozyten für sechs Stunden inkubiert. Das übereinander gelagerte Bild (Fusion) zeigt Kolokalisation der GFP-Bax Fluoreszenz (grün) mit der mitochondrialen Tom20 Färbung (rot) in gelber Fluoreszenz. Bax-Aktivierung wurde mit dem konformationsspezifischen anti-Bax Antikörper 6A7 detektiert. Kolokalisation von aktivem und mitochondrialem Bax ist in dem aufeinander gelagerten Bild jeweils in Cyan und Weiß aufgezeigt. Maßstabballen 10  $\mu\text{m}$ . (Schleicher et al., 2015)

Die Translokation und Aktivierung von Bax werden durch Anfärbung des konformationsspezifischen Bax Antikörpers 6A7 gezeigt. Sie sind zwei Kennzeichen der Bax-Aktivierung und mitochondrialen Apoptose. Diese Ergebnisse zeigen, dass Thrombozyten-induzierte Apoptose kein mitochondriales Signalisieren benötigt, jedoch Bax-Aktivität induzieren kann und so apoptotischen Zelltod steigert. Abschnitt siehe auch (Schleicher et al., 2015).

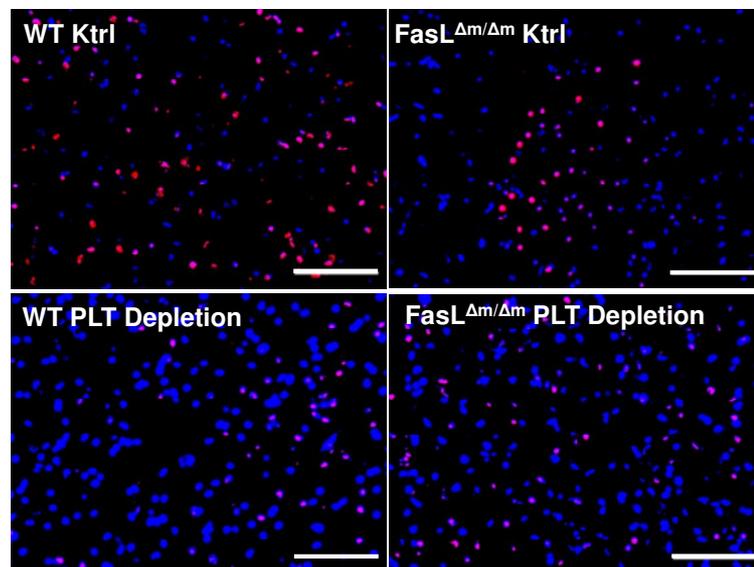
### **3.5 Thrombozytärer FasL induziert Apoptose *in vivo***

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle des thrombozytären FasL *in vivo*, haben wir bei FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen Schlaganfälle induziert und festgestellt, dass die Apoptose im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert war (Abbildung 27). Interessanterweise gab es zwischen FasL<sup>Δm/Δm</sup>- und Wildtyp-Mäusen in Abwesenheit von Thrombozyten keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl TUNEL-positiver apoptotischer Zellen (Abbildung 27). Dies zeigt, dass der thrombozytäre FasL an der Induktion von Apoptose beteiligt ist.

**A**



**B**



**Abbildung 27: Thrombozytärer FasL reguliert die Gewebeapoptose in vivo.**

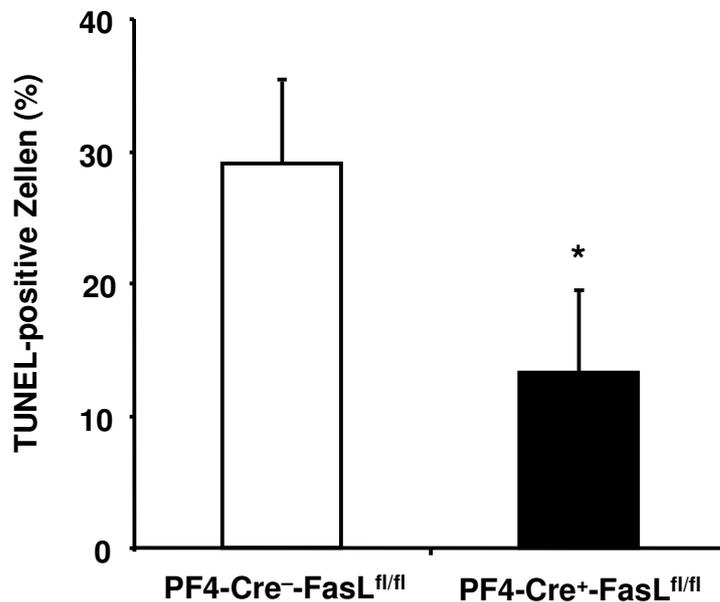
(A, B) FasL $\Delta m/\Delta m$ - oder Wildtyp-Mäuse wurden mit Kontroll- (Ktrl) oder Thrombozytendepletionsseren (PLT Depletion) behandelt. Ein Verschluss der mittleren

zerebralen Arterie, wie in Material und Methoden beschrieben, diente der Induktion eines Schlaganfalls. Zur Quantifizierung von Apoptose wurde in den Gehirnschnitten eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Neuronale Apoptose zeigt der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Zellen (pinke Fluoreszenz) zur Gesamtzellzahl pro Schnitt. Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$ , pro Tier wurden acht nicht aufeinanderfolgende Schnitte analysiert). \* $P < 0,05$  vs. WT-Kontrolle, n. s. = kein signifikanter Unterschied. **(B)** Repräsentative Bilder der analysierten Gewebeprobe.

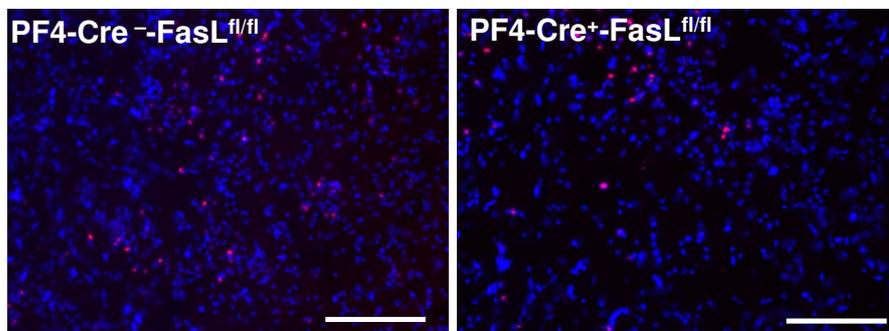
Des Weiteren bedienen wir uns eines *in vivo*-Modells mit FasL<sup>fl/fl</sup>-PF4-Cre-Mäusen, bei denen FasL spezifisch auf Thrombozyten ausgeschaltet ist. In FasL<sup>fl/fl</sup>-PF4-Cre-Mäusen wurde ein Schlaganfall induziert und beobachtet, dass Apoptose im Vergleich zu Cre-negativen Wurfgeschwistern (Kontrolle) reduziert war (Abbildung 28).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der thrombozytäre FasL eine Rolle in der Gewebeapoptose spielt. Beide Abschnitte siehe auch (Schleicher et al., 2015).

**A**



**B**



**Abbildung 28: Thrombozytärer FasL ist bei Gewebeapoptose in vivo beteiligt.**

(A, B) Es wurden PF4-Cre<sup>+</sup>-FasL<sup>fl/fl</sup>-Mäuse generiert und mittels tMCAO, wie in Material und Methoden beschrieben, ein Schlaganfall induziert. PF4-Cre<sup>-</sup>-FasL<sup>fl/fl</sup>-Mäuse (Wurfgeschwister) dienten als Kontrolle. In den Gehirnschnitten wurde Apoptose mittels TUNEL-Färbung quantifiziert. Neuronale Apoptose ist als prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellen (pink) von der Gesamtzellzahl pro Schnitt dargestellt. Die Anfärbung der

*Nuklei erfolgte mit DAPI (blau). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6$ , pro Tier wurden fünf nicht aufeinanderfolgende Schnitte analysiert) dar. \* $P < 0,05$  vs. Cre-negative Kontrolltiere. (B) Repräsentative Bilder der analysierten Gewebeschnitte. (Schleicher et al., 2015)*

## 4 Diskussion

Siehe zur folgenden Diskussion auch (Schleicher et al., 2015).

