

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Martinistraße 52

D-20246 Hamburg

Prof. Dr. rer. nat. Aymelt Itzen

Wirkung von Inositolphosphaten auf die Blutgerinnung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Nina Martine Erdmann
aus Hamburg

Hamburg 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.03.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Sabine Windhorst

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Maria Brehm

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Inositolphosphate	1
1.1.1	Aufbau	1
1.1.2	FAM-InsP ₅	2
1.1.3	Vorkommen	2
1.1.4	Biosynthese	3
1.1.5	Biologische Funktion	5
1.2	Blutgerinnung	7
1.2.1	Zelluläre Akteure von Blutgerinnung und Wundheilung	7
1.2.2	Klassisches Modell der Blutgerinnung	8
1.2.3	Zellbasiertes Modell der Blutgerinnung	11
1.2.4	Antithrombotische Mechanismen	13
1.2.5	Wundheilung	14
1.3	Inositolphosphate und Blutgerinnung	16
1.4	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Vebrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Zelllinien	22
2.1.5	Medien und Lösungen für die Zellkultur	22
2.1.6	Puffer und Lösungen	23
2.1.7	Software	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Verwendete InsPs	24
2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	24
2.2.3	Zellkultur	26
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.5	Gewinnung und Reinigung der Thrombozyten	27
2.2.6	Aufreinigung der Erythrozyten	28
2.2.7	Zell-Adhäsions-Analyse von FAM-InsP ₅	28

2.2.8	FAM-InsP ₅ -Aufnahme durch Fluoreszenzphotometrie	29
2.2.9	Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay	30
2.2.10	Cone and Plate(let) Analysis (CPA)	31
2.2.11	Messung der Thrombin-Bildung (CAT)	33
2.2.12	Life-Cell-Imaging (LCI)	34
2.2.13	Fibrinpolymerisierung mit (FAM-)InsP ₅ und Thrombozyten .	35
2.2.14	Aufnahmekapazität von FAM-InsP ₅ in RAW264.7-Makrophagen	35
2.2.15	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	InsPs beeinflussen die Thrombozytenaggregatgröße	36
3.2	InsPs aktivieren Thrombozyten weder direkt noch indirekt	37
3.3	Die aggregatfördernde Wirkung der InsPs ist Fibrinogen- vermittelt .	41
3.4	Adhäsion und Phagozytose von InsPs durch Makrophagen	43
3.5	Makrophagen verhindern eine InsP-vermittelte Aggregation	46
4	Diskussion	50
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
4.2	Diskussion der Ergebnisse	50
4.2.1	Einfluss der InsPs auf die Thrombozytenaggregation	50
4.2.2	Wirkung auf die Fibrinpolymerisierung	51
4.2.3	Einfluss von Makrophagen und Fibroblasten auf die InsP ₆ -vermit- telte Thrombozytenaggregation	55
4.2.4	Fazit	56
4.3	Ausblick	56
5	Zusammenfassung	59
6	Summary	60
7	Sicherheit und Entsorgung	61
8	Anhang	62
9	Eidesstattliche Versicherung	78

1 Einleitung

Die Blutgerinnung (Hämostase) bildet ein komplexes wie auch fragiles Gleichgewicht. Jede Veränderung kann sowohl zu starkem Blutverlust im Falle einer Verletzung als auch zu einer Gerinnselbildung (als Thrombose bzw. Embolie) mit Folgeschäden führen. Bislang sind viele Faktoren bekannt, die die Blutgerinnung beeinflussen. In den letzten Jahren sind zunehmend phosphathaltige Moleküle in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses getreten. Inzwischen werden Polyphosphate als mögliche Medikamente zur Blutverdünnung (Antikoagulation) pharmakologisch getestet (Smith et al., 2012; Travers et al., 2014). Bislang wenig beachtet blieb dabei eine Molekülgruppe: die der Inositolphosphate.

1.1 Inositolphosphate

1.1.1 Aufbau

Inositolphosphate sind Derivate des zyklischen Alkohols Inositol (Cis-1,2,3,5-trans-4,6-Cyclohexanhexol, $C_6H_{12}O_6$) (IUPAC, 2018; Shears, 2015). Hierbei ist an jedes der sechs Kohlenstoffatome eine Hydroxylgruppe gebunden. Zur Vereinfachung wird gemäß der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) die Abkürzung „Ins“ verwendet, in Verbindung mit Phosphatgruppen ist jedoch auch ein „I“ geläufig (IUPAC, 2018). Von den insgesamt neun möglichen Stereoisomeren ist das Myo-Inositol die am häufigsten in lebenden Zellen zu findende Form (Thota und Bhandari, 2015). Neben der Haworth-Projektion (Abb. 1a) ist die Sesselkonfiguration (Abb. 1b) eine geläufige Form der Darstellung. Hierbei steht die OH-Gruppe an Position 2 als einzige axial, alle anderen Gruppen sind äquatorial gelegen. Zur besseren Veranschaulichung der sterischen Lage der OH-Gruppen wird oft die „Agranoff’sche Schildkröte“ (Agranoff, 2009) zitiert; hierbei bilden die äquatorialen OH-Gruppen Vorder- und Hinterbeine sowie den Schwanz einer Schildkröte, währenddessen die axiale OH-Gruppe an C2 den Kopf darstellt (Abb. 1c).

Durch elektrophile Addition einer bestimmten Anzahl an Phosphatgruppen an die Hydroxylgruppen des Inositols entsteht aus dem Zucker Inositol ein Inositolphosphat ($InsP_n$). Durch Bindung von Monophosphaten können InsPs mit bis zu sechs Phosphatgruppen gebildet werden ($InsP_6$), durch Bindung von Pyrophosphat entstehen InsPs mit bis zu acht Phosphatresten ($InsP_7$ und $InsP_8$) (L. Stephens et al., 1993). Zur

Synthese siehe Abschnitt 1.1.4. Die Nummerierung der C-Atome zur Kennzeichnung der Position der Phosphatgruppen erfolgt gemäß Empfehlung der NCIUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1989) in der häufiger verwendeten D-Schreibweise entgegen des Uhrzeigersinns. Die axial stehende Hydroxylgruppe ist dabei an D2 gebunden, die rechte vordere „Flosse“ der Schildkröte bildet D1 (NC-IUB, 1989).

Zur Beschreibung der Inositolpyrophosphate kann entweder die Summe der insgesamt gebundenen Phosphatgruppen verwendet werden (bspw. InsP_8), exakter ist jedoch die genaue Beschreibung, auf welche Art die Phosphatreste mit dem Inositol verknüpft sind (bspw. PP-InsP_6 oder PPP-InsP_5) (Wundenberg und Mayr, 2012). Bei InsPs mit mehr als sechs Phosphatgruppen befindet sich die Pyrophosphatgruppe jeweils immer am C1- oder C5-Atom (Shears, 2015).

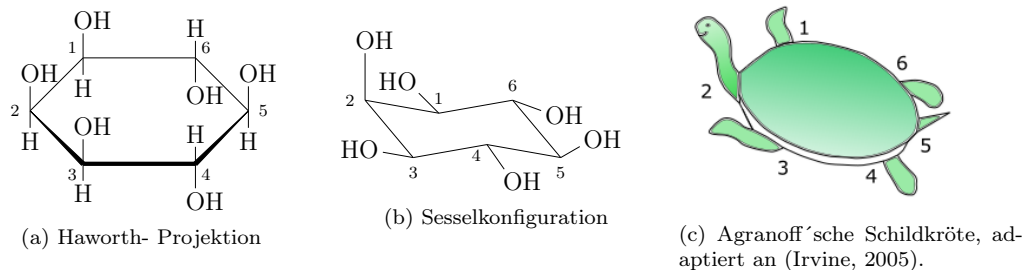


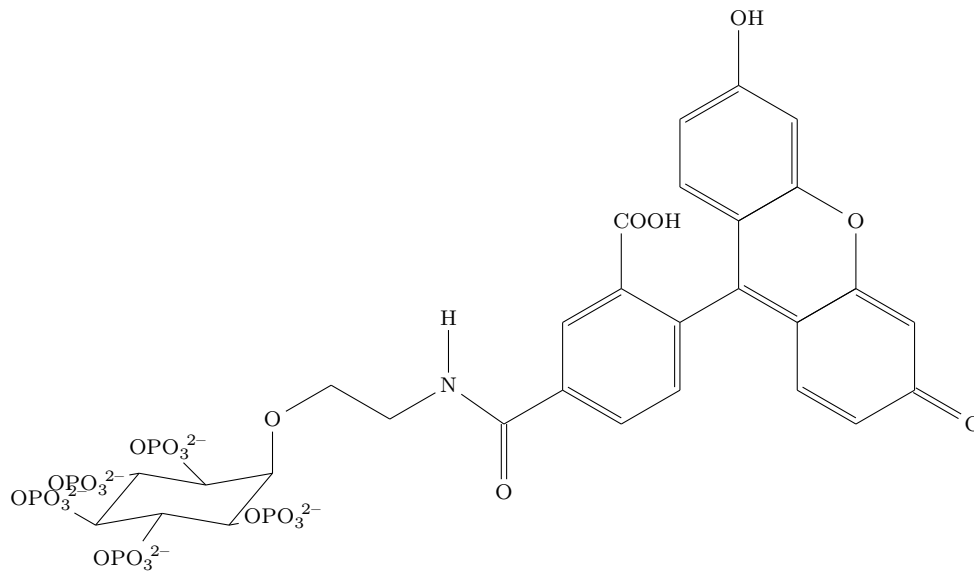
Abbildung 1: Unterschiedliche Darstellungsformen für Inositol.

1.1.2 FAM- InsP_5

FAM- InsP_5 ist ein synthetisches Myo-Inositol-(1,3,4,5,6-)Pentakisphosphat, welches in der AG Riley, Universität Barth, GB, synthetisiert wurde. Es ist am axialen D2-Atom über eine 2-Aminoethylgruppe mit dem grünlich fluoreszierenden Farbstoff 5-Carboxyfluorescein verlinkt. Dieses ermöglicht eine Visualisierung des ansonsten schwer zu detektierenden InsP. In Reinform liegt es als Triethylammoniumsalz vor. Zur genauen Synthese siehe (Riley et al., 2014).

1.1.3 Vorkommen

In eukaryotischen Zellen liegen InsPs sowohl in der Zellmembran gebunden als auch frei im Zytosol vor. Die Zellmembran enthält InsPs in Form von Phosphatidylinositol-

Abbildung 2: FAM-InsP₅, adaptiert an (Riley et al., 2014).

lipiden (PtdIns). Diese bestehen aus Glycerin, welches am C1- und C2-Atoms jeweils mit einer Fettsäure verestert wurde; die OH-Gruppe an C3 ist über eine Phosphatgruppe mit einem Inositolring verknüpft. Als Fettsäuren sind an C1 meist Stearinsäure (C₁₈H₃₆O₂), an C2 meist Arachidonsäure (C₂₀H₃₂O₂) gebunden. Der Inositolrest kann an Position D3, D4 oder D5 phosphoryliert sein (Balla, 2013).

Damit ergeben sich sieben mögliche PtdIns, die eine wichtige Rolle beim Vesikeltransport, der Zytoskelettdynamik und der Membranfusion spielen (De Craene et al., 2017). Darunter ist auch das Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PI(4,5)P₂), welches als Vorläufer zur Synthese aller höher phosphorylierter InsPs dient (Thota und Bhandari, 2015).

1.1.4 Biosynthese

Obwohl tierische Zellen in der Lage sind, extrazelluläres InsP₅ und InsP₆ zu internalisieren, können sie dieses nicht direkt nutzen. Nach der Endozytose gelangen InsPs in die Lysosomen, wo sie komplett dephosphoryliert werden (Helmis et al., 2013). Somit ist eine autonome InsP-Synthese obligat. Dabei wird wahrscheinlich über PI(4,5)P₂ zuerst InsP₃ gebildet und dieses zur Synthese höherer InsPs dann weiter phosphoryliert (Letcher et al., 2008).

Säugetiere besitzen unterschiedliche Enzyme zur InsP-Synthese. Durch die Phospho-

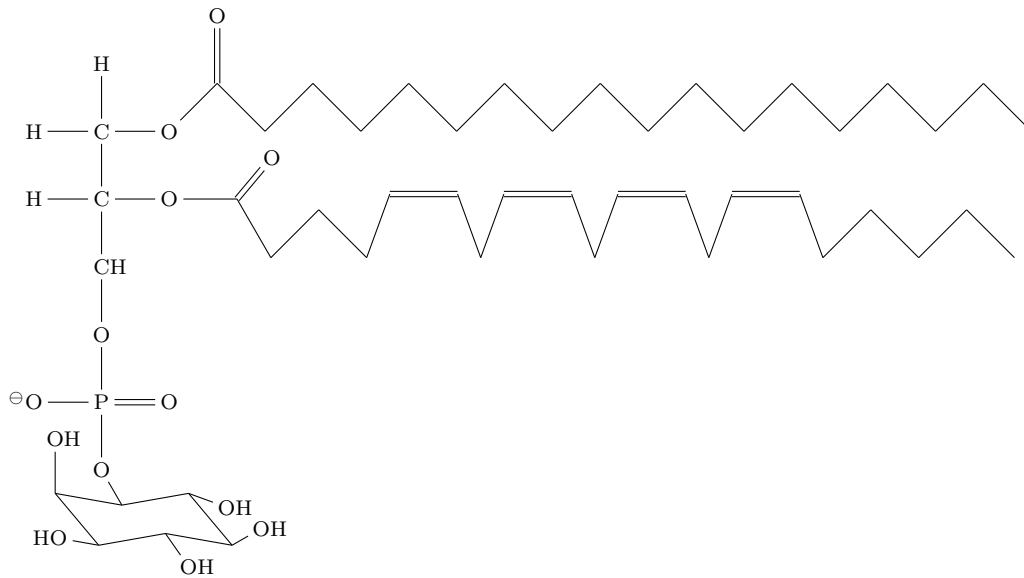


Abbildung 3: Phosphatidylinositol, adaptiert an (Falkenburger et al., 2010).

lipase C (PLC) wird das PtdIns PI(4,5)P₂ zu Inositol(1,4,5)-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerin (DAG) gespalten (M. J. Berridge, 1993; M. J. Berridge et al., 2000; Streb et al., 1983). Durch Phosphorylierung durch die Inositolphosphatmultikinase (IPMK) an Position D6 entsteht InsP₄ (Malabanan und Blind, 2016), durch Anknüpfen einer weiteren Phosphatgruppe an Position D3 wird InsP₅ generiert (Odom et al., 2000). Säugetiere und *Drosophila* besitzen zudem die Inositoltrisphosphat-3-Kinasen (IP₃-3K, ITPK), die Ins(1,4,5)P₃ zu Ins(1,3,4,5)P₄ phosphorylieren (Irvine et al., 1986; Irvine et al., 1988; Takazawa et al., 1990). Durch die IPMK (Kim et al., 2017) wird aus Ins(1,3,4,5)P₄ Ins(1,3,4,5,6)P₅ (Saiardi et al., 1999). Das Enzym Inositolpentakisphosphat 2-Kinase (IPPK) bildet Ins(1,2,3,4,5,6)P₆ (Verbsky et al., 2002).

In Säugetieren und Pflanzen findet sich zudem einen weiterer Weg zur Synthese von Ins(1,3,4,5,6)P₅: Hierbei wird durch die IP₃-3K generiertes Ins(1,3,4,5)P₄ zuerst an Position D5 durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat-5-Phosphatase (5-PPT) dephosphoryliert (Drayer et al., 1996) und anschließend an Position D5 bzw. D6 durch das Enzym Inositol (1,3,4)-trisphosphat 5/6-kinase (ITPK1) erneut ein Phosphatrest angehängt (M. P. Wilson und Majerus, 1996). Wird InsP₅ gebildet, so wird Ins(1,3,4,6)P₄ anschließend durch Anknüpfen einer weiteren Phosphatgruppe an Position D5 durch die IPMK zu Ins(1,3,4,5,6)P₅ phosphoryliert (Kim et al., 2017). Daraus kann die IPPK dann InsP₆ generieren (Verbsky et al., 2002).