### 4.1 Thrombozyten und Apoptose

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer und inflammatorischer Krankheiten (Gawaz et al., 2005; Rondina et al., 2013). Trotz fataler Folgen und der weltweit häufigsten Todesursache kardiovaskulärer Erkrankungen (WHO) sind medikamentöse Therapiemöglichkeiten für Krankheiten wie beispielsweise einen Schlaganfall nicht zufriedenstellend (Lo et al., 2003; Vosler and Chen, 2009). Innovative Therapien hängen von der Aufklärung thrombozytärer Mechanismen ab.

Bei einer Verletzung von Gewebe sind Thrombozyten die ersten Zellen, welche die Wunde erreichen (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010). Sie werden aktiviert und initiieren den Heilungsprozess beispielsweise nach einem ischämischen Ereignis (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010), (Varga-Szabo et al., 2008). An Stellen von zerstörtem Gewebe können die Aktivierung von Thrombozyten und der programmierte Zelltod geschädigter Zellen in unmittelbarer Nähe und zur selben Zeit stattfinden. Die Apoptose dient der gezielten Eliminierung defekter Zellen, um die Intaktheit des Gewebes zu erhalten und Inflammation zu verhindern (Hotchkiss et al., 2009). Thrombozyten sind entscheidende Regulatoren der Gewebemöostase (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es naheliegend, dass zwischen Thrombozytenfunktion und Apoptose möglicherweise ein Zusammenhang besteht. In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, die im Folgenden diskutiert werden. Die Rolle von Thrombozyten in der Apoptose ist jedoch weitgehend unbekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht und charakterisiert werden.

## 4.2 Thrombozyten-induzierte Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnten wir im ischämischen Gehirngewebe von Mäusen, bei denen ein Schlaganfall induziert wurde, Thrombozyten außerhalb von Blutgefäßstrukturen beobachten. Sie sind aus der Blutbahn ausgetreten und in das Gewebe eingewandert. Einige von ihnen haben sich direkt an apoptotische Zellen gelagert. Krämer et al. weisen darauf hin, dass Thrombozyten die Fähigkeit besitzen mobil zu werden, durch Endothel transmigrieren und in das Gewebe eindringen können (Kraemer et al., 2010; Schmidt et al., 2012). Des Weiteren ist vorstellbar, dass Thrombozyten nach einem Schlaganfall leicht aus der Blutbahn treten, da im ischämischen Gewebe pathologische Mechanismen dazu führen, dass Blutgefäße undicht werden (Kraft et al., 2013a; Langhauser et al., 2012).

Ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten und apoptotischem Zelltod wurde bestätigt, denn eine Depletion von Thrombozyten im Schlaganfallmodell reduzierte die Gewebeapoptose *in vivo*. Es wird angenommen, dass inflammatorische Prozesse Thrombozyten veranlassen Gewebeschäden zu verstärken (Gawaz et al., 2005; Langer et al., 2012). Deshalb haben wir uns einem inflammationsunabhängigen retinalen *in vivo*-Apoptoseinduktionsmodell bedient, das Gewebeapoptose nach Thrombozytendepletion ebenfalls beträchtlich herabsetzte. Das verwendete Depletionsserum reduzierte Thrombozyten effizient, ohne die Leukozytenzahl zu beeinflussen. Jedoch könnte es unbekannte Effekte verursachen. Aus diesem Grund wurden für weitere Versuche GPIIb/IIIa-defiziente Mäuse, die eine starke Thrombozytopenie aufweisen verwendet. Dadurch konnten mögliche Nebeneffekte ausgeschlossen werden, da das Thrombozytendepletionsserum nicht eingesetzt werden musste. Bei diesen Mäusen war die Gewebeapoptose nach Schlaganfallinduktion im Vergleich zu Kontrollmäusen ebenfalls reduziert. Thrombozyten sind also *in vivo* unabhängig von Inflammation bei der Apoptose involviert.

### 4.3 Apoptoseinduktion in Zellen

Wie zu erwarten war *in vitro* zelluläre Apoptose nachweisbar, wenn Zielzellen direkt mit aktivierten Thrombozyten in Kontakt treten konnten. Entsprechend zu den *in vivo*-Modellen war die Thrombozytenaktivierung eine Voraussetzung zur Induktion von Apoptose. Dabei schien es irrelevant zu sein, welche Thrombozytenstimulanzien benutzt wurden. Die Aktivierung von Thrombozyten mit TRAP, Thrombin oder ADP erzielten gleiche Resultate. Es ist denkbar, dass bei Gewebeschäden oder krankhaften Prozessen unterschiedliche Einflüsse Thrombozyten aktivieren, mit dem Ziel Apoptose in Gang zu setzen.

Thrombozyten-induzierte Apoptose war sowohl konzentrationsabhängig als auch zellspezifisch. Je höher die Konzentration aktivierter Thrombozyten bzw. dessen Membranproteine und je mehr FasL Moleküle mit Zielzellen interagieren konnten, desto höher war die Apoptoserate. Nach sechs Stunden Inkubation war Caspase-3/7-Aktivität in den Zielzellen nachweisbar. Nachdem Caspasen aktiv sind, verliert die Zelle im weiteren Apoptoseverlauf ihre Asymmetrie, worauf die Annexin V Färbung beruht (Koopman et al., 1994; Martin et al., 1995). Entsprechend erfolgte die Detektion apoptotischer Annexin V positiver Zellen nach einer längeren Inkubationszeit. Zum Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung werden markierte Nukleotide an die DNA-Bruchstellen angelagert (Kyrylkova et al., 2012). Dementsprechend benötigte die Detektion apoptotischer Zellen eine längere Inkubationszeit mit Zielzellen, da im Apoptosesignalweg die DNA-Fragmentierung zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet (Hotchkiss et al., 2009).

HeLa-Zellen begaben sich nach Inkubation mit stimulierten Thrombozyten nicht in Apoptose. Vorherige Studien zeigen, dass HeLa-Zellen eine Fas-abhängige Apoptose durchlaufen können (Alaoui-El-Azher et al., 2006; Pallepati and Averill-Bates, 2011; Tran et al., 2003). Der Einfluss von Thrombozyten auf andere Zellen hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem Zelltyp, der Verteilung oberflächlicher Rezeptoren und den Umgebungsbedingungen ab (Gawaz and Vogel, 2013). Je nach Zelltyp und Verletzung kann außerdem eine bestimmte Form des Zelltods dominieren (Hotchkiss et

al., 2009). Es wäre interessant in weiteren Untersuchungen in den zur Apoptosestudie verwendeten Zellen die Expression des Fas-Rezeptors zu analysieren. Die zellspezifische Thrombozyten-induzierte Apoptose und ihre Mechanismen bleiben zu untersuchen.

#### **4.4 Thrombozytärer FasL und dessen Regulierung**

In einer vorherigen Studie wurde in aktivierten Thrombozyten FasL detektiert, der mit einer Fas-abhängigen zellulären Tumorapoptose in Verbindung gebracht wurde (Ahmad et al., 2001). In Übereinstimmung damit konnten wir in FACS-Analysen auf der Membranoberfläche von Thrombozyten FasL messen. Die Oberflächenexpression wurde nach Aktivierung von Thrombozyten hochreguliert.

Weitere *in vitro*-Experimente zeigten, dass isolierte Membranproteine aktivierter Thrombozyten Apoptose induzieren, jedoch weder Membranproteine ruhender Thrombozyten, noch ihre löslichen Proteinfractionen. Des Weiteren reduzierten Thrombozytenmembranproteine mit blockiertem FasL, als auch solche von FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen (bei welchen der membrangebundene FasL fehlt) im Vergleich zu Membranproteinen aus WT-Thrombozyten mit freiem FasL, die Caspase-3/7-Aktivität in Zielzellen. Die Apoptose wurde mit einem blockierenden FasL Antikörper um ca. 50 % inhibiert. So ist anzunehmen, dass noch andere thrombozytäre Rezeptoren oder freigesetzte Stoffe bei der Induktion von Apoptose eine Rolle spielen. In Boyden-Kammer-Experimenten war apoptotischer Zelltod nicht nachweisbar, wenn Thrombozyten und Zielzellen ausschließlich über das Medium in Kontakt treten konnten. Der Überstand aktivierter Thrombozyten konnte also keine Apoptose auslösen. Apoptoseinduktion war nur möglich, wenn Thrombozyten und Zielzellen im gleichen Kompartiment inkubiert wurden und so in direkten Kontakt traten. Für T-Zellen wurde belegt, dass nur die membrangebundene und nicht die lösliche Form von FasL Apoptose auslöst (O' Reilly et al., 2009). Tanaka et al. zeigten, dass die lösliche Form von FasL bei der Vermittlung von Apoptose in Fas-positiven Zellen unwirksam ist (Tanaka et al., 1998). Es wird vermutet, dass eine Metalloproteinase FasL in seine lösliche Form spaltet und diese die Fas-vermittelte Apoptose inhibiert (Tanaka et al.,

1998). In unseren Studien konnten wir eine Apoptoseinduktion *in vitro* feststellen, wenn Thrombozyten 5 min stimuliert und dann fixiert wurden. Ahmad und Kollegen haben beobachtet, dass aktivierte unfixierte Thrombozyten nicht so effektiv Apoptose vermitteln konnten als fixierte Thrombozyten (Ahmad et al., 2001). Möglicherweise regulieren Thrombozyten in gleicher Weise die Apoptose durch Freisetzung von membrangebundenem FasL herunter (Ahmad et al., 2001).

Des Weiteren haben wir die Anwesenheit von Todesrezeptorliganden in Thrombozyten untersucht. Wir konnten FasL jedoch nicht den Todesrezeptorligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) im Western Blot detektieren. Interessanterweise gab es keinen Unterschied der FasL Proteinmenge in aktivierten und ruhenden Thrombozyten, was darauf hindeutet dass FasL im Thrombozyten gespeichert wird. Dementsprechend konnten wir in Immunfluoreszenzfärbungen eine partielle Kolokalisation des in thrombozytären  $\alpha$ -Granula gelagerten P-Selektins mit FasL beobachten und so feststellen, dass FasL zumindest teilweise in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert wird. Wir haben in FACS-Analysen nach Aktivierung von Thrombozyten eine Hochregulierung von FasL auf ihrer Membranoberfläche beobachtet. Deshalb ist anzunehmen, dass eine Aktivierung die Freisetzung von FasL aus den  $\alpha$ -Granula bewirkt und ihn direkt an die thrombozytäre Membranoberfläche transportiert.

FasL wird in T-, NK- und NKT-Zellen exprimiert (Aggarwal, 2003; Kaufmann et al., 2012; Nagata, 1999). Studien legen nahe, dass in diesen Zellen der FasL in speziellen zytoplasmatischen Granula gespeichert und nach Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert wird (Aggarwal, 2003; Bossi and Griffiths, 1999; Kaufmann et al., 2012; Nagata, 1999). Thrombozyten lagern etliche immunologisch wichtige Moleküle und Cytokine, wie beispielsweise P-Selektin und CD40L in ihren zytoplasmatische Granula und translozieren es nach Aktivierung an die Oberfläche (Gawaz et al., 2005; Henn et al., 1998; Li et al., 2012). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich mit FasL im Thrombozyten ähnlich verhält.

#### 4.5 Thrombozytenaktivierung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Thrombozytenaktivierung eine Voraussetzung für die Exposition von FasL auf der Membran ist und so für die Induktion von Apoptose. Dies wiederum verhindert konstitutive Apoptoseinduktion und somit unkontrollierten Gewebeschaden. Diese Auffassung stimmt mit vorherigen *in vitro* Beobachtungen, dass Thrombozyten Apoptose in Endothelzellen induzieren können, überein (Kuckleburg et al., 2008; Semple, 2008). Obwohl bei den Untersuchungen die Voraussetzung der Thrombozytenaktivierung ebenfalls beobachtet wurde, war in diesen *in vitro*-Studien der endotheliale Zelltod nicht von FasL abhängig. Die physiologische Funktion der FasL-unabhängigen Apoptose, die durch aktive Thrombozyten induziert wird, bleibt weiterhin zu charakterisieren. Interessanterweise haben Arabanian und Kollegen gezeigt, dass aktivierte Megakaryozyten membrangebundenen FasL exprimieren (Arabanian et al., 2012). Jedoch blieb seine Funktion unklar.

#### 4.6 Thrombozyten-beeinflusste Apoptosesignalwege

Thrombozyten haben auf vielfältige Weise einen Einfluss auf verschiedene Mechanismen und interagieren mit unterschiedlichen Zellen (Gawaz and Vogel, 2013). Studien zeigen, dass Thrombozyten die anti-Tumor Reaktivität von natürlichen Killerzellen modulieren (Placke et al., 2011). Die Untersuchungen von Placke und Kollegen legen nahe, dass Thrombozyten an metastasierenden Tumorzellen adhären und aus ihren Granula Wachstumsfaktoren sowie Cytokine und Chemokine freisetzen (Placke et al., 2011). Anschließend beeinflussen Thrombozyten mit membrangebundenen, immunregulierenden Molekülen natürliche Killerzellen in ihrer Funktion, eine Tumorausbreitung zu verhindern (Placke et al., 2011).

Unsere Ergebnisse zeigen eine durch aktivierte Thrombozyten induzierte Apoptose in humanen und murinen Zellen. Darüber hinaus haben wir in unseren Studien beobachtet, dass FasL nach Aktivierung von Thrombozyten auf deren Zellmembran exprimiert wird und innerhalb von sechs Stunden in Zielzellen Apoptose induziert. Die Voraussetzung der membrangebundenen Form von FasL wurde bereits für T-Zellen

bewiesen (O' Reilly et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass die membrangebundene Form von FasL die Aggregation von Fas Trimeren auf der abgezielten Plasmamembran triggert und so die Initiation der Caspase-8-abhängigen Todesrezeptor-vermittelten Apoptose in der Zielzelle auslöst (Hohlbaum et al., 2000; Huang et al., 1999; Srinivasula et al., 1996). Caspase-8-abhängige Aktivierung des BH3-only-Proteins Bid induziert mitochondriale Apoptosesignalisierung und steigert so die Apoptoseantwort durch Aktivierung des Todesrezeptors (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Somit führte die Thrombozyten-induzierte Apoptose zur Translokation von Bax in humanen Neuroblastomzellen. Und bei Bax/Bak-DKO-MEFs war im Vergleich zu Wildtyp-MEFs die Thrombozyten-abhängige Apoptoseinduktion reduziert. Demnach wird die Thrombozyten-induzierte Apoptose in Säugetierzellen und murinen Modellen mit Gewebeverletzung durch mitochondriale Signalwirkung beschleunigt, die Zielzelle ist aber nicht von diesem Signalweg abhängig.