InsP₆ dient als Ausgangssubstrat zur Bildung aller höher phosphorylierter InsPs (InsP₇ und InsP₈) (Chakraborty et al., 2011). Die Synthese erfolgt einerseits durch die Inositolhexakisphosphatkinase (IP6K), von der bislang drei Unterformen bekannt sind (IP6K 1/2/3), welche je nach Gewebe unterschiedlich stark exprimiert werden (Drašković et al., 2008; Saiardi et al., 2001). Zum anderen wird durch die PPIP5K (Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase) InsP₈ aus 5-PP-InsP₇ gebildet sowie 1-PP-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (1-InsP₇) aus InsP₆ (Shears et al., 2017). Durch das Enzym Diphosphoinositolpolyphosphatphosphohydrolase (DIPP) werden die gebundenen Phosphatgruppen wieder abgespalten (Safrany et al., 1998). Bislang wurden fünf Isoformen gefunden. Ein weiteres Enzym zur Dephosphorylierung ist die MINPP1 (Multiple-Inositolphosphat-Phosphatase 1), die extrazelluläres InsP₆ in humanem Plasma sowie nach Aufnahme in die Lysosomen dephosphoryliert (Chi et al., 2000; Windhorst et al., 2013). Neuere Untersuchungen ergaben auch eine Phosphataseaktivität der IP6K (Wundenberg et al., 2014). Zum Vergleich siehe Abb. 4.

1.1.5 Biologische Funktion

InsPs sind in allen Geweben vertreten und besitzen vielfältige Aufgaben.

Ins(1,4,5)P₃ fungiert als second messenger: Durch Bindung an Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) führt es zur Öffnung intrazellulärer Calciumspeicher (M. J. Berridge und Irvine, 1989). Ins(3,4,5,6)P₄ hemmt calciumabhängige Chloridkanäle und dient damit ebenfalls als Signaltransduktionsmolekül (Vajanaphanich et al., 1994). InsP₅ dient vor allem der Synthese von InsP₆ (Thota und Bhandari, 2015). InsP₆ ist mit einer Konzentration von bis zu 100 μ M das häufigste InsP in Zellen von Säugetieren (Irvine, 2005). In Pflanzen fungiert es vor allem als wichtiger Kationenspeicher; auch in tierischen Zellen ist es in der Lage zwei- und dreiwertige Kationen zu binden (Helmis et al., 2013; Veiga et al., 2006). Es dient als Cofaktor in der DNA-Reparatur beim Non-homologous end joining (NHEJ) (Hanakahi et al., 2000; Ma und Lieber, 2002), als Faltungsfaktor beim nuklearen mRNA-Export (Saiardi et al., 2000; York et al., 1999) und ist wichtiger Cofaktor im RNA-Editing (Macbeth et al., 2005). InsP₅ und InsP₆ sind am Chromatinremodeling beteiligt (Rando et al., 2003; Shen et al., 2003; Steger et al., 2003). Eine weitere Rolle nimmt InsP₆ beim Vesikeltransport (Thota und Bhandari, 2015) sowie der Exozytose, insbesondere von Insulin, ein (Efanov et al., 1997).

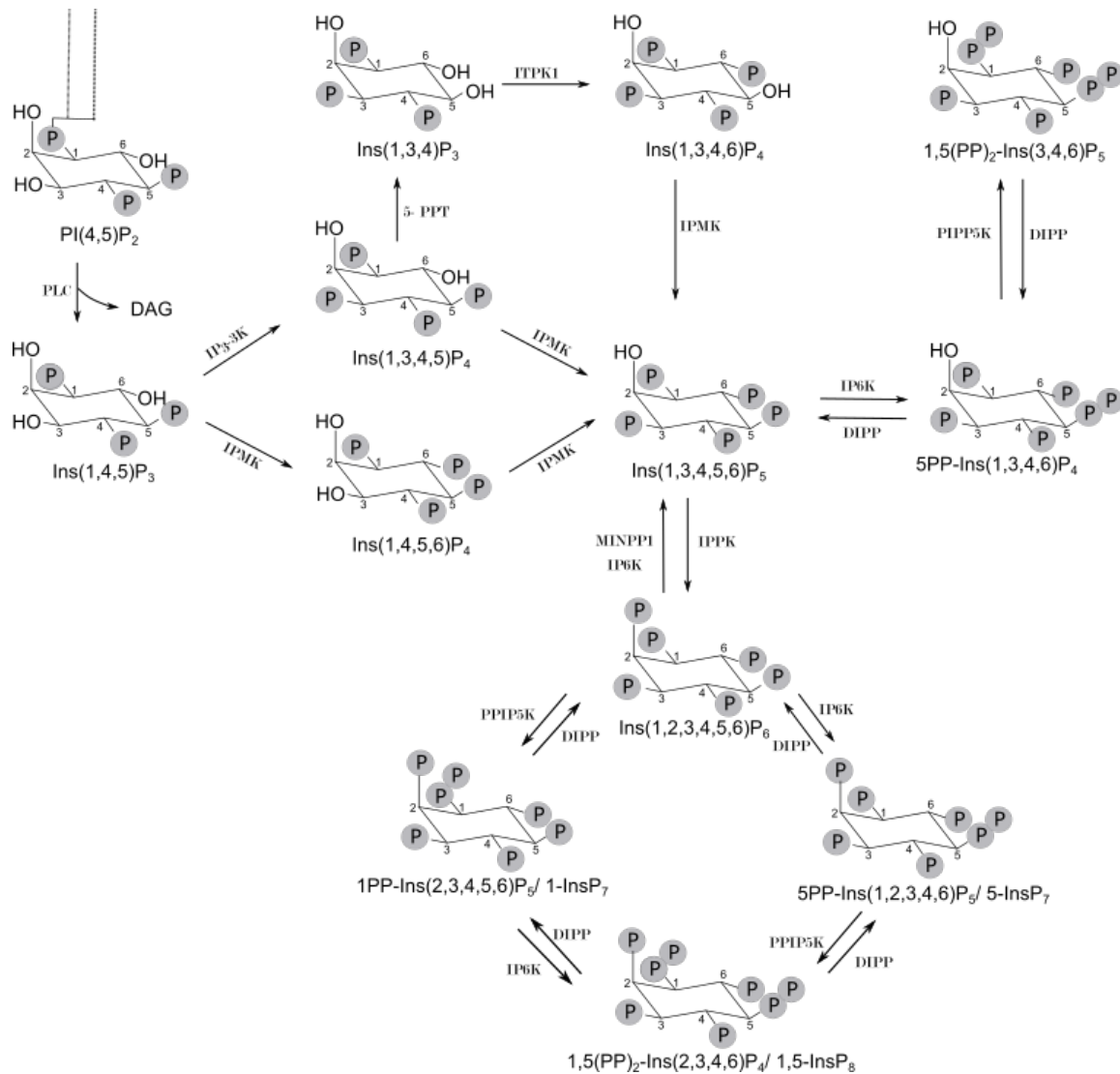


Abbildung 4: InsP-Synthese, adaptiert an (Thota und Bhandari, 2015).

Die Synthese aller InsPs beginnt mit der Spaltung des $\text{PtdIns PI}(4,5)\text{P}_2$. Das entstehende InsP_3 wird durch die IP_3 -3K bzw. die IPMK zu InsP_4 phosphoryliert. Aus InsP_4 kann die IPMK InsP_5 generieren. Säugtieren und *Drosophila* besitzen einen weiteren Weg zur InsP_5 Synthese: Dabei wird InsP_4 zuerst an Position D5 durch die 5-PPT zu InsP_3 dephosphoryliert und durch die ITPK1 an Position D6 ein neuer Phosphatrest angeknüpft. Aus Ins(1,3,4,6)P_4 kann die IPMK dann wieder InsP_5 bilden. Die IPPK erzeugt daraus InsP_6 . InsP_6 dient als Ausgangssubstanz zur Synthese von Inositolpyrophosphaten (InsP_7 und InsP_8).

DAG: Diacylglycerin, DIPP: Diphosphoinositolpolyphosphatphosphohydrolase, IP_3 -3K: IP_3 -Kinase, IP6K : InsP_6 -Kinase, IPMK: Inositolphosphatmultikinase, IPPK: Inositolpentakisphosphat 2-Kinase, MINPP1: Multiple Inositolphosphat-Phosphatase 1, PLC: Phospholipase C, PPIP5K: Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase, 5-PPT: Inositol-1,4,5-trisphosphat-5-Phosphatase

Pyrophosphate (InsP₇ und InsP₈) dienen der Regulierung von Proteinfunktionen durch Bindung an wichtige Proteindomänen (Lee et al., 2007; Thota und Bhandari, 2015). Durch Hydrolyse der energiereichen Phosphoanhydridbindung (P-O-P) kann Energie erzeugt, bzw., durch Bildung einer solchen, Energie gespeichert werden (Thota und Bhandari, 2015; Wundenberg und Mayr, 2012). Zudem scheinen sie eine wichtige Rolle in der Stoffwechselregulation (Illies et al., 2007) sowie in der Regulation von Zellwachstum und Zelltod bzw. Apoptose zu spielen (Chakraborty et al., 2011; De Craene et al., 2017; Morrison et al., 2001).

1.2 Blutgerinnung

Blut und Blutgerinnung haben die Menschheit von je her fasziniert. Die Entdeckung der Blutgruppen und später der Gerinnungsfaktoren bedeutete einen Meilenstein für die Medizingeschichte. Gerinnungshemmende Medikamente zur Prävention einer Thrombose sowie zur Therapie von Schlaganfall und Herzinfarkt sind heutzutage Alltag in der klinischen Praxis.

Blutgerinnung (Hämostase) ist die Reaktion des Organismus zur Beendigung einer Blutung und ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Plasmaproteinen, Blut- und Endothelzellen.

1.2.1 Zelluläre Akteure von Blutgerinnung und Wundheilung

Thrombozyten (Blutplättchen) sind runde, scheibchenförmige Zellfragmente von etwa $2 - 3\mu\text{m}$ Größe. Sie entstehen als Abschnürungen der Megakaryozyten im Knochenmark und sind streng genommen keine eigenständigen Zellen, denn sie besitzen keinen Zellkern. Ihre Plasmamembran enthält eine Reihe von Proteinen (insbesondere GPIIb/IIIa (ein Rezeptor für Fibrinogen (Bergmeier und Hynes, 2011)) und GPIb), die für Anheftung und Vernetzung, v.a. mit der extrazellulären Matrix, elementar sind. Im Zytoplasma finden sich neben Mitochondrien prokoagulatorisch wirksame Granulae, die bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden können (Lüllmann-Rauch, 2009; Rassow und Hauser, 2016; Welsch und Deller, 2011).

Fibroblasten sind ortsständige Zellen des Bindegewebes. Sie synthetisieren Kollagenfasern und nehmen eine wichtige Rolle in der Wundheilung ein (siehe Abschnitt 1.2.5) (Lüllmann-Rauch, 2009; Welsch und Deller, 2011).

Monozyten sind mit $15 - 20\mu m$ die größten Zellen im Blutsystem. Sie werden im Knochenmark gebildet und durchwandern für etwa $12 - 24h$ den Blutstrom, bevor sie die Blutbahn verlassen und sich im Bindegewebe zu spezifischen Makrophagen ausdifferenzieren. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose pathogener Partikel und abgestorbener Körperzellen (Welsch und Deller, 2011).

Endothelzellen bilden als sogenannte „Tunica intima“ die innere Auskleidung von Blutgefäßen. Sie synthetisieren gerinnungsfördernden von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie gerinnungshemmendes Prostazyklin (Lüllmann-Rauch, 2009).

1.2.2 Klassisches Modell der Blutgerinnung

Nach dem klassischen Gerinnungsmodell existieren zwei voneinander unabhängige Systeme, die zur Blutstillung führen: die zelluläre und die plasmatische Blutgerinnung.

Zelluläre Gerinnung (primäre Hämostase)

Wird Gewebe verletzt, setzt augenblicklich die zelluläre Gerinnung ein und bildet innerhalb weniger Minuten einen primären Wundverschluss. Dabei binden durch die Verletzung freigelegte Kollagenfasern den von Endothelzellen synthetisierten von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieser besitzt eine weitere Bindungsstelle für den GPIIb-Rezeptor (GPIIb-R) auf der Thrombozytenoberfläche (Rassow und Hauser, 2016). Bindet vWF den GPIIb-R, führt dies zur Aktivierung und damit zur Formveränderung der Thrombozyten sowie zur Exozytose der gerinnungsfördernden Granulae (Kamath et al., 2001). Hierbei werden α -Granulae von elektronendichten δ - (von engl. = „dense“) Granulae unterschieden. Während in α -Granulae vorwiegend Gerinnungsfaktoren (FV und FI) gespeichert sind, enthalten δ -Granulae ADP, Pyrophosphat und Calcium (Kamath et al., 2001). Aktivierte Thrombozyten sezernieren vasokonstriktorisch wirksames Thromboxan A₂ und den PSF (Platelet Stimulation Factor) zur Aktivierung weiterer Thrombozyten. Am Ende der zellulären Gerinnung entsteht als primärer Wundverschluss der sogenannte „weiße Thrombus“ (Rassow und Hauser, 2016).

Neben den Thrombozyten scheinen auch Leukozyten (hier v.a. Monozyten, Makrophagen und Neutrophile) eine wichtige Rolle in der Gerinnung zu spielen: bei einer

Gewebsverletzung können sie prokoagulatorische sowie proinflammatorische Granulae sezernieren (Engelmann und Massberg, 2013; Swystun und Liaw, 2016) und damit die zelluläre und plasmatische Gerinnung beeinflussen.

Plasmatische Gerinnung (sekundäre Hämostase)

Für die plasmatische Gerinnung entwickelten die Arbeitsgruppen um Macfarlane (Macfarlane, 1964) sowie Davie und Ratnoff (Davie und Ratnoff, 1964) in den 1960er-Jahren unabhängig voneinander das sogenannte „Kaskadenmodell“ (Rassow und Hausser, 2016). Dieses beschreibt die Blutgerinnung als eine Kaskade von Gerinnungsfaktoren (FI-XIII) (Riddel Jr et al., 2007). Jeder Gerinnungsfaktor wird dabei von seinen Vorgänger durch proteolytische Spaltung aktiviert (ein aktiver Gerinnungsfaktor wird durch ein kleines „a“ hinter der römischen Zahl gekennzeichnet.) Einmal aktiv fungiert er seinerseits als Protease und aktiviert einen weiteren Gerinnungsfaktor. Insgesamt werden zwei Wege unterschieden: ein intrinsischer Weg, der im Blutgefäß stattfindet und ein extrinsischer Weg, der extravasal abläuft. Beide Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, an deren Ende große Mengen Thrombin entstehen. Thrombin spaltet dann Fibrinmonomere aus Fibrinogen, die zu Fibrinsträngen polymerisieren. Wichtig ist, dass dieses Modell komplett ohne eine Interaktion zwischen Gerinnungsfaktoren und Blutzellen auskommt. Zur detaillierten Darstellung sei auf Abb. 5 verwiesen, sowie auf vertiefende Literatur.

Obwohl dieses Modell alle Gerinnungsfaktoren in eine logische Reihenfolge brachte und sich in vitro auch beobachten ließ, blieben viele klinische Phänomene dennoch unbeantwortet: Beispielsweise ließen sich bei Patienten mit FXII-Mangel, High Molecular Weight Kininogen- (HMWK-) oder Prekallikreindefizienz (alles Bestandteile des intrinsischen Weges) keinerlei verstärkte Blutungsneigungen nachweisen, wohingegen ein FXI-Mangel sehr wohl zu gesteigerter Hämorrhagie führte. Zum anderen litten Patienten mit Hämophilie A (FVIII-Mangel) an verstärkten Blutungen, obwohl diese durch den intrinsischen Weg eigentlich umgangen werden müssten (Hoffman, 2003). Nach über 40 Jahren Gültigkeit wurde daher das Kaskadenmodell zugunsten des sogenannten „zellbasierten Modells der Gerinnung“ validiert (Hoffman, 2003; Versteeg et al., 2013).

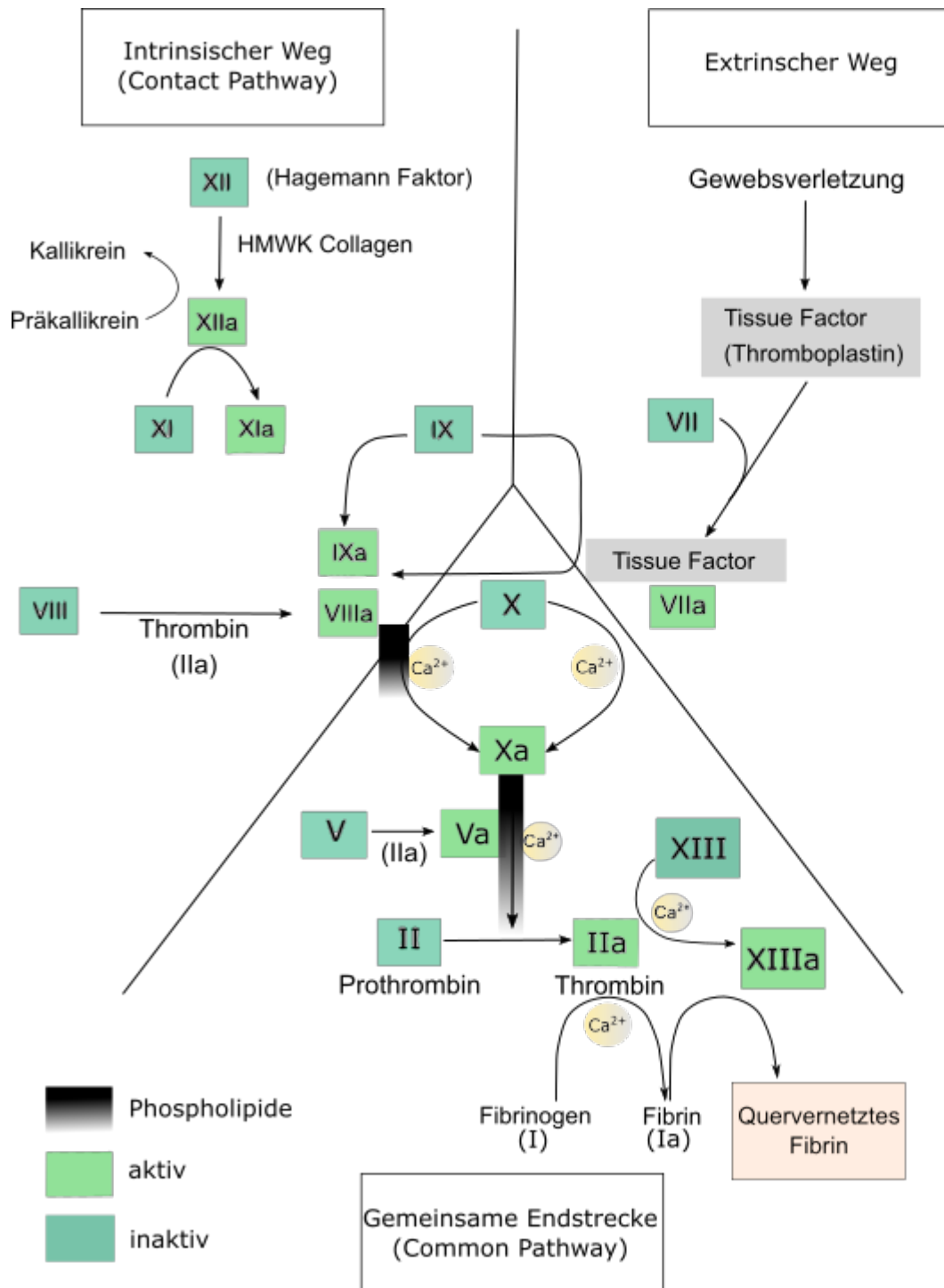


Abbildung 5: Klassisches Modell der plasmatischen Gerinnung, dargestellt als Gerinnungskaskade, adaptiert an (Riddel Jr et al., 2007).

1.2.3 Zellbasiertes Modell der Blutgerinnung

Dieses Modell geht davon aus, dass die Blutgerinnung an Zelloberflächen stattfindet. Eine Trennung der Blutgerinnung in zellulär und plasmatisch ist damit obsolet. TF- (eng.= „Tissue factor“, Gewebefaktor) tragende Zellen sowie Blutzellen agieren gemeinsam mit den Gerinnungsfaktoren. Eine Unterscheidung in extrinsisch und intrinsisch wird nicht mehr vorgenommen. Vielmehr wird heute davon ausgegangen, dass der (ehemalige) intrinsische Signalweg (v.a. FXI und XII) als Verstärkungsschleife des (ehemaligen) extrinsischen (TF-) Weges fungiert. Insgesamt werden drei Schritte durchlaufen, die sich in ihrem Ablauf überschneiden, also nicht, wie in der Gerinnungskaskade, streng nacheinander erfolgen.

Initiation (Beginn)

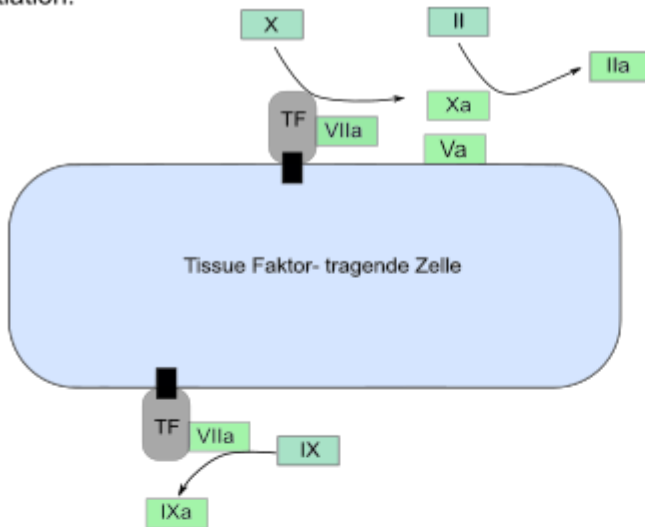
Die Initiation erfolgt extravaskulär und ähnelt dem intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade. Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen sowie Endothelzellen bilden permanent das Transmembranprotein Thromboplastin (TF, Tissue factor, FIII) und präsentieren es auf ihrer Oberfläche. TF steht nicht in Verbindung mit dem Blut, jedoch gilt heute als erwiesen, dass die Gerinnungsfaktoren FX, VII und II die Blutgefäße aufgrund ihrer geringen Molekülgröße verlassen und in den Extravasalraum gelangen können. Gelangt TF mit FVII in Kontakt, wird dieser nichtenzymatisch aktiviert (VIIa) (der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden). TF bindet VIIa. TF/VIIa (nun als „intrinsische Tenase“ bezeichnet) kann daraufhin FX zu aktivem FXa spalten. Dieser spaltet dann geringe Mengen FII (Prothombin) in Thrombin (IIa). Im Gegensatz zur Gerinnungskaskade führt dieses jedoch nicht zur Fibrinogenspaltung, da es von allen anderen Gerinnungsfaktoren durch die gesunde Gefäßwand getrennt ist.

Amplifikation (Vermehrung)

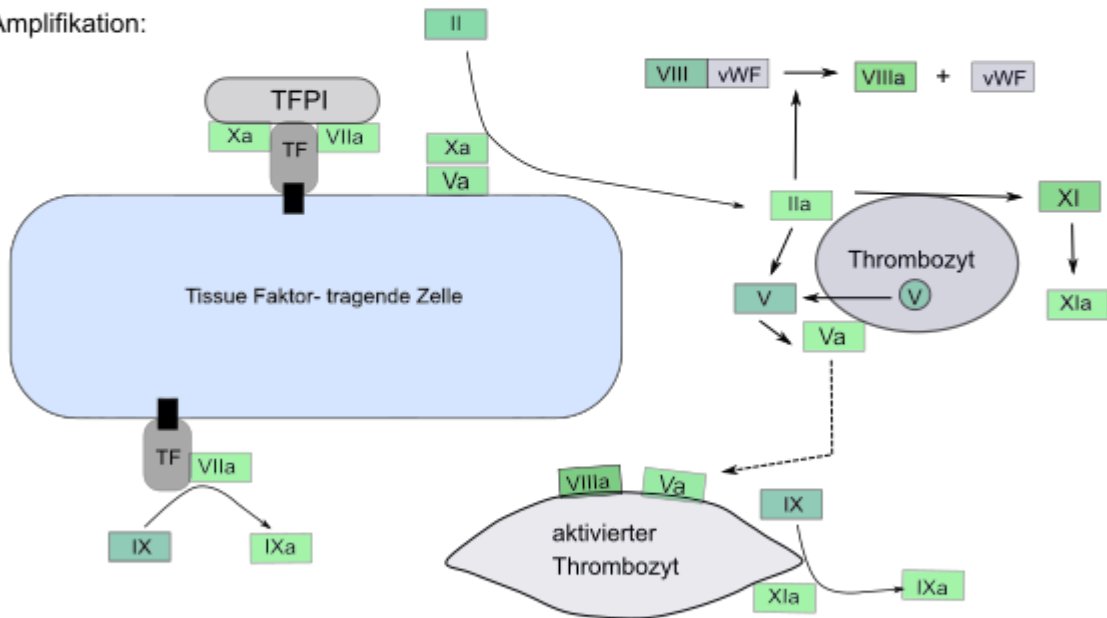
Erst durch eine Gefäßverletzung gelangen intravasale Gerinnungsfaktoren, vWF/FVIII und Thrombozyten nach extravaskulär und treten in Kontakt mit geringen Mengen des permanent gebildeten Thrombins. Nun wird die eigentliche Gerinnung gestartet (dies wird auch als „Thrombinfunken“ bezeichnet).

Thrombozyten binden an den Gewebsdefekt und sezernieren ihre Granulae (u.a. FV). FVIII (normalerweise fest am vWF gebunden) löst sich vom vWF und wird von

Initiation:



Amplifikation:



Propagation:

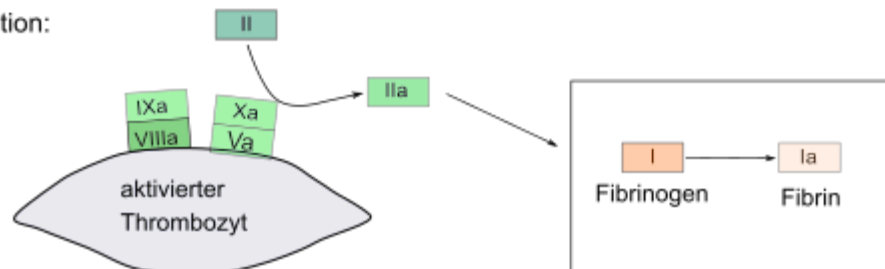


Abbildung 6: Schematische Darstellung des zellbasierten Modells der Blutgerinnung: Initiation, Amplifikation und Propagation, adaptiert an (Hoffman, 2003).

TFPI= Tissue Factor Pathway Inhibitor

Thrombin, gemeinsam mit FXI und FV, aktiviert. FXIa bindet an die Thrombozytenoberfläche und spaltet IX in IXa. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von FX wird als „Josso-Schleife“ bezeichnet: Hierbei spaltet TF/FVIIa FIX in IXa. FIXa und durch Thrombin aktivierter FVIIIa bilden zusammen die extrinsische Tenase und aktivieren FX zu Xa (Josso und Prou-Wartelle, 1965; Marlar und Griffin, 1981).

Propagation (Fortführung)

Durch Bindung von FIXa an die Oberfläche aktivierter Thrombozyten verlagert sich die Blutgerinnung von extravaskulär nach intravasal. FIXa bindet FVIIIa. Der IXa/VIIIa-Komplex („extrinsische Tenase“) spaltet X in Xa. Xa bindet sofort seinen Kofaktor Va mit hoher Affinität und spaltet große Mengen von Prothrombin in Thrombin. Dieses konvertiert dann schlussendlich Fibrinogen in Fibrin, welches polymerisiert und ein Maschenwerk bildet, das durch den FXIII zu einem stabilen Thrombus quervernetzt wird. Über den vWF-R kann Thrombin an Thrombozyten binden und diese in das entstehende Fibrinnetz integrieren.

1.2.4 Antithrombotische Mechanismen

Eine effektive Gerinnungshemmung ist elementar, um das Auftreten von Thrombosen bzw. Embolien zu verhindern. Hierbei spielen v.a. zwei Mechanismen eine wichtige Rolle: der sogenannte Protein C/ S-Weg sowie zirkulierende Proteaseinhibitoren (Stryer et al., 2007; Versteeg et al., 2013). Einige Substanzen finden inzwischen klinische Anwendung als antithrombotische Medikamente.

Protein C/ S-Weg

Bei steigenden Thrombinkonzentrationen bindet Thrombin u.a. an das auf Endothelzellen exprimierte Transmembranprotein Thrombomodulin (TM). An TM gebundenes Thrombin spaltet und aktiviert Protein C. Aktiviertes Protein C (APC) bindet nun von der Leber sezerniertes Protein S und inaktiviert die Schlüsselfaktoren der Gerinnung FVa und VIIIa. Eine klinische Relevanz erlangt der Protein C/S-Weg beim Faktor-V-Leiden (APC-Resistenz): Hierbei kann APC den FVa nicht spalten und damit inaktivieren. Damit einher geht ein 5- bis 50-fach erhöhtes Thromboserisiko (hetero-/homozygot).

Zirkulierende Proteaseinhibitoren: TFPI und AT

TFPI (tissue factor pathway inhibitor) verringert die Gerinnungsinitiation durch Bindung an aktivierte Gerinnungsfaktoren, es inhibiert direkt freies FXa und interagiert mit dem TF/VIIa/Xa-Komplex.

Antithrombin (AT) kann die Faktoren IXa bis XIIa sowie IIa mit hoher Affinität binden und inaktivieren. Massiv verstärkt wird diese Wirkung durch das Polysaccharid Heparin, eine Tatsache, die auch klinische Anwendung in der Thromboseprophylaxe findet.

Wirkung von Calcium und Vitamin K

Für die Bindung der Gerinnungsfaktoren X, IX, VII und II an die negativ geladenen Phospholipide der Thrombozytenoberfläche wird Calcium als Kofaktor benötigt. Alle Calcium-bindenden Gerinnungsfaktoren werden in der Leber synthetisiert. Damit eine Bindung von Calcium stattfinden kann, erfolgt posttranslational die sogenannte „ γ -Carboxylierung“. Hierbei wird an das γ -C-Atom der Glutamat-Seitenketten der Gerinnungsfaktoren eine Carboxylgruppe gebunden (Heinrich et al., 2014; Rasso und Hauser, 2016). Die für die γ -Carboxylierung zuständige hepatische Carboxylase benötigt Vitamin K als essentiellen Kofaktor. Vitamin K ist jedoch nur in seiner reduzierten Form wirksam. Vitamin K-Antagonisten (Cumarine) hemmen kompetitiv die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und verhindern auf diese Weise die γ -Carboxylierung. Die so synthetisierten Gerinnungsfaktoren können daher kein Calcium binden und sind physiologisch unwirksam. Antagonisiert wird dieser Effekt durch die orale oder intravenöse Verabreichung von Vitamin K (Freissmuth et al., 2016).