#### 4.7 Apoptoseinduktion *in vivo*

Eine bedeutende Reduktion der Gewebeapoptose nach Thrombozytendepletion konnte sowohl beim tMCAO-induzierten Zelltod als auch bei der NMDA-induzierten retinalen Apoptose beobachtet werden. Interessanterweise gab es nach Thrombozytendepletion bei FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Anstieg an apoptotischen Zellen. Dies deutet auf komplexe regulatorische Netzwerke hin. Möglicherweise werden derzeit unbekannt regulatorische Mechanismen in der Abwesenheit von Thrombozyten aktiviert. In FasL<sup>fl/fl</sup>-PF4-Cre-Mäusen, bei denen FasL spezifisch in Thrombozyten ausgeschaltet ist, war die Apoptose nach Schlaganfallinduktion im Vergleich zu Kontrollmäusen ebenfalls reduziert. Diese Ergebnisse weisen nach, dass der thrombozytäre FasL *in vivo* einen Beitrag in der Gewebeapoptose leistet. Die Thrombozyten-induzierte Apoptose erscheint in den verwendeten Modellen diffus, was möglicherweise darauf hindeutet, dass Zielzellen bevor oder nachdem sie in Apoptose gehen, lösliche Faktoren wie Cytokine und Chemokine freilassen (Cullen et al., 2013; Spencer et al., 2009). Neben der Induktion von Apoptose wurde suggeriert, dass der Fas-Signalweg die Produktion

von Cytokinen und Chemokinen fördert, was wiederum die Immunantwort in Richtung Apoptose stimuliert (Cullen et al., 2013). Möglicherweise induziert der Thrombozyten-abhängige Fas-Signalweg Apoptose und die effiziente Entfernung geschädigter Zellen, um die Intaktheit des Gewebes wiederherzustellen. Darüber hinaus ist im Hirninfarktmodell eine diffuse Kontaktfläche zwischen Thrombozyten und dem Gewebe vorstellbar, da während eines Schlaganfalls mehrere Pathomechanismen dazu führen, dass Blutgefäße, insbesondere die Mikrozirkulation undicht werden (Kraft et al., 2013a; Langhauser et al., 2012). Die Beobachtung der Thrombozyten-induzierten Apoptose stellt mit Sicherheit einen vielversprechenden Startpunkt für zukünftige Studien dar.

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass nach einer viralen Infektion im Auge die FasL-abhängige Apoptose schädliche inflammatorische Antworten verhindert (Griffith et al., 1995). Unsere Ergebnisse suggerieren, dass Thrombozyten nicht nur bei der Apoptoseantwort nach einem Zellschaden in der Retina, sondern potenziell auch in anderen Geweben eine wichtige Rolle spielen. Sie liefern möglicherweise auch Gründe für die Beteiligung von Thrombozyten in der Pathogenese einer multiplen Sklerose (Langer et al., 2012). Ahmad et al. vermuten, dass Thrombozyten auch bei der Entstehung von Krankheiten wie AIDS oder Krebs, bei welchen Thrombozyten konstitutiv aktiviert werden, bedeutend sind (Ahmad et al., 2001).

### **4.8 Fazit und Therapieansätze**

Thrombozyten regulieren sehr komplexe Mechanismen der Gewebereparatur und interagieren mit verschiedenen Zellen (Gawaz and Vogel, 2013). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Atherogenese und Entstehung kardiovaskulärer sowie inflammatorischer Erkrankungen (Gawaz et al., 2005; Rondina et al., 2013). Die Thrombozyten-induzierte Apoptose nimmt in den verschiedenen Prozessen, bei denen Thrombozyten aktiv sind, vermutlich einen entscheidenden Einfluss.

#### 4.8.1 Thrombozyten-beeinflusste Mechanismen

Eine pathophysiologische Situation mit Thrombozytenaktivierung ist bei einer Verletzung von Endothel oder Gewebe gegeben, bei der Thrombozyten als erste Zellen die Wunde erreichen und aktiviert werden (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010). Unsere Ergebnisse suggerieren, dass Thrombozyten, neben ihren klassischen Funktionen die Wiederherstellung der Gewebeintaktheit zu initiieren (Andrews et al., 1997; Klinger and Jelkmann, 2002) und der langfristigen Förderung regenerativer Mechanismen (Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010), auch einen Beitrag in der Gewebeapoptose leisten. Im Gegensatz zur unkontrollierten Gewebeschädigung ist der programmierte Zelltod ein wichtiger Mechanismus vielzelliger Organismen zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Fuchs and Steller, 2011; Galluzzi et al., 2012; Hotchkiss et al., 2009; Mc Guire et al., 2011; Youle and van der Bliek, 2012). Die Thrombozyten-induzierte Apoptose bewirkt nach einer Gewebsverletzung vermutlich eine kontrollierte Wundheilung (Hotchkiss et al., 2009; Walker et al., 1988). Sie verhindert im traumatisierten Gewebe nekrotische und inflammatorische Prozesse mit möglichen langfristigen Schäden (Hotchkiss et al., 2009; Walker et al., 1988). Clark und Kollegen (Clark et al., 2007) fanden im Zusammenhang mit Sepsis heraus, dass die Interaktion von Thrombozyten mit Neutrophile in Anwesenheit von LPS Endothelschäden herbeiführen kann. In dieser Studie wurde die Schädigung von Zellen anhand der Aufnahme von Propidiumiodid gemessen, jedoch keine Apoptose des Endothels bestimmt (Clark et al., 2007).

Sharron und Kollegen zeigten, dass Thrombozyten bei einer Sepsis mittels Granzym B Apoptose in Milz und Lunge auslösen können (Sharron et al., 2012). Die Apoptoseinduktion war kontaktabhängig und wurde durch die Blockierung des thrombozytären GPIIb/IIIa Rezeptors inhibiert (Sharron et al., 2012). Gambim et al. fanden heraus, dass bei septischen Patienten durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies thrombozytäre Mikropartikel starke Apoptosen in Endothelzellen induzieren können (Gambim et al., 2007). Thrombozyten scheinen also bei vaskulären Dysfunktionen beteiligt zu sein (Gambim et al., 2007). Weitere Studien zeigten eine wesentliche Steigerung der Fas-induzierten Endothelapoptose durch bestimmte pathologische

Stimuli (Aoudjit and Vuori, 2001). Des Weiteren erhöht die Anwesenheit von oxidiertem LDL die Expression von Fas auf Endothelzellen und damit die FasL-induzierte Apoptose (Sata and Walsh, 1998). Die Fas induzierte Endothelzellapoptose ist ein charakteristisches Kennzeichen einer fortgeschrittenen Artherosklerose (Filippatos et al., 2004). Die Apoptose von Endothelzellen, aber auch anderer Zellen wie glatter Muskelzellen und Immunzellen ist bei der Artherogenese bedeutend und kann durch oxidativen Stress gesteigert werden (Choy et al., 2001; Filippatos et al., 2004). In verschiedenen Studien konnten in atherosklerotischen Plaques erhöhte Apoptoseraten beobachtet (Filippatos et al., 2004), sowie eine gesteigerte Expression proapoptotischer Proteine, wie Fas und Bax nachgewiesen werden (Choy et al., 2001; Filippatos et al., 2004). Außerdem ist die Interaktion von Thrombozyten und Endothel bei allen Stadien der Atherosklerose involviert (Siegel-Axel and Gawaz, 2007). Thrombozyten und Endothelzellen kommunizieren auf verschiedene Ebenen miteinander, vermutlich auch über Rezeptor-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion (Siegel-Axel and Gawaz, 2007). Demzufolge nehmen Thrombozyten durch FasL-induzierte Apoptose auf die beschriebenen Geschehnisse vermutlich einen Einfluss.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Ahmad und Kollegen (Ahmad et al., 2001) zeigen, dass humane aktivierte Thrombozyten FasL enthalten und in Fas-positiven humanen Tumorzellen Apoptose induzieren. Die bisher unbeachteten Prozesse der Thrombozyten-induzierten Apoptose könnten unkontrollierten Zelltod und damit einen negativen Gewebeumbau, mit potenziell interessanten klinischen Auswirkungen, verhindern. Obwohl Hirninfarkte verheerend sind, sind die Therapiemöglichkeiten ischämischer Schlaganfälle bisher sehr limitiert und weniger als 5 % der Patienten erhalten innerhalb des engen Zeitfensters nach Einsetzen der Symptome ein Gerinnsel auflösendes Medikament (Lo et al., 2003; Vosler and Chen, 2009). So stellt der Fokus auf den Prozess der neuronalen Apoptose in der Penumbra (unzureichend durchblutetes aber rettbares Gewebe, welches den Primärfarkt umgibt), das für Stunden bis Tage nach einer Ischämie anhält, vermutlich einen vielversprechenden Zugang dar. So könnte langfristig die Gewebeumgestaltung moduliert werden (Lo et al., 2003; Tymianski, 2011). Die Aufklärung der Mechanismen,

wie Thrombozyten die initialen Ereignisse nach einer Gefäß- oder Gewebeverletzung zur Wiederherstellung der Gewebefunktion vermitteln, können realisierbare Therapien für Schlaganfälle oder andere Krankheiten mit Thrombozytenaktivierung liefern.

#### **4.8.2 Antithrombotische Therapie**

Antithrombotische Therapieoptionen zur Vermeidung ischämischer Ereignisse werden derzeit stark diskutiert. Der Einsatz antithrombotischer Substanzen wird hauptsächlich aufgrund unerwünschter Blutungsrisiken limitiert, was die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen erheblich beeinflusst (Dewilde et al., 2010; Moser et al., 2014). Viele Herzpatienten benötigen eine kombinierte antithrombotische Behandlung, die aus einem Antikoagulans und einer Inhibition der Thrombozytenfunktion besteht (Moser et al., 2014). Studien zeigen, dass Dreifachtherapien, bestehend aus einer blutgerinnungshemmenden Substanz und zweier antithrombozytärer Medikamente, erhöhte Blutungsraten nach sich ziehen (Dewilde et al., 2010; Doyle et al., 2009; Moser et al., 2014). Derzeit ist die optimale Kombination eines Blutgerinnungshemmers mit einer anti-Thrombozytentherapie nicht bekannt (Moser et al., 2014). Ziel ist es das Blutungsrisiko zu reduzieren, ohne ischämische Ereignisse zu erhöhen (Moser et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Potenzial für solche schwer therapierbare Erkrankungen. Spezifischere Medikamente mit größerer Therapiesicherheit könnten negative Thrombozyteneffekte gezielt blockieren, ohne ihre positiven Eigenschaften zu beeinträchtigen. Des Weiteren wäre es möglich, anti-thrombozytäre Wirkstoffe breiter anzuwenden, da verschiedene, besonders inflammatorische Krankheiten wesentlich durch Thrombozyten beeinflusst werden (Gawaz et al., 2005; Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Nachman and Rafii, 2008; Ruggeri, 2002; Ruggeri and Mendolicchio, 2007; Stellos et al., 2010; Varga-Szabo et al., 2008). Neuartige Medikamente könnten die Geweberemodellierung nach Verletzung und Inflammation positiv beeinflussen.

Die vorliegenden Ergebnisse der Thrombozyten-induzierten Apoptose und die Aufklärung weiterer thrombozytenassoziierter Mechanismen liefern Grundlagen für neue therapeutische und diagnostische Ansätze. Diese ermöglichen eine bessere Behandlung kardiovaskulärer, inflammatorischer (Gawaz et al., 2005) und anderer Erkrankungen mit Thrombozytenaktivierung.

## 5 Zusammenfassung

Fas-Ligand (FasL), ein Apoptose induzierendes Mitglied der TNF-Familie, kommt als lösliches und membrangebundenes Protein vor, wobei nur Letzteres für die Fas-induzierte Apoptose verantwortlich ist (O' Reilly et al., 2009). Thrombozyten tragen zur Geweberemodellierung bei (Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010), jedoch ist ihre Rolle für die Apoptose bisher weitgehend unverstanden.

Wir konnten bestätigen, dass aktivierte Thrombozyten auf ihrer Oberfläche FasL exprimieren (Ahmad et al., 2001). Sowohl aktivierte Thrombozyten als auch deren Membranbestandteile induzierten konzentrationsabhängig und zellspezifisch Apoptose in primären murinen Neuronen, humanen Neuroblastomzellen und Mausembryofibroblasten (MEFs). Dagegen vermittelten ruhende Thrombozyten, ihre Membranbestandteile oder lösliche thrombozytäre Proteinfractionen keine Apoptose. Sie konnte auch nicht durch Membranfraktionen von Thrombozyten, bei denen der oberflächlich gebundene FasL (FasL<sup>Δm/Δm</sup>) fehlt, ausgelöst werden. Mitochondriale Apoptosesignalisierung durch Aktivierung von Bax und Bak war für Thrombozyten-induzierte Apoptose nicht absolut notwendig, verstärkte aber den von Thrombozyten ausgelösten Apoptosesignalweg via Fas.

*In vivo* reduzierte die Depletion von Thrombozyten Apoptose in einem Schlaganfallmodell und einem N-Methyl-D-Asparaginsäure(NMDA)-induzierten retinalen Apoptosemodell mit geringem Level an Inflammation.

Darüber hinaus wurde die Reduktion der Apoptose in FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in Abwesenheit von Thrombozyten aufgehoben. Ebenso zeigen Experimente mit Thrombozyten-spezifischen FasL<sup>fl/fl</sup>-PF4-Cre-Mäusen eine Rolle des thrombozytären FasL in der Gewebeapoptose. Die Apoptose verhindert nach einer Verletzung eine Inflammation. Unsere Beobachtungen beschreiben also einen neuen Mechanismus, wie Thrombozyten zur Gewebemöostase beisteuern könnten. Zur Zusammenfassung siehe auch (Schleicher et al., 2015).

## 6 Summary

After tissue injury, both wound sealing and apoptosis contribute to restoration of tissue integrity and functionality. Although the role of platelets for wound closure and induction of regenerative processes is well established (Klinger and Jelkmann, 2002; Langer and Gawaz, 2008b; Stellos et al., 2010), the knowledge about their contribution to apoptosis is incomplete.

Here, we confirm that platelets present the death receptor Fas ligand (FasL) on their surface after activation (Ahmad et al., 2001). Activated platelets as well as their membrane fraction induced apoptosis in a dose-dependent manner in primary murine neuronal cells, human neuroblastoma cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). In contrast resting platelets, their membrane component, soluble protein fraction or membrane protein from platelets lacking membrane-bound FasL (FasL<sup>Δm/Δm</sup>) failed to induce apoptosis. Bax/Bak-mediated mitochondrial apoptosis signalling in target cells was not required for platelet-induced cell death, but increased the apoptotic response to platelet-induced Fas signalling. *In vivo*, platelet depletion significantly reduced apoptosis in a stroke model and an inflammation-independent model of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-induced retinal apoptosis.

Furthermore, reduction of apoptosis in FasL<sup>Δm/Δm</sup> mice compared to wild type mice was abolished in the absence of platelets. Experiments using platelet specific PF4 cre FasL<sup>fl/fl</sup> mice demonstrated also a role of platelet-derived FasL for tissue apoptosis. Since apoptosis secondary to injury prevents inflammation, our findings describe a novel mechanism how platelets could contribute to tissue homeostasis.

Summary see also (Schleicher et al., 2015).

## 7 Literaturverzeichnis

This research was originally published in *Blood*. Schleicher RI, Reichenbach F, Kraft P, Kumar A, Lescan M, Todt F, Göbel K, Hilgendorf I, Geisler T, Bauer A, Olbrich M, Schaller M, Wesselborg S, O' Reilly L, Meuth SG, Schulze-Osthoff K, Gawaz M, Li X, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood*. 2015;126(12):1483-93. © the American Society of Hematology.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Ahmad, R., Menezes, J., Knafo, L., and Ahmad, A. (2001). Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J Leukoc Biol* 69, 123-128.

Alaoui-El-Azher, M., Jia, J., Lian, W., and Jin, S. (2006). ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis through a Fas receptor/caspase 8-independent pathway in HeLa cells. *Cell Microbiol* 8, 326-338.

Andrews, R.K., Lopez, J.A., and Berndt, M.C. (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 91-105.

Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24, 2096-2103.

Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 152, 633-643.

Arabianian, L.S., Kujawski, S., Habermann, I., Ehninger, G., and Kiani, A. (2012). Regulation of fas/fas ligand-mediated apoptosis by nuclear factor of activated T cells in megakaryocytes. *Br J Haematol* 156, 523-534.

Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643-2652.

Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23, 177-189.

Boillard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., *et al.* (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580-583.

Bossi, G., and Griffiths, G.M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5, 90-96.

Burkhart, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120, e73-82.

Choy, J.C., Granville, D.J., Hunt, D.W., and McManus, B.M. (2001). Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1673-1690.

Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., *et al.* (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-469.