1.2.5 Wundheilung

Sobald die Blutgerinnung abgeschlossen ist, beginnt das Gewebe zu regenerieren (Marieb, 2015). Unterschieden wird eine primäre Wundheilung, bei der die Wundränder direkt adaptieren und zusammenwachsen von einer sekundären Wundheilung, in welcher zuerst Granulationsgewebe entsteht, welches anschließend durch Bindegewebe ersetzt wird. Bei großen, tiefen Wunden oder auch nekrotischen Wundrändern erfolgt meist die sekundäre Wundheilung. Hierbei werden vier Phasen durchlaufen (Reinke und Sorg, 2012; Wild und Auböck, 2007):

Hämostase: (bis zum 3. Tag): Durch Verletzung von Blut- und Lymphgefäßen treten Blut und Lymphflüssigkeit nach extravasal aus und füllen den Gewebsdefekt. Von aktivierten Thrombozyten synthetisiertes Thromboxan A₂ führt zu einer kurzzeitigen Vasokonstriktion und reduziert den Blutverlust. Die einsetzende Blutgerinnung resultiert in der Bildung eines Thrombus, der nach außen hin als Wundschorf abtrocknet und die Wunde primär verschließt. Zugleich dient der Thrombus als provisorische Wundmatrix und Gerüststruktur für einwandernde Fibroblasten, Leukozyten und Endothelzellen. Freigesetzte Zytokine aus Leuko- und Thrombozyten fördern den Entzündungsprozess, stimulieren die Kollagensynthese und Angiogenese sowie die Reepithelialisierung.

Entzündungsphase: (4.-7. Tag): Durch aktivierte Thrombozyten freigesetzte Entzündungsmediatoren sowie das Komplementsystem werden Neutrophile Granulozyten zur Wunde rekrutiert. Diese bauen durch Phagozytose sowie Freisetzen proteolytischer Enzyme nekrotisches Gewebe ab und eliminieren eingewanderte Bakterien. Zusätzlich werden Monozyten angelockt, welche zu Makrophagen ausdifferenzieren und die Granulozyten bei der Phagozytose von Zelltrümmern unterstützen. Freigesetzte Wachstumsfaktoren und Zytokine fördern zugleich das regelhafte Einwandern von Fibroblasten und Endothelzellen.

Proliferationsphase: 3 bis 10 Tage nach der Gewebsverletzung wandern Fibroblasten entlang des Fibrinnetzes des Thrombus ein und beginnen mit dem Aufbau einer neuen Extrazellulärmatrix. Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine angeregt, wandern von den Wundrändern aus Endothelzellen ein und beginnen mit der Reepithelialisierung. Einsprossende Kapillaren stellen die Gefäßversorgung der Wunde sicher. Durch Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und deren Kontraktion wird eine Verkleinerung der Wundfläche sowie eine Adaptation der Wundränder gewährleistet. Am Ende der Proliferationsphase entsteht als vorübergehende Überbrückung des Wundspaltes sogenanntes Granulationsgewebe aus Typ-III-Kollagen.

Remodellierungsphase: (> 2 Wochen): In dieser Phase kommt es zur vollständigen Regeneration des Gewebes. Kollagenfasern des anfänglich gebildeten Kollagens Typ-III werden durch das festere Typ-I Kollagen ersetzt. Mehrere Fasern werden zu größeren Einheiten gebündelt und richten sich gemäß der Beanspruchung der Haut

aus. Epithel überwächst das darunterliegende fibrosierte Bindegewebe. Zum Ende der Remodellierungsphase erfolgt die Apoptose der Zellen des Granulationsgewebes. Der Gewebsdefekt ist nun vollständig verheilt. Beim postfetalen Individuum entsteht bei Schädigung des Stratum reticulare oder tieferer Hautschichten immer eine zell- und gefäßarme Narbe unter Verlust der Hautanhangsgebilde.

1.3 Inositolphosphate und Blutgerinnung

Über die Wirkung von Inositolphosphaten auf die Blutgerinnung ist bis dato erstaunlich wenig bekannt.

InsP₆ konnte weder im Urin noch im humanen Plasma nachgewiesen werden. Oral zugeführtes InsP₆ wird zum Teil direkt wieder ausgeschieden oder erst nach Spaltung durch die Darmflora in Inositol bzw. Inositolmonophosphat resorbiert. I.v.-injiziertes InsP₆ wird sehr effektiv durch die MINPP-1 eliminiert (M. S. Wilson et al., 2015).

InsP₅ kann mit hoher Affinität an Fibrinogen binden. Eine physiologische Funktion ist bislang unbekannt (Grint et al., 2012). Größere Mengen InsP₄ und InsP₅ konnten auch in stimulierten Thrombozyten gefunden werden (Mayr, 1988). Auch hier ist eine genaue Funktion bis dato ungeklärt.

Polyphosphate Interessanterweise besitzen Thrombozyten in ihren δ -Granulae sogenannte Polyphosphate in Konzentrationen von etwa 1.1 mM. Polyphosphate bestehen aus einzelnen Phosphatresten, die aus ATP gebildet werden. Sie sind über hochenergetische Phosphoanhydridbindungen verknüpft und werden nach Stimulation durch Thrombin über rezeptorvermittelte Exozytose freigesetzt (Ruiz et al., 2004).

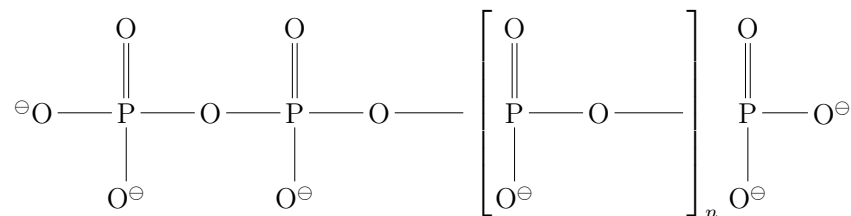


Abbildung 7: Polyphosphate, adaptiert an (Morrissey und Smith, 2015).

Abhängig von der Gesamtlänge scheinen ihnen unterschiedliche Funktionen zuzukommen (Smith et al., 2010): kurzkettige Polyphosphate (60-100 Einheiten), wie

sie aus Thrombozyten freigesetzt werden, wirken als wichtiger Kofaktor zur Aktivierung von FXI und beschleunigen die FV-Aktivierung (Morrissey und Smith, 2015). Neben der Hemmung von TFPI (Smith et al., 2006) wirken sie proinflammatorisch (Travers et al., 2015). Nach neuesten Erkenntnissen können sie die Fibrinstruktur verändern: Unter Zugabe kurzkettiger Polyphosphate bilden sich dichte, knotige Areale, abgewechselt von großen Poren (Mutch et al., 2010; Whyte et al., 2016). Zusätzlich werden die gebildeten Polymere langsamer abgebaut. Das Netzwerk ist weniger steif und plastisch verformbar (Whyte et al., 2016).

Längere Polyphosphate (mehrere 100- 1000 Einheiten) werden von Mikroorganismen (u.a. Bakterien, Pilzen, Algen und Protozen) freigesetzt (Kornberg et al., 1999; Smith et al., 2010). Sie aktivieren den (ehemals) intrinsischen Weg (effektiver als Thrombozyten) und können ebenfalls die Fibrinpolymerisierung beeinflussen: Hierbei sind die gebildeten Fibrinfäden jedoch deutlich dicker und stärker vernetzt sowie weniger dehnbar und resistenter gegenüber Fibrinolyse (Smith und Morrissey, 2008). Die Wirkung auf das Fibrinnetzwerk ist also abhängig von der Polymerlänge. Wahrscheinlich garantiert eine Protease die sofortige Elimination freier Polyphosphate.

Pyrophosphate Thrombozyten enthalten in ihren δ -Granulae anorganische Pyrophosphate ($P-P_i$) im Bereich von etwa 1 nM (Ruiz et al., 2004). In vitro konnten diese den prokoagulatorischen Effekt der Polyphosphate deutlich vermindern; ohne die Anwesenheit der Polyphosphate scheinen sie keinen Effekt auf die Bildung der Fibrinpolymere auszuüben (Smith et al., 2010). Die genaue Funktion ist auch hier noch ungeklärt.

Fibroblasten können InsPs in hohen Konzentrationen resorbieren. Eine physiologische Bedeutung ist bislang noch nicht bekannt (Riley et al., 2014).

1.4 Zielsetzung

Obwohl phosphathaltige Moleküle als wichtige Einflussfaktoren der Blutgerinnung zunehmend an Bedeutung gewinnen, ist eine genaue Untersuchung der Wirkung von InsPs auf die Hämostase bis dato nie erfolgt. Dies ist umso erstaunlicher, als in aktivierten Thrombozyten ein Anstieg an InsPs nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise sezernieren Thrombozyten also aktiv InsPs. Trotz des hohen Zellumsatzes ist humanes Plasma jedoch InsPs-frei. Dies wurde auf die Anwesenheit der MINPP1, einer hochaktiven Phosphatase, zurückgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Wirkung von InsPs (und hierbei v.a. von InsP₅ und InsP₆) auf Blutgerinnung und Fibrinstruktur zu untersuchen und einen möglichen Mechanismus aufzuzeigen, wie diese wirken könnten. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob es neben der MINPP1 weitere Mechanismen gibt, InsPs aus dem Blut zu eliminieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage HD BA 200	Sartorius
Autoklav 3150 EL	Systec
CO ₂ -Inkubator Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenzmikroskop Bioevo BZ-9000	Keyence
Fluoreszenzreader Sapphire 2	Tecan
Fluorimeter Fluoroscanner Ascent reader	Thermo Fisher Scientific
Heizblock ThermoStat plus	Eppendorf
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf
Impact-R-Device (CPA)	DiaMed
Laborschüttler MS2 Minishaker	IKA Labortechnik
Laborschüttler VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Mikropipette Research, 0,5-10µl	Eppendorf
Mikropipette Research, 10-100µl	Eppendorf
Mikropipette Research, 100-1000µl	Eppendorf
Mikropipette Research, 20-200µl	Eppendorf
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Reader infinite M200	Thermo Fisher Scientific
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge Z216MK	Hermle
Trockenschrank Heracell	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Zellzähler CASY	Schärfe System
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Blutentnahmeset	Sarstedt
CASY Cups mit Deckel	Roche
Mikrotiterplatten 16-MicroWell Module	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten 96-well, kristall	Falkon
Mikrotiterplatten 96-well kristall cellstar	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten 96-well corring flat black	Brand plates
Natriumcitrat-Röhrchen	Sarstedt
Pipettenspitzen 0,1 – 1000 μ l und 1 – 10 ml	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße (PP) 0,2/1,5/2 ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm ² , mit Filterdeckel	Sarstedt
Zellkulturplatten (PS) 6-well ibitreat	Ibidi
Zellkulturplatten (PS) 8-well ibitreat	Ibidi
Zellkulturschalen, Ø10 cm	Sarstedt
Zellkulturschale (PS)	Ibidi
Zellkulturschale 4-well	Cellview
Zellschaber, verschiedene Größen	NUNC

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Chemikalien in analysenreiner Qualität von Merck, Carl Roth, Sigma-Aldrich, Roche und Lager bezogen.

Produkt	Hersteller
Humanes α -Thrombin	Haematologic Technologies Inc.
Apyrase (Kartoffel)	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich
DCF (2,7-Dichlorfluorescein)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Falkon, VWR
Fibrinogen (aus humanem Plasma)	Sigma-Aldrich
GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)	Sigma-Aldrich
HEPES (1M, pH 7.5)	Sigma-Aldrich
InsP ₃ (Kaliumsalz)	Buchem
InsP ₅ (Triethylammoniumsalz) ($25\mu M/l$)	Millipore, Calbiochem, Merck
FAM-InsP ₅ (Triethylammoniumsalz)	Andrew Riley, University Barth, GB
InsP ₆ (Kaliumsalz)	Millipore, Calbiochem, Merck
May-Grünwald-Färbelösung	Carl Roth
MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent)	Promega
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ($50mg/ml$) in PBS	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA) (4% PFA/4% Sucrose in PBS)	Sigma-Aldrich
Prostaglandin E ₁ (PGE ₁)	Cayman Chemicals über Biozol
Thrombin-spez. fluorogenes Substrat (Z-Gly-Gly-Arg-AMC)	Bachem
Thrombin Calibrator	Stago

2.1.4 Zelllinien

RAW264.7 Bei RAW264.7-Zellen handelt es sich um Mausmakrophagen, die mit dem Abelson Murine Leukemia Virus transformiert wurden (Raschke et al., 1978). Sie wurden über ATCC bezogen.

Humane Monozyten wurden freundlicherweise von Prof. Stefan Linder aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE bereitgestellt.

Humane Fibroblasten wurden freundlicherweise durch Prof. Udo Schumacher aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie des UKE zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
CASYton (für Zellzähler CASY®)	Schärfe System
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMAX)	Gibco Life Technologies
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco Life Technologies
Penicillin (100U/ml)	Invitrogen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen
Streptomycin (100µg/ml)	Invitrogen
Trypsin/ EDTA (0,05%)	Invitrogen

2.1.6 Puffer und Lösungen

<u>MPER lysis buffer</u>	Promega
<u>PBS (phosphate-buffered saline)</u>	
pH 7,4	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM NaH ₂ PO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄
<u>Fibrin-Polymerisierungspuffer</u>	
pH 7,9	150mM NaCl 10mM CaCl ₂ 50mM Tris-HCl
<u>Tyrode's Buffer</u>	
pH 7,4	2mM KCl 3mM NaH ₂ PO ₄ 1mM MgCl 5,5mM Glucose 5mM HEPES 12mM NaHCO ₃ 137mM NaCl
<u>Modifizierter Tyrode's Buffer</u>	
pH 7,4	Apyrase PGE ₁ Tyrode's Buffer

2.1.7 Software

Produkt	Hersteller
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software
Thrombinoscope Software	Stago Deutschland GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete InsPs

InsP₅ und InsP₆ sind bis auf eine Phosphatgruppe an Position D2 chemisch identisch. Biochemisch wird InsP₅ v.a. als Vorstufe des InsP₆ angesehen (Thota und Bhandari, 2015). Grint (Grint et al., 2012) zeigte, dass sowohl InsP₅ als auch InsP₆ Fibrinogen mit hoher Affinität binden können. Beide Moleküle besitzen damit ähnliche Bindungseigenschaften. Riley (Riley et al., 2014) beschrieb ein ähnliches Verhalten für FAM-InsP₅ und InsP₆. Wir nahmen daher an, dass sowohl InsP₅ und InsP₆, aber auch FAM-InsP₅ und InsP₅ biochemisch ähnlich reagieren und daher miteinander zu vergleichen sind.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Hierbei wurde zum zu untersuchenden Protein der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 pipettiert.

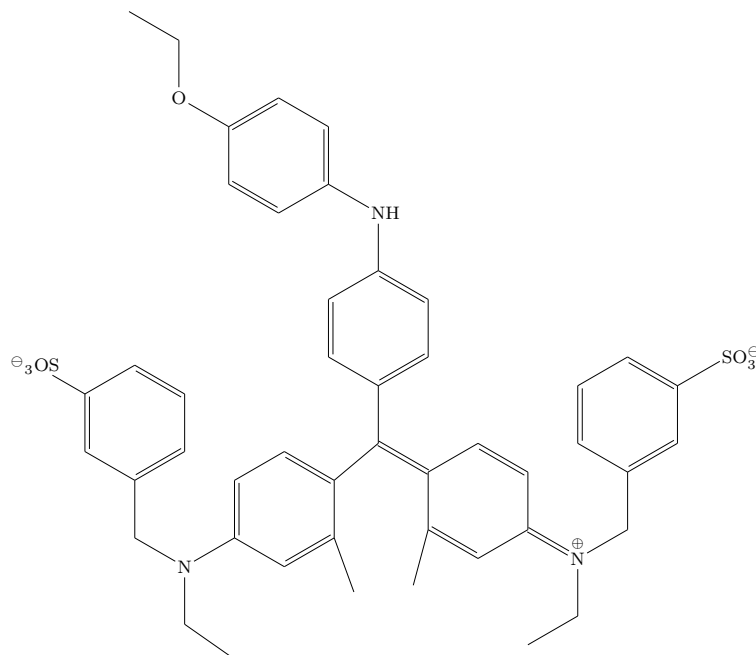


Abbildung 8: Coomassie Brilliant-Blue G250, adaptiert an (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Dieser Farbstoff existiert pH-abhängig in zwei unterschiedlichen chemischen Formen: in saurem pH besitzt der Farbstoff eine rote Farbe und absorbiert Licht mit einem Absorptionsmaximum von $465nm$. Im basischen pH ist der Farbstoff blau gefärbt und besitzt ein Absorptionsmaximum von $595nm$. Rotes Coomassie bindet an kationische und aromatische Aminosäure-Seitenketten von Proteinen. Dabei verändert sich die Farbe, das Absorptionsmaximum verschiebt sich von $465nm$ (rot) zu $595nm$ (blau). Je mehr Protein vorhanden ist, desto dunkler ist die Probe. Zur Kalibrierung wurde BSA-Standard-Protein (bovines Serumalbumin, Rinderalbumin) bekannter Konzentrationen photometrisch mitgemessen.

Der Test wurde in Multiwellplatten in Doppelbestimmung durchgeführt. Um eine zu hohe Proteinkonzentration zu vermeiden, wurden die Proteinlysate anfangs 1:200 verdünnt; je $50\mu l$ dieser Verdünnungen wurden mit $200\mu l$ Bradford-Reagenz ($1ml$ Konzentrat + $3ml$ Aqua dest.) versetzt.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei $620nm$ photometrisch bestimmt (eine Messung bei $595nm$ war aus technischen Gründen nicht möglich).

Tabelle 1: Exemplarische photometrische Messung

BSA _{μg}	E1 ₆₂₀	E2 ₆₂₀	ΔE_{620}	$\Delta E_{620} - E_{Leer}$
0	0.377	0.372	-	-
0	0.425	0.367	0.385	0
0.25	0.441	0.420	0.430	0.045
0.5	0.471	0.457	0.464	0.079
1.0	0.529	0.524	0.527	0.141
1.5	0.584	0.560	0.572	0.187
2.0	0.644	0.693	0.642	0.256
3.0	0.764	0.740	0.752	0.367

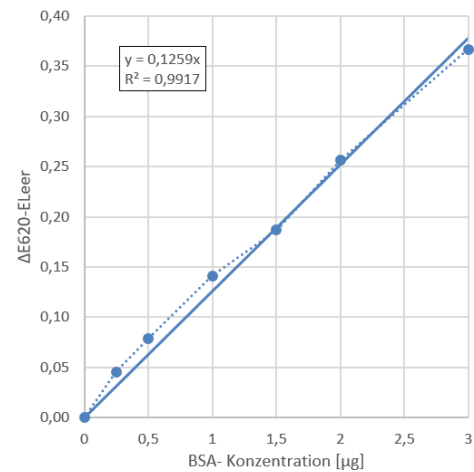


Abbildung 9: Visualisierte Eichgerade.

Die gemessenen Extinktionen der Doppelbestimmungen wurden gemittelt und als Eichgerade visualisiert (siehe Abb. 9).

Die Steigung m der Eichgeraden diene zur Errechnung der Proteinkonzentration in $50\mu\text{l}$ eines Proteinlysats:

$$c_{(\text{Protein})} = \frac{E_{620} - E_{\text{Leer}}}{m}$$

in diesem Beispiel also:

$$c_{(\text{Protein})} = \frac{E_{620} - E_{\text{Leer}}}{0,1259}$$

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (Vf) konnte so auf die Ausgangskonzentration zurückgeschlossen werden. Eine exemplarische Proteinbestimmung sei in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Exemplarische Berechnung der Proteinkonzentration

Probe	E1 ₆₂₀	E2 ₆₂₀	ΔE ₆₂₀	E ₆₂₀ -E _{Leer}	c _[μg/50μl]	c _[μg/μl]	Vf	c _[μg/μl]
1	0.463	0.479	0.471	0.086	0.681	0.041		2.724
2	0.464	0.464	0.464	0.079	0.625	0.013		2.502
3	0.472	0.467	0.470	0.084	0.669	0.013	200	2.677
4	0.469	0.473	0.471	0.086	0.681	0.014		2.724
5	0.392	0.400	0.396	0.011	0.085	0.002		0.342
6	0.388	0.393	0.391	0.005	0.042	0.001		0.167

2.2.3 Zellkultur

RAW264.7-Zellen wurden zur Kultivierung in RPMI 1640 Medium gehalten, welches mit 10% fetalen Kälberserum (FCS) mit 1% Penicillin und 1% Streptomycin (zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination) versetzt wurde. Das modifizierte RPMI-Medium wird nachfolgend als Vollmedium bezeichnet.

Humane Makrophagen wurden aus Monozyten differenziert, indem sie mit 50ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (GM-CSF) für sieben Tage in RPMI-Vollmedium inkubiert wurden.

Fibroblasten wurden in DMEM mit 1% Penicillin und 1% Streptomycin inkubiert. Als Behältnis aller Zellreihen dienten Zellkulturflaschen (75cm^2) mit Filterdeckel sowie Zellkulturschalen, inkubiert wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt. Nach drei bis vier Tagen bzw. 90% Konfluenz wurden die Zellen umgesetzt. Je nach Zellwachstum musste daher die Ausgangspopulation unterschiedlich stark verdünnt werden. Dazu wurde zunächst das vorhandene Medium abpipettiert und der Zellrasen einmalig mit 5ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1ml 0,05% Trypsin/ EDTA

und Inkubation bei 37 °C für 4 min, lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen. Nach anschließender Resuspension in 4ml Vollmedium konnten die Zellen weiter verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche oder -schale umgesetzt werden. Sollte die Zellpopulation lediglich für ein weiteres Wachstum ausgedünnt werden, wurden die Zellen 1:10- verdünnt und anschließend 2ml dieser Verdünnung mit 12ml Vollmedium versetzt.

Der restliche Zellbestand konnte gemäß der gewünschten Zellzahl und Konfluenz ausgesät werden. Nach 24-stündigem Wachstum im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt konnten die Zellen weiter verwendet werden.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der CASY[®]-Zellzähler verwendet. Dazu wurde je ein Hub CASYton-Lösung in ein Röhrchen gefüllt und je 50µl trypsinisierte Zellsuspension (genaue Angaben siehe Abschnitt 2.2.3) hinzupipettiert. Nach vorsichtigem mehrmaligem Umschwenken des Röhrchens konnte anschließend durchflusszytometrisch die Zellzahl ermittelt werden. Aus jeweils drei Messungen wurde der Mittelwert bestimmt. Durch die Kenntnis der Zellzahl in ml konnte die Gesamtzellzahl in der Zellkulturflasche berechnet werden. Soweit nicht anders angegeben, wurden je 1.5×10^6 Zellen pro Zellkulturschale ausgesät.

2.2.5 Gewinnung und Reinigung der Thrombozyten

Zur Gewinnung humaner Thrombozyten wurden gesunde Freiwillige akquiriert, die für mindestens 10 Tage keinerlei gerinnungsbeeinflussende Medikation eingenommen hatten. Sie wurden über die geplanten Versuchsreihen ausführlich aufgeklärt und waren mit ihrer Durchführung einverstanden. Das Alter der Freiwilligen lag zwischen 21 und 53 Jahren. Die einzelnen Versuchsreihen wurden mit Blut maximal vier unterschiedlicher Probanden durchgeführt. Insgesamt wurde das Blut von zehn Probanden untersucht. Die Probanden waren mehrheitlich europäischer Herkunft und weißer Hautfarbe. Für genauere Analysen zu anderen ethnischen Gruppen müssten zusätzliche und v.a. größere Studien durchgeführt werden. Wir gingen davon aus, dass die von uns verwendeten Thrombozyten zumindest für die mitteleuropäische Bevölkerung repräsentativ sind.

Zur Aufreinigung der Thrombozyten übernahmen wir gängige Protokolle von Dr.

Maria Brehm aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die ersten zwei entnommenen *ml* verworfen. Die Entnahme der Blutproben erfolgte in Natriumcitrat-Röhrchen, wobei das Blut ungestaut, also ohne die Verwendung eines Stauschlauches, abgenommen wurde. Damit sollten starke Scherkräfte und eine vorzeitige Thrombozytenaktivierung verhindert werden. Das entnommene Vollblut wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der einzelnen Fraktionen wurden die Proben anschließend bei 140*g* (ca. 900*rpm*) für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Die möglichst langsame Dezeleration erfolgte, um eine akzidentelle Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Der entstandene Überstand (im Folgenden als Plasma bezeichnet) wurde vorsichtig mit einer Pipette mit abgeschnittener Spitze abpipettiert und mit 75*U/ml* Apyrase und 100*nM* PGE₁ inkubiert. Die Apyrase fängt freies ADP und verhindert so die Thrombozytenaggregation (Savion und Varon, 2006). PGE₁ stimuliert die Adenylatzyklase und verhindert durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Calciumfreisetzung (Kreutz et al., 2013). Beide Agenzien verhinderten somit eine vorzeitige Plättchenaktivierung.

Die Proben wurden im Anschluss für 10 min bei 1200*g* zentrifugiert. Die Thrombozyten wurden zweimalig mit modifiziertem Tyrode's Buffer gewaschen und erneut bei 1200*g* für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde vorsichtig in 1*ml* modifiziertem Tyrode's Buffer auf eine Konzentration von 1×10^5 Thrombozyten/ μ l resuspendiert.

2.2.6 Aufreinigung der Erythrozyten

Erythrozyten/ Hämatokrit wurde mehrmalig mit modifiziertem Tyrode's Buffer gewaschen und bei 1200*g* für 10 min zentrifugiert. Durch Resuspension mit modifiziertem Tyrode's Buffer wurde eine Konzentration von 45 % erreicht.

2.2.7 Zell-Adhäsions-Analyse von FAM-InsP₅

Zur Bestimmung der Bindung von InsP₅ an Zelloberflächen nutzten wir fluoreszierendes FAM-InsP₅ als Alternative zu radioaktiv markierten Substanzen (Silcox et al., 1973). Dies ermöglichte eine relativ einfache, schnelle und v.a. strahlungsfreie Untersuchung gleich mehrerer Zellreihen. Dazu wurden Fibroblasten, humane Makrophagen und RAW264.7-Zellen in (8-Kammer-) Zellkulturplatten kultiviert, sodass jeweils

eine Konzentration von 2.5×10^4 Zellen pro Kammer erreicht wurde. Nach Verwerfen des bedeckenden Mediums wurden die Zellen mit je $25 \mu M$ fluoreszierender FAM-InsP₅-Lösung für 5 min bzw., in einem weiteren Ansatz für 16h, bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert und anschließend vorsichtig dreimal mit PBS-Probenpuffer gewaschen, um überschüssiges FAM-InsP₅ zu entfernen. Zum Fixieren der Zellen wurde jede Platte mit 4% PFA-Lösung für 10 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde ungebundenes PFA durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop (Belichtungszeit 1/3.5s) bei 20- und 50-facher Vergrößerung betrachtet.

Zur Detektion einer möglichen Bindung von FAM-InsP₅ an die Thrombozytenoberfläche wurde humanes Plasma für 5 min mit $25 \mu M$ FAM-InsP₅ inkubiert und ohne Waschen mit 4% PFA-Lösung bei 37 °C für 10 min fixiert. Damit sollte eine Plättchenaktivierung und eine vorzeitige Aggregation verhindert werden. Nach der Fixierung wurden die Thrombozyten dreimalig mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 60-facher Vergrößerung untersucht. Um eine mögliche FAM-InsP₅-Aufnahme der Thrombozyten zu detektieren, wurden sogenannte „Z-Stacks“ generiert. Dazu wurde das Präparat entlang der z-Achse optisch in mehrere Schichten geschnitten. Dies ermöglichte den Einblick ins Zellinnere, ohne die Zelle tatsächlich teilen zu müssen. Zum Anderen konnte im späteren Bild die Umgebungsfluoreszenz wirksam herausgeschnitten werden, in dem nur die relevanten Z-Stacks ausgewertet wurden. In der Mitte der Z-Stacks detektiertes FAM-InsP₅ werteten wir als internalisiert, während in der obersten und untersten Schicht befindliches FAM-InsP₅ als im Überstand befindlich galt. Mithilfe der mikroskopinternen Software konnte aus den Z-Stacks ein 3D-Bild errechnet werden.

2.2.8 FAM-InsP₅-Aufnahme durch Fluoreszenzphotometrie

Fibroblasten und RAW264.7-Zellen wurden in Zellkulturplatten gesät. Zur Aussaat der einzelnen Zellreihen siehe Abschnitt 2.2.3. Jede Zellreihe wurde mit entweder $25 \mu M$ FAM-InsP₅ oder $9 \mu M$ DCF (Menge an Fluorescein in $25 \mu M$ FAM-InsP₅) für 2, 5, 10 min oder über Nacht (16 h) inkubiert. Der Zellrasen wurde drei Mal mit PBS gewaschen, anschließend mit $100 \mu l$ MPER versetzt und mit einem Zellschaber abgeschabt. Das entstandene Lysat wurde bei -80 °C eingefroren, aufgetaut und verquirlt. Nach Zentrifugation bei $16000g$ ($13000rpm$) für 30 min bei 4 °C, wurde der Überstand entnommen und 1:20 mit PBS verdünnt. Die Fluoreszenz des Zelllysats wurde

anschließend durch photometrische Messung (Extinktion/Emission 490/535nm) ermittelt. Da angenommen werden kann, dass Fluorescein von Zellen nicht aufgenommen wird, wurde die so ermittelte Fluoreszenz von mit Fluorescein inkubierten Zellen von denen mit FAM-InsP₅ inkubierten Zellen subtrahiert. Damit konnte anhaftendes FAM-InsP₅ herausgerechnet werden. Um auf die aufgenommene InsP₅-Konzentration rückschließen zu können, wurde die Proteinkonzentration der entstandenen Zellysate via Bradford-Assay ermittelt (siehe dazu Abschnitt 2.2.2) und die Fluoreszenz pro μg Protein bestimmt.

Zur Untersuchung einer möglichen FAM-InsP₅-Aufnahme in humane Thrombozyten wurde humanes Plasma (Gewinnung siehe Abschnitt 2.2.5) in zwei Reaktionsgefäße umgefüllt und entweder mit 25 μM FAM-InsP₅ oder 9 μM DCF versetzt und für 4h bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 640g (2600rpm) bei 4 °C konnte der Überstand entnommen und das entstandene Pellett dreimalig mit modifiziertem Tyrode's Buffer gewaschen werden. Nach abschließender Zentrifugation bei 640g (2600rpm) wurde das Zellpellet in MPER-Puffer resuspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem der vorherigen Zellreihen.

2.2.9 Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der InsPs auf das Zellwachstum wurden Fibroblasten und RAW264.7-Zellen getrennt voneinander in eine 96-well-Mikrotiterplatte gesät (je 1×10^4 Zellen pro Kammer) und bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt für 24 h inkubiert. Dann wurden zum jeweiligen Medium vorsichtig je 25 μM FAM-InsP₅, 16 μM InsP₆ oder 9 μM Fluorescein hinzugefügt. Ein Ansatz diente als Kontrolle (keine Intervention). Nach erneuter Inkubation für 24 h wurde in jede Kammer 10 μl MTT (50mg/ml) hinzugegeben und diese für 3 h bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Lebende Zellen nehmen MTT auf und transportieren es in ihre Mitochondrien. Dort wird es zu lilafarbenem Formazan reduziert (van Meerloo et al., 2011). Neuere Untersuchungen ergaben auch eine extramitochondriale Formazansynthese im Zytosol sowie in den Lysosomen (Bernas und Dobrucki, 2002; M. V. Berridge und Tan, 1993).