Cullen, S.P., Henry, C.M., Kearney, C.J., Logue, S.E., Feoktistova, M., Tynan, G.A., Lavelle, E.C., Leverkus, M., and Martin, S.J. (2013). Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells. *Mol Cell* 49, 1034-1048.

Dewilde, W., Verheugt, F.W., Breet, N., Koolen, J.J., and Ten Berg, J.M. (2010). 'Ins' and 'outs' of triple therapy: Optimal antiplatelet therapy in patients on chronic oral anticoagulation who need coronary stenting. *Neth Heart J* 18, 444-450.

Doyle, B.J., Rihal, C.S., Gastineau, D.A., and Holmes, D.R., Jr. (2009). Bleeding, blood transfusion, and increased mortality after percutaneous coronary intervention: implications for contemporary practice. *J Am Coll Cardiol* 53, 2019-2027.

Earnshaw, W.C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7, 337-343.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104-116.

Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J.C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol* 143, 217-224.

Filippatos, G., Ang, E., Gidea, C., Dincer, E., Wang, R., and Uhal, B.D. (2004). Fas induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells in vitro. *BMC Cell Biol* 5, 6.

Frojmovic, M.M., and Milton, J.G. (1982). Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev* 62, 185-261.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742-758.

Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 277-300.

Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., *et al.* (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16, 1093-1107.

Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. (2012). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111, 1198-1207.

Gambim, M.H., do Carmo Ade, O., Marti, L., Verissimo-Filho, S., Lopes, L.R., and Janiszewski, M. (2007). Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care* 11, R107.

Gawaz, M., Langer, H., and May, A.E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.

Gawaz, M., and Vogel, S. (2013). Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood* 122, 2550-2554.

George, J.N. (2000). Platelets. *Lancet* 355, 1531-1539.

Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12, 264–265.

Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109-1112.

Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192.

Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., and Kroccek, R.A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-594.

Herrmann, A.M., Gobel, K., Simon, O.J., Melzer, N., Schuhmann, M.K., Stenner, M.P., Weishaupt, A., Kleinschnitz, C., Bittner, S., Meuth, P., *et al.* (2010). Glatiramer acetate attenuates pro-inflammatory T cell responses but does not directly protect neurons from inflammatory cell death. *Am J Pathol* 177, 3051-3060.

Hohlbaum, A.M., Moe, S., and Marshak-Rothstein, A. (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* 191, 1209-1220.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *N Engl J Med* 361, 1570-1583.

Huang, D.C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., and Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14871-14876.

Jackson, S.P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 17, 1423-1436.

Jurk, K., and Kehrel, B.E. (2008). [The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation]. *Dtsch Med Wochenschr* 133, 1130-1135.

Jurk, K., and Kehrel, B.E. (2010). [Pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Der Internist* 51, 1086, 1088-1092, 1094.

Kam, P.C., and Ferch, N.I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081-1093.

Kaufmann, T., Strasser, A., and Jost, P.J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* 19, 42-50.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Gobel, K., Schuhmann, M.K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., *et al.* (2013). Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 121, 679-691.

Klinger, M.H., and Jelkmann, W. (2002). Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 22, 913-922.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.

Kraemer, B.F., Borst, O., Gehring, E.M., Schoenberger, T., Urban, B., Ninci, E., Seizer, P., Schmidt, C., Bigalke, B., Koch, M., *et al.* (2010). PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Mol Med (Berl)* 88, 1277-1288.

Kraft, P., Gob, E., Schuhmann, M.K., Gobel, K., Deppermann, C., Thielmann, I., Herrmann, A.M., Lorenz, K., Brede, M., Stoll, G., *et al.* (2013a). FTY720 ameliorates

acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection. *Stroke* 44, 3202-3210.

Kraft, P., Schwarz, T., Gob, E., Heydenreich, N., Brede, M., Meuth, S.G., and Kleinschnitz, C. (2013b). The Phosphodiesterase-4 Inhibitor Rolipram Protects from Ischemic Stroke in Mice by Reducing Blood-Brain-Barrier Damage, Inflammation and Thrombosis. *Exp Neurol*. 247, 80-90.

Kuckleburg, C.J., Tiwari, R., and Czuprynski, C.J. (2008). Endothelial cell apoptosis induced by bacteria-activated platelets requires caspase-8 and -9 and generation of reactive oxygen species. *Thromb Haemost* 99, 363-372.

Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., and Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 887, 41-47.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Langer, H.F., Choi, E.Y., Zhou, H., Schleicher, R., Chung, K.J., Tang, Z., Gobel, K., Bdeir, K., Chatzigeorgiou, A., Wong, C., *et al.* (2012). Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ Res* 110, 1202-1210.

Langer, H.F., Chung, K.J., Orlova, V.V., Choi, E.Y., Kaul, S., Kruhlak, M.J., Alatsatianos, M., DeAngelis, R.A., Roche, P.A., Magotti, P., *et al.* (2010). Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood* 116, 4395-4403.

Langer, H.F., and Gawaz, M. (2008a). Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 99, 480-486.

Langer, H.F., and Gawaz, M. (2008b). Platelets in regenerative medicine. *Basic Res Cardiol* 103, 299-307.

Langer, H.F., Stellos, K., Steingen, C., Frohofer, A., Schonberger, T., Kramer, B., Bigalke, B., May, A.E., Seizer, P., Muller, I., *et al.* (2009). Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 47, 315-325.

Langhauser, F., Gob, E., Kraft, P., Geis, C., Schmitt, J., Brede, M., Gobel, K., Helluy, X., Pham, M., Bendszus, M., *et al.* (2012). Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood* 120, 4082-4092.

Li, C., Li, J., Li, Y., Lang, S., Yougbare, I., Zhu, G., Chen, P., and Ni, H. (2012). Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol* 2012, 384685.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., Lennartsson, J., Zhu, C., Qu, Y., Fang, C., *et al.* (2008). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J Clin Invest* 118, 913-923.

Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154, 485-490.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of

proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 44, 517-531.

Lo, E.H., Dalkara, T., and Moskowitz, M.A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4, 399-415.

Lonsdorf, A.S., Kramer, B.F., Fahrleitner, M., Schonberger, T., Gnerlich, S., Ring, S., Gehring, S., Schneider, S.W., Kruhlak, M.J., Meuth, S.G., *et al.* (2012). Engagement of alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) with alpha5 beta1 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J Biol Chem* 287, 2168-2178.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Mabrouk, I., Buart, S., Hasmim, M., Michiels, C., Connault, E., Opolon, P., Chiochia, G., Levi-Strauss, M., Chouaib, S., and Karray, S. (2008). Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells. *Immunity* 29, 922-933.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.

Mc Guire, C., Beyaert, R., and van Loo, G. (2011). Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci* 34, 619-628.

Moser, M., Olivier, C.B., and Bode, C. (2014). Triple antithrombotic therapy in cardiac patients: more questions than answers. *Eur Heart J* 35, 216-223.

Nachman, R.L., and Rafii, S. (2008). Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med* 359, 1261-1270.

Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33, 29-55.

Nieswandt, B., Pleines, I., and Bender, M. (2011). Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1, 92-104.

OECD indicators: Organization for Economic Cooperation and Development. Health at a glance 2007.

O' Reilly, L.A., Tai, L., Lee, L., Kruse, E.A., Grabow, S., Fairlie, W.D., Haynes, N.M., Tarlinton, D.M., Zhang, J.G., Belz, G.T., *et al.* (2009). Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 461, 659-663.

Pallepati, P., and Averill-Bates, D.A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 50, 667-679.

Placke, T., Kopp, H.G., and Salih, H.R. (2011). Modulation of natural killer cell anti-tumor reactivity by platelets. *J Innate Immun* 3, 374-382.

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.

Rondina, M.T., Weyrich, A.S., and Zimmerman, G.A. (2013). Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res* 112, 1506-1519.

Ruggeri, Z.M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234.

Ruggeri, Z.M., and Mendolicchio, G.L. (2007). Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100, 1673-1685.

Sata, M., and Walsh, K. (1998). Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102, 1682-1689.

Schleicher, R.I., Reichenbach, F., Kraft, P., Kumar, A., Lescan, M., Todt, F., Gobel, K., Hilgendorf, I., Geisler, T., Bauer, A., *et al.* (2015). Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood* 126, 1483-1493.