Nach Entnahme des überschüssigen Mediums wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit je 200 μl DMSO lysiert. Formazan löste sich in dem organischen Lösungsmittel und konnte spektroskopisch bei 540nm gemessen werden. Die Umsetzung von MTT in Formazan gab Aufschluss auf die Zellaktivität und damit auf die Anzahl lebender Zellen (van Meerloo et al., 2011). Ein Vergleich des Zellwachstums

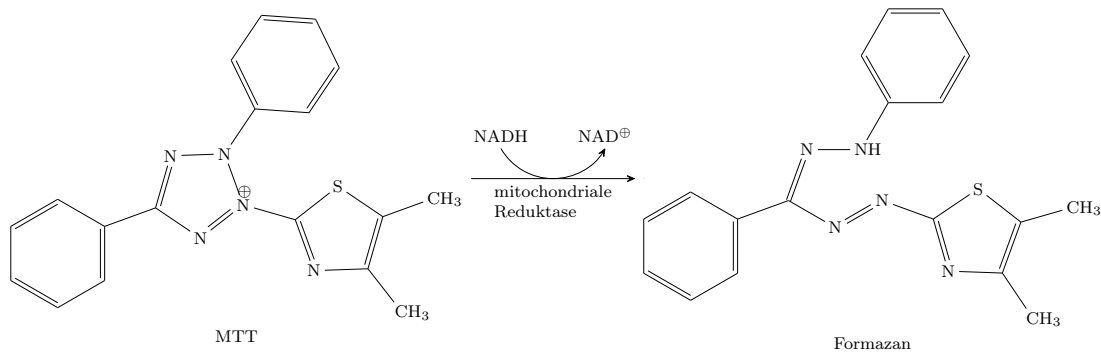


Abbildung 10: Umsetzung von MTT in Formazan, adaptiert an (Sittampalam et al., 2004).

der Einzelproben ließ dadurch Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der Zellviabilität durch InsPs zu.

2.2.10 Cone and Plate(let) Analysis (CPA)

Um einen Effekt von InsPs auf die Thrombozytenaggregation unter annähernd physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde durch die AG Brehm des UKE die CPA durchgeführt (vgl. dazu (Savion und Varon, 2006)). Hierbei wurde mit Natriumcitrat versetztes venöses Vollblut (im Folgenden als Vollblut bezeichnet), bzw. aufgereinigte und mit 45 % Hämatokrit versetzte Thrombozyten (im Folgenden als gewaschenes Blut bezeichnet) verwendet. Zu Blutentnahme und Aufreinigung von Thrombozyten und Erythrozyten siehe Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6.

In der CPA werden je $130\mu\text{l}$ einer Blutprobe in ein Polystyrol- (PS-)Gefäß gegeben. Die im Blut befindlichen Plasmaproteine binden dabei an die PS-Oberfläche. Durch kontinuierliche Rotation produziert der CPA-Apparat für 2 Minuten auf der gesamten Oberfläche der PS-Gefäße einen laminaren Fluss mit einer definierten Scherkraft von 720rpm ($1800/s$).

Hierunter binden nur Thrombozyten, keine anderen Blutzellen, an die Gefäßoberfläche und formen langstreckige Aggregate. Nach vorsichtiger Aufreinigung der Probe mit PBS und Färben mit May-Grünwald-Färbelösung, wurde das Probengefäß fotografiert. Anhand des Fotos konnte die durchschnittliche Oberfläche (in %) errechnet werden, welche mit Thrombozytenaggregaten bedeckt war. Durch unterschiedliche Zusammensetzung der Blutproben konnte so eine Wirkung verschiedener Agenzien auf die Aggregatgröße und damit auf die Thrombozytenaktivierung untersucht wer-

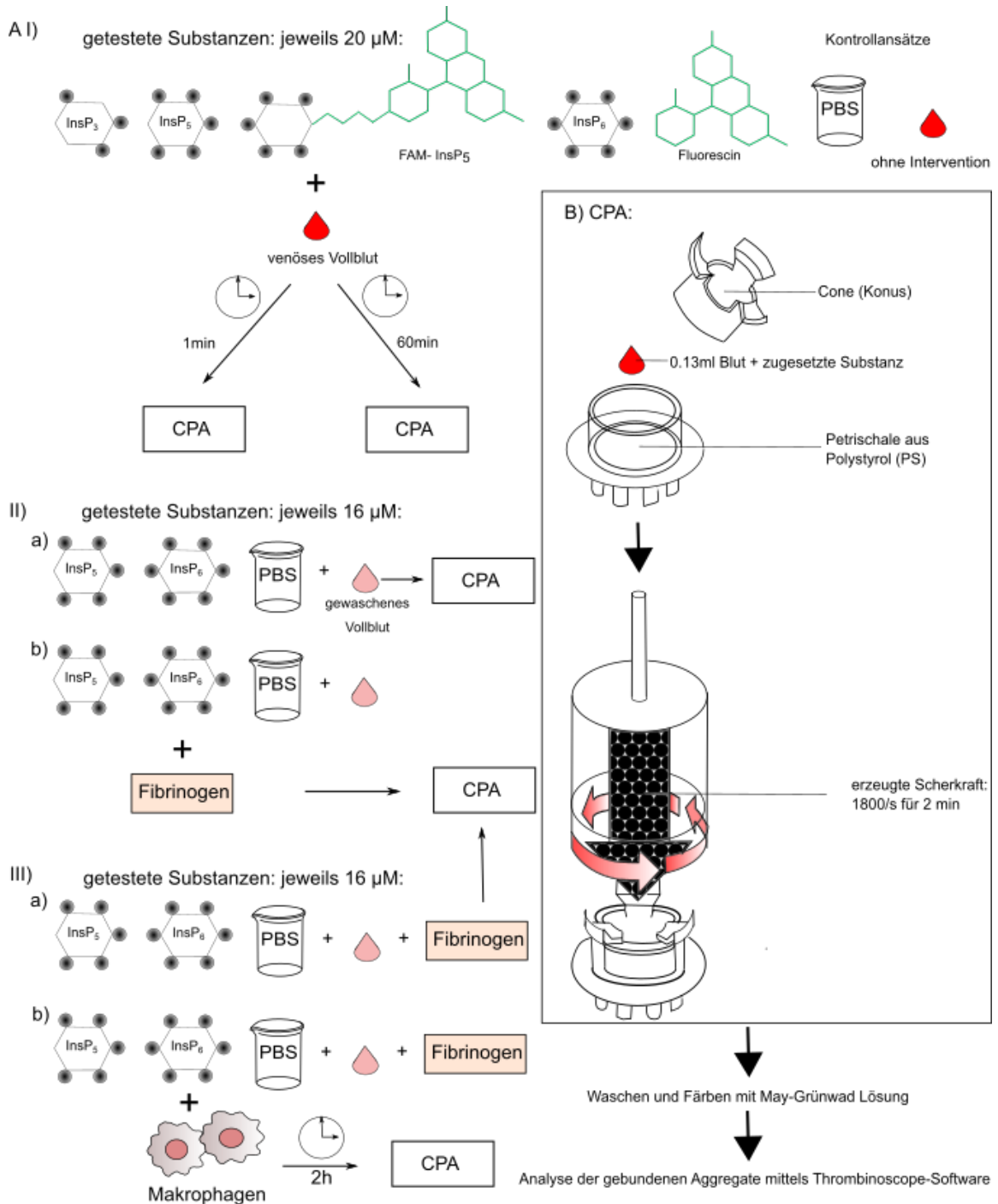


Abbildung 11: A) schematische Versuchsdurchführung (I-III) und B) schematischer Aufbau der CPA, adaptiert an (Savion und Varon, 2006).

den.

In einem ersten Ansatz wurde zu Vollblut je $20\mu M$ InsP₃, InsP₅, FAM-InsP₅, InsP₆ oder Fluorescein pipettiert und die Probe für 1 min bei $10rpm$ gemischt. Als Kontrolle diente Vollblut, welches mit gleichen Volumina PBS versetzt wurde bzw. Vollblut ohne jegliche Intervention (untreated). Ein Probenatz (sieben Einzelproben) wurde nun direkt in der CPA gemessen, ein zweiter für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Proben alle 15 min für 1 min bei $10rpm$ durchmischt wurden. Erst dann wurde auch hier eine CPA durchgeführt.

Im zweiten Ansatz wurde gewaschenes Blut mit je $16\mu M$ InsP₅, InsP₆ oder PBS versetzt. Ein zweiter Probenansatz enthielt bei gleicher Zusammensetzung zusätzlich $150mg/dl$ Fibrinogen.

Der dritte Ansatz erfolgte mit gewaschenem Blut und $150mg/dl$ Fibrinogen, sowie entweder $16\mu M$ InsP₅, InsP₆ oder PBS. Ein zweiter Probenansatz enthielt jeweils zusätzlich 6×10^4 Makrophagen. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur. Dann erfolgte auch hier eine CPA. Jeder Probenansatz wurde in drei unabhängigen Einzelmessungen mit Blut von drei unterschiedlichen Spendern jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur besseren Verdeutlichung siehe Abb. 11.

2.2.11 Messung der Thrombin-Bildung (CAT)

Die CAT (calibrated automated thrombin generation) misst die Menge an Thrombin, die pro Zeiteinheit gebildet wird (Hemker et al., 2003). Die Experimente wurden durch Prof. Rauch der Universität Greifswald durchgeführt. Dazu wurde venöses, mit Natriumcitrat versetztes humanes Vollblut gesunden Spendern entnommen und für 45 s bei Raumtemperatur und $1000g$ zentrifugiert. Das so entstandene Plasma wurde vorsichtig abpipettiert. $40\mu l$ Plasma wurden mit 10 bzw. $30\mu M$ InsP₆ oder $10\mu M$ ADP für 10 min bei $37^\circ C$ in einer 96-well-Mikrotiterplatte inkubiert. Eine weitere Probe diente als Kontrolle (keine Intervention). Nach Zugabe von $3pM$ Tissue Factor und $20\mu l$ $20mM$ HEPES (pH 7,35), versetzt mit $60g/l$ BSA, $100mM$ CaCl₂ und $2,5mM$ des Thrombin-spezifischen fluorogenen Substrats (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), startete die Thrombinsynthese. Gemessen wurde bei $37^\circ C$ für 90 min, jedes Experiment wurde insgesamt viermal durchgeführt. Eine Sichtbarmachung der Thrombinsynthese gelang

dadurch, dass neu gebildetes Thrombin das fluorogene Substrat spaltete. Dabei wurde fluoreszierendes AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) frei, welches photometrisch bei Exzitation/Emission 390/460nm im Fluorimeter gemessen werden konnte. In einer Paralleltestung wurde gebildetes AMC einer bekannten Thrombinkonzentration (dem Thrombinkalibrator) detektiert. Die gemessene Fluoreszenz pro Zeit gab dabei Aufschluss über die Menge an Thrombin in der Probe. Durch Analyse mit der Thrombinoscope®-Software konnten Messkurven erstellt werden, die Aufschluss auf die Thrombinaktivität gaben. Die maximal gebildete Thrombinkonzentration entspricht dabei dem höchsten Punkt der Kurve. Die Fläche unter der Kurve beschreibt das sogenannte „endogene Thrombinpotenzial“ (Hemker und Béguin, 1995). Dies ist die Menge an Substrat, die potenziell von Thrombin gespalten werden kann. Als „lag time“ wird eine mögliche Verzögerungsphase bezeichnet, also ein verspäteter Anstieg der Kurve. Ein Vergleich der Messkurven gab Aufschluss auf eine Beeinflussung der Thrombinsynthese durch InsPs.

2.2.12 Life-Cell-Imaging (LCI)

Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, nutzten wir das LCI. Hierbei fotografierte ein Fluoreszenzmikroskop regelmäßig alle eingestellten Ebenen. Dadurch konnten Zellbewegungen und Bewegungsabläufe von Strukturen in Echtzeit verfolgt und dokumentiert werden (D. J. Stephens und Allan, 2003).

Die lange Beobachtungszeit erforderte eine besondere Umgebung, um die Zellen am Leben zu erhalten: Ein optimaler CO₂-Gehalt, ein Temperaturoptimum und eine hohe Luftfeuchte waren die Voraussetzung für ein gutes Endergebnis. Durch Verwendung einer LCI-Kammer konnten Zellen bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt sowie gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert werden. Damit wurde versucht, physiologischen Verhältnissen so nahe wie möglich zu kommen.

Zur Beurteilung einer direkten Wirkung von InsPs auf Thrombozyten wurde je 100µM humanes Plasma (Gewinnung siehe Abschnitt 2.2.5) mit 16µM InsP₅ bzw. 16µM InsP₆ in eine 4-Kammer-Zellkulturschale pipettiert. Zwei Kammern dienten als Kontrolle (keine Intervention). Mittels Time-lapse-Analyse konnte im Fluoreszenzmikroskop alle 5 min ein Bild aller vier Kompartimente aufgenommen werden. Insgesamt wurden sechs LCIs mit Plasma vier unterschiedlicher Probanden für jeweils 16 h durchgeführt.

2.2.13 Fibrinpolymerisierung mit (FAM-)InsP₅ und Thrombozyten

Dieser Versuchsaufbau orientierte sich an (Gailit et al., 1997). Zur Synthese von Fibrinpolymeren wurden $3\mu\text{l}$ Fibrinogen der Konzentration 10mg/ml bzw. 29nM in $300\mu\text{l}$ Polymerisierungspuffer (siehe Abschnitt 2.1.6) gelöst und in $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäße überführt. Durch Zufügen von $2,76\mu\text{l}$ Thrombin ($0,1\text{U/ml}$) wurde die Polymerisierungsreaktion gestartet. Die Reaktionsgefäße wurden nun vorsichtig über Kopf geschwenkt, $50\mu\text{l}$ wurden in die Kammern einer 8-well-Zellkulturplatte pipettiert. Zur restlichen Probe wurde $25\mu\text{M}$ FAM-InsP₅-Lösung gegeben. Nach erneutem vorsichtigem Schwenken wurden auch hier je $50\mu\text{l}$ in zwei weitere Kammern der Zellkulturplatte pipettiert.

Um eine mögliche Wirkung der InsPs auf Thrombozyten zu untersuchen, wurden in einem zweiten Ansatz aufgereinigte humane Thrombozyten (siehe Abschnitt 2.2.5) zur Fibrinogen-Thrombin-Lösung gegeben. $50\mu\text{l}$ wurden direkt in eine Zellkulturschale pipettiert, zum restlichen Ansatz wurde $25\mu\text{M}$ InsP₅ hinzugefügt. Das weitere Procedere entsprach der ersten Versuchsreihe.

Alle Proben wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt über Nacht getrocknet und im Anschluss drei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen, um Salzurückstände und überschüssige InsPs zu entfernen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten die Fibrinpolymere bei 60-facher Vergrößerung im Öl-Immersionsobjektiv betrachtet werden. Insgesamt wurden drei Einzelexperimente jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.14 Aufnahmekapazität von FAM-InsP₅ in RAW264.7-Makrophagen

RAW264.7-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und mit 0, 12,5, 25, 50, 100 und $200\mu\text{M}$ FAM-InsP₅-Lösung für 16 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben dreimalig mit PBS gewaschen und mit DMSO lysiert. Nach Zentrifugation bei $16000g$ (13000rpm) für 30 min wurde der Überstand im Fluorimeter bei 490nm gemessen und die Fluoreszenz pro μg Protein berechnet.

2.2.15 Statistik

Zur Durchführung ungepaarter T-Tests (engl. unpaired t tests) wurde GraphPad Prism, Version 5.0 für Windows verwendet. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Dargestellt sind erhobene Mittelwerte $\pm$ SD aus mindestens drei voneinander unabhängigen Einzelexperimenten.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwieweit InsPs (und hierbei insbesondere InsP₅ und InsP₆) einen Einfluss auf die Blutgerinnung ausüben. Dabei wurde einerseits die zelluläre Gerinnung (eine Beeinflussung der Thrombozyten), zum anderen die plasmatische Gerinnung (eine Wirkung auf die Gerinnungskaskade) untersucht. Zusätzlich wurden mögliche Mechanismen betrachtet, die InsPs aus dem Blut eliminieren können. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind im Folgenden dargelegt.

3.1 InsPs beeinflussen die Thrombozytenaggregatgröße

Um zu untersuchen, ob bzw. inwieweit InsPs die Thrombozytenaggregation beeinflussen, wurden humane Thrombozyten gemeinsam mit $16\mu M$ InsP₆ über Nacht im Life-Cell-Imaging inkubiert. Dabei wurden die Zellen alle fünf Minuten via Time-Lapse-Analyse fotografiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde Plasma vier unterschiedlicher Probanden in insgesamt sechs voneinander unabhängigen Einzelexperimenten untersucht.

Dabei bildeten sich nur im Ansatz von Plasma mit InsP₆ Thrombozytenaggregate, wohingegen der Kontrollansatz ohne Zugabe von InsPs jeweils aggregatfrei blieb. Die Aggregatbildung setzte innerhalb von 20 bis 60 min ein. Eine beispielhafte Aufnahme zu Beginn sowie nach 45 min sei in Abb. 12 dargestellt.

Zur Verifizierung des LCI sowie zur quantitativen Bestimmung der Aggregatgröße wurde durch die AG Brehm, UKE, im Anschluss eine CPA durchgeführt: Gewaschenes Vollblut wurde entweder mit je $20\mu M$ InsP₃, InsP₅, FAM-InsP₅, InsP₆ oder Fluorescein (als farbstoffgebende Gruppe des FAM-InsP₅) inkubiert und die Aggregatgröße nach 1 min sowie nach 60 min bestimmt. Als Kontrolle diente gewaschenes Vollblut ohne jegliche Intervention (untreated) sowie mit PBS versetztes Vollblut.

Wie Abb. 13 zeigt, nahm in Anwesenheit von InsP₅ und InsP₆ die Größe der Thrombozytenaggregate im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Dabei wurden die Aggregate umso größer, je mehr Phosphatreste am Inositol gebunden waren. Während InsP₃ keinerlei Wirkung erzielte, stieg die Aggregatgröße unter InsP₅ leicht an. Die größten Aggregate bildeten sich bei Inkubation von Plasma mit InsP₆.

Zudem wird deutlich, dass der Effekt von InsPs auf die Thrombozytenaggregation

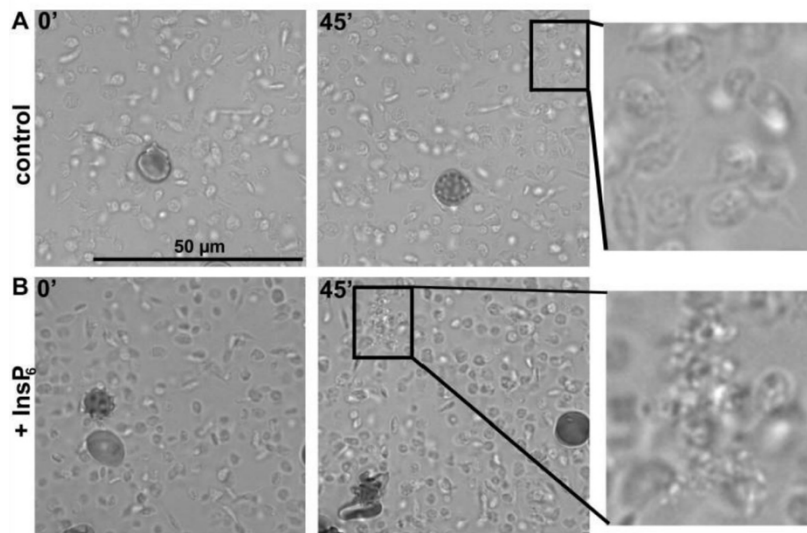


Abbildung 12: LCI mit humanen Thrombozyten unter Zugabe von InsP_6
 Humanes Plasma wurde via LCI ohne (A) bzw. mit (B) $16\mu\text{M}$ InsP_6 für insgesamt 16 h inkubiert. Abgebildet ist je eine Aufnahme zu Beginn (0') sowie nach 45-minütiger Inkubation (45'). Es wurden sechs Einzelproben mit Blut vier unterschiedlicher Probanden untersucht. Nach 20-60 min formten sich dabei nur im Beisein von InsP_6 großflächige Thrombozytenaggregate. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment, hierbei bildeten sich erste Cluster nach 45 Minuten (siehe Vergrößerung in B).

in der CPA sehr schnell ist: bereits nach einminütiger Inkubation war eine deutliche Zunahme der Aggregatgröße messbar, die im Verlauf kaum noch zunahm. Insgesamt stieg die Aggregatgröße unter Zugabe von InsPs (beispielhaft für InsP_6 berechnet) auf 89% gegenüber der Kontrollgruppe.

Die geringe Wirkung von FAM- InsP_5 führten wir darauf zurück, dass die Fluorescingruppe möglicherweise aggregationshinderlich wirkte und eine räumliche Annäherung der Thrombozyten zueinander verminderte.

Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass InsPs (und hierbei v.a. InsP_5 und InsP_6) die Thrombozytenaggregation beeinflussen.

3.2 InsPs aktivieren Thrombozyten weder direkt noch indirekt

Um zu untersuchen, ob InsPs direkt mit Thrombozyten interagieren, beispielsweise durch direkte Bindung an die Thrombozytenoberfläche oder durch Aufnahme in die Thrombozyten via Endozytose, wurde humanes Plasma mit fluoreszierendem FAM-

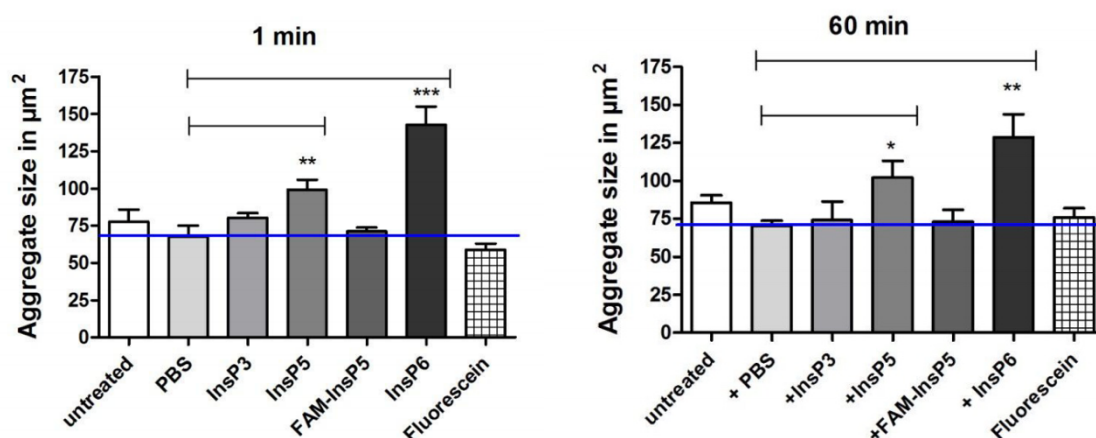


Abbildung 13: CPA unter Zusatz unterschiedlicher InsPs und Fluorescein.

Humanes Vollblut wurde für 1 min bzw. für 60 min mit je $20\mu\text{M}$ InsP₃, InsP₅, FAM-InsP₅, InsP₆ oder Fluorescein inkubiert. Als Kontrolle diente Vollblut, welches ohne jegliche Intervention belassen (untreated) bzw. mit PBS versetzt wurde. Proben wurden für 2 min einer Scherkraft von 720 rpm (1800/s) in der CPA ausgesetzt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Aggregate mit May-Grünwald-Lösung gefärbt und mit dem Image Analyzer des Impact-R-Device vermessen. Die Experimente wurden durch die AG Brehm (UKE) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD drei unabhängiger Einzelexperimente, jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Begriffserklärung: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

InsP₅ für 5 min inkubiert und anschließend mit PFA fixiert. Nach Entfernen von ungebundenem FAM-InsP₅ wurden die Thrombozyten im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. FAM-InsP₅ fluoresziert bei Extinktion/Emission 490/535nm. Gäbe es eine direkte Wirkung von InsP₅ auf die Thrombozyten, müsste fluoreszierendes InsP₅ auf der Thrombozytenoberfläche gebunden sein. Die anschließende Z-Stack-Analyse mit 3D-Rekonstruktion würde es ermöglichen, internalisiertes InsP₅ zu detektieren.

Die Fluoreszenzmikroskopanalyse zeigte jedoch, dass FAM-InsP₅ weder an der Oberfläche der Thrombozyten, noch in ihrem Inneren zu sehen war (vgl. Abb.14). Das grünliche Signal zwischen den weißen Thrombozyten sowie am Bildoberrand ist auf verbliebenes, nicht vollständig durch Waschen zu entfernendes FAM-InsP₅ im umgebenden Medium zurückzuführen.

Zur Verifizierung dieser Erkenntnis wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Hierbei wurde die Fluoreszenz der löslichen Zellfraktionen photometrisch gemessen. Somit konnte nur internalisiertes FAM-InsP₅ detektiert werden. Dazu wurden Thrombozyten gemeinsam mit FAM-InsP₅ für vier Stunden inkubiert. Als Positivkontrol-

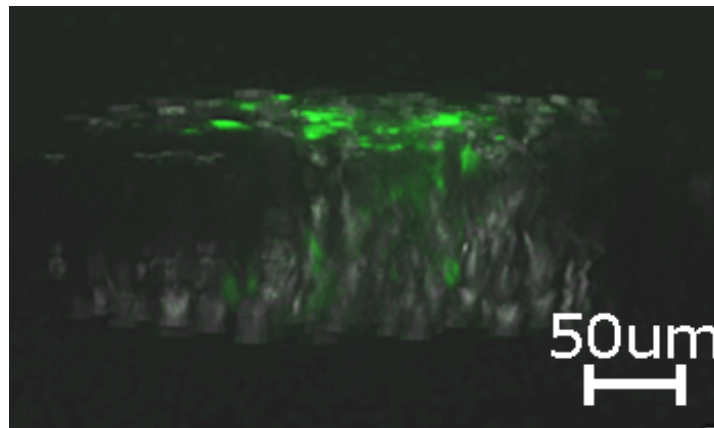


Abbildung 14: 3D-Rekonstruktion nach Inkubation mit (FAM-)InsP₅ und Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten wurden für 5 min mit 25 µM FAM-InsP₅ inkubiert und anschließend in 4% PFA fixiert. Nach vorsichtigem Waschen mit PBS wurde die FAM-InsP₅-vermittelte Fluoreszenz via Z-Stack-Analyse bei 50-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Anschließend wurde aus den Z-Stacks ein 3D-Bild errechnet. (Die verbleibende grünliche Färbung zwischen den Thrombozyten sowie am Bildoberrand ist auf im Überstand gelöstes FAM-InsP₅ zurückzuführen).

le dienten Fibroblasten. Von diesen war bereits eine große Aufnahmekapazität für (FAM-)InsP₅ bekannt (Riley et al., 2014). Nach gründlichem Waschen und anschließender Zelllyse wurde die Fluoreszenz der Zelllysate im Fluorimeter detektiert (vgl. Abb. 15).

Es konnte jedoch keine Fluoreszenz in den Fraktionen der mit FAM-InsP₅ inkubierten

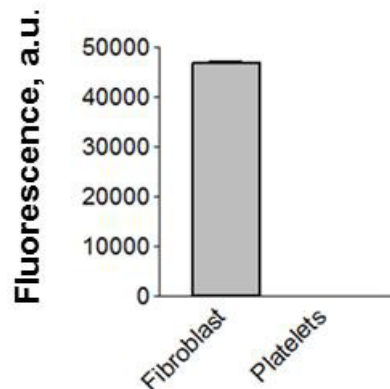


Abbildung 15: Photometrische Messung nach Inkubation mit (FAM-)InsP₅. Fibroblasten und Thrombozyten wurden mit je 25 µM FAM-InsP₅ für 4 h inkubiert und anschließend lysiert. FAM-InsP₅-vermittelte Fluoreszenz der löslichen Zellfraktionen wurde im Fluorimeter detektiert und per µg Protein bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei Einzelmessungen.

Thrombozytenlysate gemessen werden.

Somit bindet InsP₅ weder direkt an die Thrombozytenoberfläche, noch wird es über Endozytose aufgenommen.

Zur Untersuchung einer indirekten Wirkung der Inositolphosphate auf die Thrombozytenaggregation führte Prof. Rauch, Universität Greifswald, eine CAT durch. Hierbei wird die Menge an Thrombin gemessen, die pro Zeiteinheit (hier in nM/min) gebildet wird. Damit kann eine Beeinflussung der Gerinnungskaskade bis hin zur Thrombinspaltung gemessen werden. Möglicherweise führen InsPs zu einer vermehrten Thrombinbildung und so indirekt zu einer verstärkten Aggregation der Thrombozyten durch Aktivierung der Gerinnungskaskade.

Für die CAT wurde humanes Plasma mit $10\mu\text{M}$ bzw. $30\mu\text{M}$ InsP_6 inkubiert. Als Negativkontrolle diente Plasma ohne jegliche Intervention, als Positivkontrolle diente ADP.

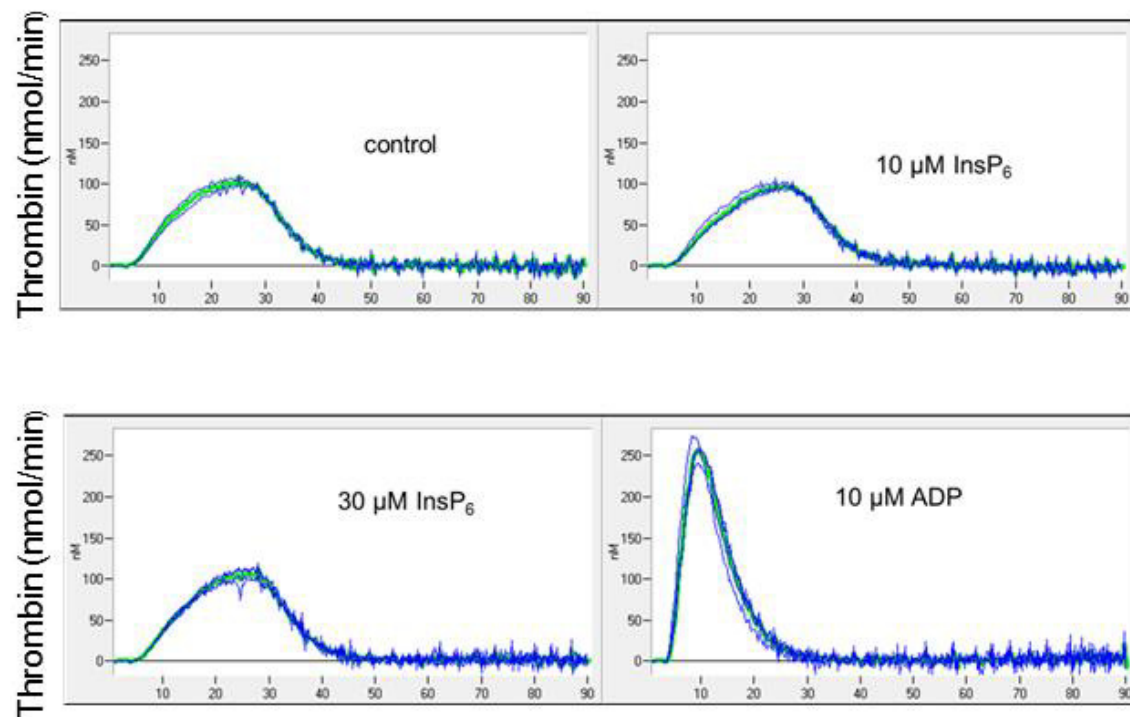


Abbildung 16: CAT-Analyse mit InsP_6 und ADP.

Humanes Plasma wurde mit 10 bzw. $30\mu\text{M}$ InsP_6 sowie $10\mu\text{M}$ ADP inkubiert. Als Kontrolle diente humanes Plasma ohne Intervention (control). Anschließend wurde die Thrombinsynthese durch Zugabe von CaCl_2 und TF gestartet. Mittels CAT wurde die Thrombinbildung in nmol/min fluorimetrisch bestimmt. Die Experimente wurden durch Prof. Rauch, Universität Greifswald, durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus insgesamt drei Einzelmessungen.

Abb. 16 zeigt das Ergebnis einer repräsentativen Einzelmessung. Hierbei ließ sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit InsP_6 versetzten Proben in Bezug auf endogenes Thrombin-Potenzial (ETP), Peak level und lag time detektieren.

(siehe Abschnitt 2.2.11). Daher ist davon auszugehen, dass die InsP₆-vermittelte Aggregation nicht aus einer vermehrten Thrombinbildung und somit indirekten Thrombozytenaktivierung resultiert.