This research was originally published in *Blood*. Schleicher RI, Reichenbach F, Kraft P, Kumar A, Lescan M, Todt F, Göbel K, Hilgendorf I, Geisler T, Bauer A, Olbrich M, Schaller M, Wesselborg S, O' Reilly L, Meuth SG, Schulze-Osthoff K, Gawaz M, Li X, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood*. 2015;126(12):1483-93. © the American Society of Hematology.

Schmidt, E.M., Kraemer, B.F., Borst, O., Munzer, P., Schonberger, T., Schmidt, C., Leibrock, C., Towhid, S.T., Seizer, P., Kuhl, D., *et al.* (2012). SGK1 sensitivity of platelet migration. *Cell Physiol Biochem* 30, 259-268.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.

Semple, J.W. (2008). Platelets play a direct role in sepsis-associated endothelial cell death. *Thromb Haemost* 99, 249.

Sharron, M., Hoptay, C.E., Wiles, A.A., Garvin, L.M., Geha, M., Benton, A.S., Nagaraju, K., and Freishtat, R.J. (2012). Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS One* 7, e41549.

Shattil, S.J., Cunningham, M., and Hoxie, J.A. (1987). Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70, 307-315.

Siddiqui, T.I., Anil Kumar, K.S., and Dikshit, D.K. (2013). Platelets And Atherothrombosis: Causes, Targets And Treatments For Thrombosis. *Curr Med Chem* 20, 2779-2797.

Siegel-Axel, D.I., and Gawaz, M. (2007). Platelets and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost* 33, 128-135.

Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., and Lenardo, M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.

Spencer, S.L., Gaudet, S., Albeck, J.G., Burke, J.M., and Sorger, P.K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428-432.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14486-14491.

Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt Fachserie 12 Reihe 4. 2008 und 2013. Ref.-Typ: Magazin-Artikel.

Stellos, K., Kopf, S., Paul, A., Marquardt, J.U., Gawaz, M., Huard, J., and Langer, H.F. (2010). Platelets in regeneration. *Semin Thromb Hemost* 36, 175-184.

Stellos, K., Sauter, R., Fahrleitner, M., Grimm, J., Stakos, D., Emschermann, F., Panagiota, V., Gnerlich, S., Perk, A., Schonberger, T., *et al.* (2012). Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2017-2020.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.

Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., and Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4, 31-36.

Tran, S.E., Meinander, A., Holmstrom, T.H., Rivero-Muller, A., Heiskanen, K.M., Linnau, E.K., Courtney, M.J., Mosser, D.D., Sistonen, L., and Eriksson, J.E. (2003). Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 1137-1147.

Tymianski, M. (2011). Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nat Neurosci* 14, 1369-1373.

Varga-Szabo, D., Pleines, I., and Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 403-412.

Von Bruchhausen, F., and Walter, U. (1997). Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology. Springer Verlag. Ref.-Typ: Buch.

Vosler, P.S., and Chen, J. (2009). Potential molecular targets for translational stroke research. *Stroke* 40, S119-120.

Voss, M., Lettau, M., Paulsen, M., and Janssen, O. (2008). Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell communication and signaling : CCS* 6, 11.

Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C., and Kerr, J.F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18-54.

Ware, J., Russell, S., and Ruggeri, Z.M. (2000). Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2803-2808.

WHO Media Centre, Fact sheet 310 on the top 10 causes of death (online). Updated May 2014.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062-1065.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen des Zelltods: Apoptose, Nekrose und Autophagozytose.. .....	14
Abbildung 2: Zelluläre Signalwege der Apoptose.....	16
Abbildung 3: In gesunden Zellen (links) werden Bax und Bcl-xl konstant an die Mitochondrien und wieder zurück in das Zytosol transloziert. ....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Typ-II-Membranproteins FasL nach (Voss et al., 2008). ....	20
Abbildung 5: Thrombozyten befinden sich im ischämischen Hirngewebe außerhalb von Blutgefäßen. ....	51
Abbildung 6: Thrombozyten in direkter Nachbarschaft zu apoptotischen Zellen im ischämischen Gewebe. ....	52
Abbildung 7: Thrombozytendepletion reduziert Apoptose im murinen Schlaganfallmodell in vivo. ....	53
Abbildung 8: Thrombozyten werden effizient depletiert.....	54
Abbildung 9: Färbung von apoptotischen Zellen (TUNEL) in thrombozytopenischen GPIIb $\alpha$ -defizienten Mäusen nach Schlaganfallinduktion. ....	56
Abbildung 10: Thrombozytendepletion reduziert NMDA-induzierte Apoptose von retinalen Neuronen in vivo.....	57
Abbildung 11: Thrombozyten induzieren konzentrationsabhängig und zellspezifisch Apoptose. ....	59
Abbildung 12: Kontrolle der Thrombozytenaktivierung durch Messung der P-Selektin- Expression.....	60
Abbildung 13: Thrombozyten induzieren Zellapoptose – gemessen mittels TUNEL- Färbung.....	61
Abbildung 14: Membranproteine von aktivierten Thrombozyten induzieren Apoptose. 63	

Abbildung 15: Thrombozyten, stimuliert mit verschiedenen Aktivatoren, induzieren Apoptose. ....	64
Abbildung 16: Apoptoseinduktion durch Thrombozyten im direkten Kontakt mit der Zielzelle oder in getrennten Kompartimenten. ....	66
Abbildung 17: Induktion zellulärer Caspase-3/7-Aktivität durch Membranproteine aktivierter Thrombozyten. ....	67
Abbildung 18: Membranproteine aktivierter Thrombozyten induzieren Apoptose in primären murinen Neuronen. ....	68
Abbildung 19: Thrombozyten exprimieren FasL. ....	69
Abbildung 20: Aktivierung von Thrombozyten reguliert membrangebundenen FasL hoch. ....	70
Abbildung 21: Expression von FasL auf aktivierten Thrombozyten und Makrophagen. ....	71
Abbildung 22: Partielle Kolokalisation von FasL mit CD62P in Thrombozyten. ....	72
Abbildung 23: Thrombozytenmembranproteine induzieren Apoptose mittels FasL. ....	73
Abbildung 24: Inhibition von FasL reduziert Thrombozytenmembranprotein-induzierte Apoptose. ....	74
Abbildung 25: Membranproteine aktivierter Thrombozyten induzieren mittels FasL Apoptose in Bax/Bak-DKO-Zellen. ....	76
Abbildung 26: Thrombozyten aktivieren Bax. ....	77
Abbildung 27: Thrombozytärer FasL reguliert die Gewebeapoptose in vivo. ....	79
Abbildung 28: Thrombozytärer FasL ist bei Gewebeapoptose in vivo beteiligt. ....	81

---

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

ACD	acid-citrate dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovines serum albumin
°C	Grad Celsius
c-FLIP	cellular FLICE inhibitory protein
CKI	Casein Kinase I
Cu	Kupfer
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
DKO	Doppel-Knockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FCS	fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GFP	green fluorescence protein
GP	Glycoprotein
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution

HCl	Salzsäure
hu	human
i. p.	intraperitoneal
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
IgG	Immunglobulin G
Ktrl	Kontrolle
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
mM	Millimolar
MEFs	Mausembryofibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
n. s.	nicht signifikant
NeuN	neuronal nuclei
NK	natürliche Killerzellen
NKT	natürliche Killer-T-Zelle
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
OMM	outer mitochondrial membrane
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARs	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline mit Tween 20
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLT	Thrombozyten
PRD	prolin-reiche-Domäne
PRP	plättchenreiches Plasma

---

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SA	Selbstassemblierung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
STS	Staurosporin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THD	TNF-Homologie-Domäne
TM	Transmembranregion
tMCAO	transient middle cerebral artery occlusion
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAP	thrombin receptor activating peptide
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labeling
Tween 20	Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat
TxA2	Thromboxan A2
U	units
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VE	vollentsalzt
vs.	versus
VWF	von-Willebrand Faktor
w/v	weight per volume
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

### **8.3 Beteiligte und deren Anteil an gemeinschaftlichen Arbeiten**

Frank Reichenbach und Franziska Todt vom Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Universität Freiburg haben mit den von mir isolierten Thrombozyten den Western Blot (Abbildung 19) sowie Dr. Frank Edlich die Bax Translokationsstudie (Abbildung 26) ausgeführt. Aus den Thrombozyten haben sie Membranproteine isoliert und damit Zellexperimente (Abbildung 14, 17, 23, 25) durchgeführt.

Franziska Todt beabsichtigte Teile dieser Daten in ihrer Dissertation zu verwenden. Der Stand der Veröffentlichung ist mir nicht bekannt.

Dr. Peter Kraft aus der Abteilung für Neurologie am Universitätsklinikum Würzburg hat bei den Mäusen Schlaganfälle induziert.

Dr. Anil Kumar vom „National Eye Institute“ (USA) hat das retinale NMDA-Modell durchgeführt.

Dr. Dr. Sven Meuth und Dr. Kerstin Göbel aus der Neuropathophysiologie der Universität Münster haben mit den von mir isolierten Thrombozytenmembranproteinen Apoptose an primären Neuronen untersucht.

## 8.4 Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen:

Kraft P, Schleicher R, Olbrich M, Blanz KD, Hilgendorf I, Meuth SG, Edlich F, Kleinschnitz C, Langer HF. Platelet derived FasL contributes to apoptosis in stroke. Revision in „Thrombosis and Haemostasis“, 2016.

Die wesentlichen Daten der vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Fachzeitschrift „Blood“ veröffentlicht:

**Schleicher RI**, Reichenbach F, Kraft P, Kumar A, Lescan M, Todt F, Göbel K, Hilgendorf I, Geisler T, Bauer A, Olbrich M, Schaller M, Wesselborg S, O' Reilly L, Meuth SG, Schulze-Osthoff K, Gawaz M, Li X, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. **Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL**. Blood. 2015 Sep 17;126(12):1483-93.

Patzelt J, Mueller KA, Breuning S, Karathanos A, **Schleicher R**, Seizer P, Gawaz M, Langer HF, Geisler T. Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. Atherosclerosis. 2015 Feb;238(2):289-295.

Willecke F, Tiwari S, Rupprecht B, Wolf D, Hergeth S, Hoppe N, Dufner B, Schulte L, Anto Michel N, Bukosza N, Marchini T, Jäckel M, Stachon P, Hilgendorf I, Zeschky K, **Schleicher R**, Langer HF, von Zur Muhlen C, Bode C, Peter K, Zirlik A. Interruption of classic CD40L-CD40 signalling but not of the novel CD40L-Mac-1 interaction limits arterial neointima formation in mice. Thromb Haemost. 2014 Aug;112(2):379-89.

Seizer P, Klingel K, Sauter M, Westermann D, Ochmann C, Schönberger T, **Schleicher R**, Stellos K, Schmidt EM, Borst O, Bigalke B, Kandolf R, Langer H, Gawaz M, May AE. Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 2012 Jul;53(1):6-14.

Langer HF, Choi EY, Zhou H, **Schleicher R**, Chung KJ, Tang Z, Göbel K, Bdeir K, Chatzigeorgiou A, Wong C, Bhatia S, Kruhlak MJ, Rose JW, Burns JB, Hill KE, Qu H, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Wang Y, Simon DI, Nieswandt B, Lambris JD, Li X, Meuth SG, Kubes P, Chavakis T. Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ Res.* 2012 Apr 27;110(9):1202-10.

Borisova M, **Schleicher R**, Schütt J, von Aulock S: Conditioned Supernatant from LPS Stimulated PBMCs Induces Epithelial-to-mesenchymal Transition in A549 cells. In preparation.

### **Kongressbeiträge:**

**Schleicher R**, Kraft P, Kumar A, Rett E, Schulze-Osthoff K, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Role of platelets in tissue apoptosis. Vortrag, KardioWIND Meeting, Schloß Haigerloch, 10. März 2012.

Sauter R, Fahrleitner M, Krämer B, **Schleicher R**, Gawaz M, Langer HF. Complement receptor C3aR modulates platelet function - intersection between innate immunity and hemostasis. Vortrag, Young Investigator Award, experimentell, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2012.

**Schleicher R**, Kraft P, Kumar A, Rett E, Schulze-Osthoff K, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Platelet derived FasL - potential role in tissue apoptosis. Poster, 1st International Platelet Meeting, Tübingen, Oktober 2012.

Patzelt J, Nording H, **Schleicher R**, Persicke T, Gekeler S, Emschermann F, Gawaz M, Langer HF. Paracrine inhibition of angiogenesis by platelets via interaction with macrophages. *Clin Res Cardiol* 102, Suppl 1, April 2013. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2013.

Sauter R, Fahrleitner M, **Schleicher R**, Krämer B, Borst O, Gawaz M, Kraft P, Kleinschnitz C, Lambris JD, Langer HF. Anaphylatoxinreceptor C3aR on platelets contributes to arterial thrombosis - intersection between innate immunity and thrombosis. Clin Res Cardiol 102, Suppl 1, April 2013. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2013.

**Schleicher R**, Reichenbach F, Kraft P, Kumar A, Lescan M, Todt F, Göbel K, Geisler T, Bauer A, Wesselborg S, O' Reilly L, Meuth SG, Schulze-Osthoff K, Gawaz M, Li X, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Thrombozyten induzieren Apoptose über membrangebundenen Fas-Ligand. Poster, Jahrestagung DGAF 13. - 15. März 2014 Gießen, Schloss Rauschholzhausen.

**Schleicher R**, Reichenbach F, Kraft P, Kumar A, Lescan M, Todt F, Göbel K, Geisler T, Bauer A, Wesselborg S, O' Reilly L, Meuth SG, Schulze-Osthoff K, Gawaz M, Li X, Kleinschnitz C, Edlich F, Langer HF. Membrangebundener thrombozytärer Fas-Ligand (FasL) induziert Apoptose *in vitro* und *in vivo*. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2014.

Nording H, Patzelt J, Emschermann F, **Schleicher R**, Gekeler S, Gawaz M, Lambris JD, Langer HF. Parakrine Inhibition von Angiogenese getriggert durch thrombozytär exprimierten Anaphylatoxin-Rezeptor C5aR. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 2014.

## 8.5 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Jun.-Prof. Dr. Harald Langer für das spannende Thema, die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen sowie das fortwährende Interesse an meiner Arbeit, die entscheidend zum Erfolg mit veröffentlichungsreifen Ergebnissen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für die Übernahme der Betreuung und des Zweitgutachtens sowie das kritische Durchleuchten meiner Forschungsarbeit.

Für die gelungene Kooperation und gute Zusammenarbeit möchte ich mich herzlich bei Dr. Frank Edlich, Frank Reichenbach, Dr. Kerstin Göbel und Dr. Anil Kumar bedanken. Dr. Peter Kraft danke ich für die Durchführung des Schlaganfallmodells.

Besonders danke ich Sarah Gekeler für ihre kontinuierliche und stets freundliche Unterstützung im Labor. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Labor-Atmosphäre und Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Ich bedanke mich bei Birgit Fehrenbacher für die Aufnahmen der konfokalen Mikroskopbilder.

Ein Dank geht an Prof. Dr. Schulze-Osthoff für die Zurverfügungstellung des blockierenden FasL-Antikörpers.

Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz danke ich für die Zurverfügungstellung der Laborräumlichkeiten.

Danke an Prof. Dr. Andreas Strasser und Dr. Lorraine O' Reilly für die Lieferung der FasL<sup>Δm/Δm</sup>-Mäuse sowie an Prof. Dr. Ana Martin-Villalba für das Zuverfügungstellen der FasL<sup>fl/fl</sup>-Mäuse.

Ich danke meinen Eltern und Geschwister für ihr offenes Ohr und die Aufmunterungen in schwierigen Phasen.

Ganz besonders danke ich Thorsten für seine unermüdliche Unterstützung und Geduld während den Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit sowie für sein fortwährendes Vertrauen und den stetigen Rückhalt, den er mir gibt.