3.3 Die aggregatfördernde Wirkung der InsPs ist Fibrinogenvermittelt

Möglicherweise beruht die aggregatfördernde Wirkung der InsPs auf einer Interaktion mit einem Protein, welches seinerseits an Thrombozytenoberflächen binden kann. Über dieses „Verbindungsmolekül“ könnte die Thrombozytenaggregation dann sekundär beeinflusst werden. Seit Kurzem ist bekannt, dass InsP₅ spezifisch an Fibrinogen binden kann (Grint et al., 2012). Fibrinogen seinerseits bindet über den GPIIbIIIa-R an Thrombozyten (Bergmeier und Hynes, 2011). Auch wenn Fibrinogen Teil der Gerinnungskaskade ist, kann es durch die CAT nicht gemessen werden, da Fibrinogen bekanntermaßen erst durch Thrombin gespalten und vernetzt wird. Eine Beeinflussung der Thrombozytenaggregation durch Fibrinogen wäre daher in der CAT nicht messbar.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde gewaschenes Vollblut mit entweder PBS, InsP₅ oder InsP₆ sowie in einem Ansatz mit 150mg/dl Fibrinogen für zwei Stunden inkubiert. Ein Kontrollansatz blieb bei ansonsten gleicher Zusammensetzung fibrinogenfrei. Durch die Verwendung gewaschenen Blutes konnte sichergestellt werden, dass außer dem zugefügten Fibrinogen alle Serumproteine fehlten. Im Anschluss wurde durch die AG Brehm, UKE, eine CPA durchgeführt.

Abb. 17 zeigt, dass ohne Zugabe von Fibrinogen (A) weder InsP₅ noch InsP₆ eine relevante Veränderung der Aggregatgröße bewirken. Unter Einfluss von Fibrinogen (B) steigt jedoch die Aggregatgröße im Vergleich zur Kontrollprobe um etwa das Doppelte und entspricht damit in etwa der Größe von Aggregaten in humanem Vollblut. Die InsPs-bedingte Vergrößerung der Thrombozytenaggregate ist also fibrinogenvermittelt.

Zur Untersuchung der Qualität der Thrombozytenaggreagate, reicht die Aggregatgröße alleine nicht aus. Wichtig ist vor allem eine Beurteilung des Fibrinnetzwerkes. Fibrin entsteht bei der Polymerisierung von Fibrinogen. Physiologischerweise bildet sich dabei ein filigranes, fein verzweigtes, fädiges Netzwerk.

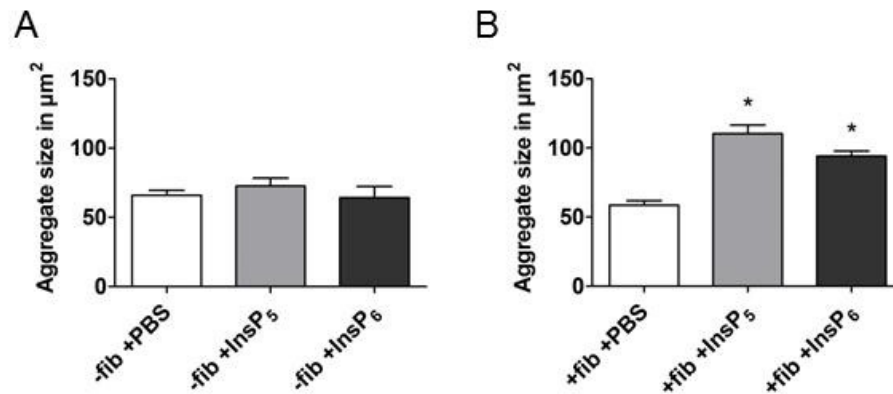


Abbildung 17: CPA mit InsP₅ und InsP₆ unter Zusatz von Fibrinogen.

Gewaschenes Blut wurde mit PBS, InsP₅ oder InsP₆ für zwei Stunden ohne (A) bzw. mit (B) 150mg/dl Fibrinogen inkubiert. Im Anschluss wurde eine CPA durchgeführt. Mittels Impact-R-Device konnte die durchschnittliche Aggregatgröße in μm^2 am Boden der PS-Gefäße bestimmt werden. Die Experimente wurden durch die AG Brehm (UKE) durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SD aus drei unabhängigen Einzelversuchen (jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt). *p < 0.05.

Durch Zugabe fluoreszierenden FAM-InsP₅ während der Fibrinpolymerisierung konnte eine direkte Wirkung des InsPs auf die Fibrininformation beurteilt werden. Als Kontrolle diente eine Probe ohne InsP-Zusatz. In einem zweiten Ansatz wurden gewaschene humane Thrombozyten zum Polymerisationsansatz pipettiert.

Abb. 18 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse: Bild A und C zeigen die Polymere ohne Zugabe von InsPs. Hierbei formte sich ein filigranes, dünnes und fein verzweigtes Fibrinnetz. Thrombozyten banden recht regelmäßig und in kleineren Aggregaten. Unter Zugabe von FAM-InsP₅ veränderte sich die Struktur dramatisch: Die feine netzartige Struktur wurde völlig zerstört, große Poren wechselten sich mit dichten, clusterartigen Aggregaten ab. Die einzelnen Fibrinfasern waren deutlich dicker, es gab kaum noch feine Verzweigungen. Das komplette Fibrinpolymer wirkte amorph und ohne jede Struktur. Insgesamt wurden deutlich mehr Thrombozyten gebunden, sie banden in großen Aggregaten. Im Fluoreszenzlicht fluoreszierte das Fibrinpolymer leuchtend grün (B). Das bedeutet, dass überall im Fibrinnetz InsP₅ gebunden wurde. Damit wird ersichtlich, dass InsP₅ (und damit wahrscheinlich auch InsP₆) nicht nur die Aggregatgröße, sondern die komplette Struktur von Fibrinpolymeren verändert. Es entsteht ein völlig ungeordnetes, amorphes Netzwerk.

InsPs haben damit eine Wirkung auf die sekundäre Hämostase, indem sie Struktur und Thrombozytenbindung in Fibrinpolymeren verändern.

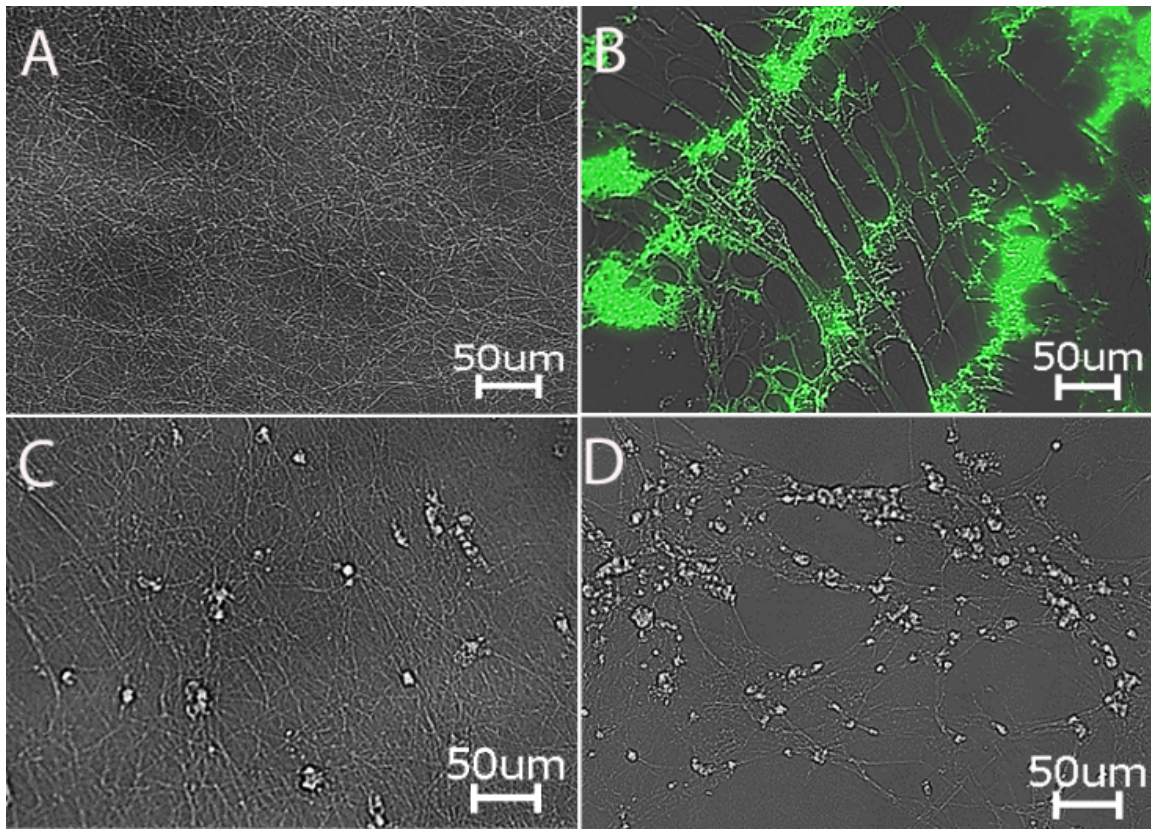


Abbildung 18: Fibrinpolymerisation mit (FAM-)InsP₅ und Thrombozyten. 29nM Fibrinogen wurde durch Zugabe von 0.1U/ml Thrombin polymerisiert. (B) und (D) zeigen den Versuchsansatz unter Zugabe von 25µM(FAM-)InsP₅. (C) und (D) zeigt das Fibrinnetzwerk nach Zufügen humaner Thrombozyten. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Einzelexperimenten.

3.4 Adhäsion und Phagozytose von InsPs durch Makrophagen

Wenn InsPs einen solchen Einfluss auf die Bildung der Fibrinnetzwerke und die Thrombusformation ausüben, muss es Mechanismen geben, die eine übermäßige Aggregation verhindern. Interessanterweise ist humanes Plasma komplett InsPs-frei (M. S. Wilson et al., 2015). Bereits bekannt ist, dass die MINPP1 im Blut vorhandene InsPs sehr effektiv spalten und abbauen kann (Windhorst et al., 2013). Möglicherweise gibt es jedoch zusätzlich auch noch zelluläre Mechanismen, um vorhandene InsPs zu eliminieren. Makrophagen sind als professionelle „Fresszellen“ ein vielversprechender Kandidat für diese Aufgabe. Zusätzlich spielen sie eine wichtige Rolle in der Wundheilung, indem sie zerstörtes Gewebe phagozytieren (siehe Abschnitt 1.2.5).

Im Folgenden wurde untersucht, ob Makrophagen in der Lage sind InsPs zu binden bzw. zu internalisieren. Dazu wurde die Mauszelllinie RAW264.7 verwendet. RAW264.7-Makrophagen wurden für 5 min mit FAM-InsP₅ inkubiert. Als Kontrolle dienten abermals Fibroblasten, da von ihnen eine hohe (FAM-)InsP₅-Aufnahmekapazität bekannt war (Riley et al., 2014).

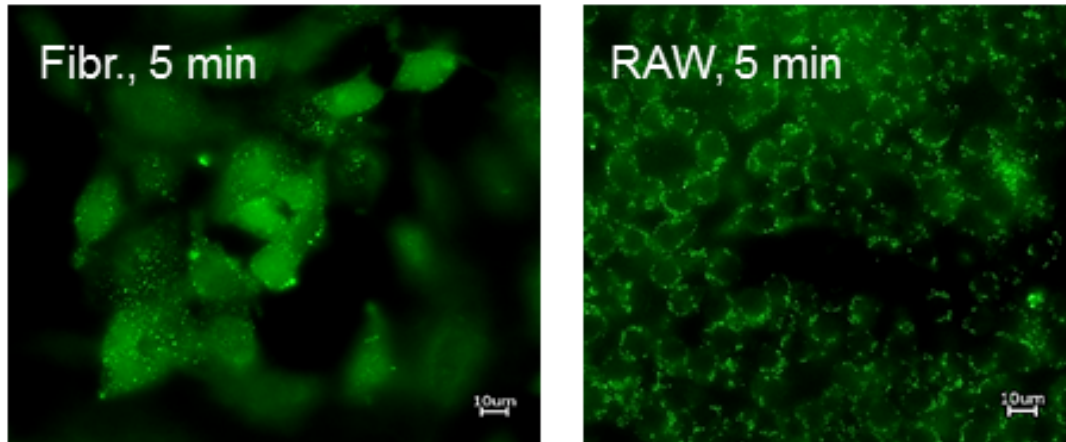


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation mit FAM-InsP₅. Fibroblasten (Fibr.) und RAW264.7-Zellen (RAW) wurden für 5 min mit 25µM FAM-InsP₅ inkubiert und in 50- bzw. 20-facher Vergrößerung per Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die punktförmigen grünen Aggregate stellen dabei von den einzelnen Zellen internalisiertes FAM-InsP₅ dar. Das grünliche Hintergrundleuchten entsteht durch Autofluoreszenz der Fibroblasten.

Die anschließende Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass beide Zellreihen große Mengen an FAM-InsP₅ an ihrer Oberfläche gebunden hatten (siehe Abb. 19).

Zur Bestimmung, ob InsP₅ nicht nur gebunden, sondern tatsächlich auch internalisiert wurde, wurde die Fluoreszenz in gewaschenen Zelllysaten beider Zellreihen nach Inkubation mit FAM-InsP₅ unterschiedlicher Dauer bei 490nm gemessen.

Abb. 20 bestätigt, dass sowohl Fibroblasten als auch RAW264.7-Zellen in der Lage sind FAM-InsP₅ zu internalisieren. Fibroblasten nehmen dabei FAM-InsP₅ schneller auf, während RAW264.7 insgesamt eine größere Gesamtmenge internalisieren können.

RAW264.7-Zellen sind also in der Lage größere Mengen an FAM-InsP₅ nicht nur an ihrer Oberfläche zu binden, sondern es auch aufzunehmen. Da es sich bei dieser Zelllinie jedoch um Mausmakrophagen handelt, wurde im Folgenden versucht, die Ergebnisse auch mit humanen Makrophagen zu reproduzieren. Hierzu wurden humane

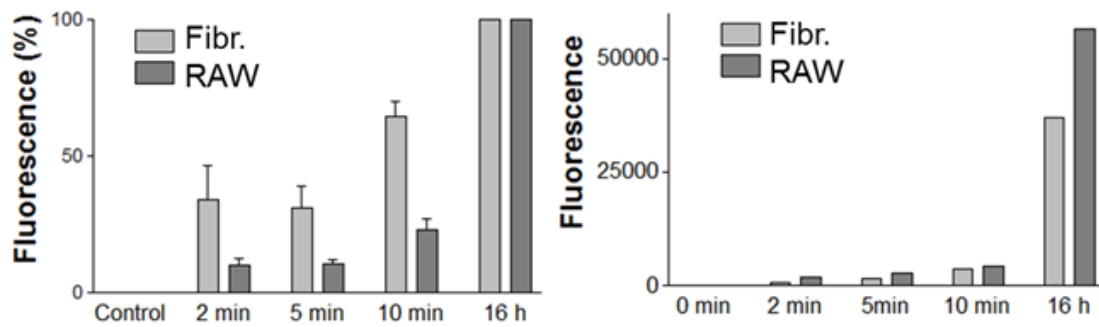


Abbildung 20: Fluoreszenzanalyse von Zelllysaten nach Inkubation mit FAM-InsP₅. Fibroblasten (Fibr.) und RAW264.7-Zellen (RAW) wurden mit 25 µM FAM-InsP₅ für die dargestellte Dauer inkubiert und anschließend lysiert. Gemessen wurde die Fluoreszenz der löslichen Zellfraktionen bei 490 nm. Berechnet wurde die Fluoreszenzintensität pro µg Protein. Linke Darstellung: Die Fluoreszenzintensität pro µg Protein nach 16-stündiger FAM-InsP₅-Inkubation wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Einzeluntersuchungen. Rechte Darstellung: Fluoreszenzintensität pro µg Protein, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus insgesamt drei unabhängigen Einzelmessungen.

Monozyten mit GM-CSF zu Makrophagen differenziert. Diese wurden dann für 16 h mit FAM-InsP₅ inkubiert.

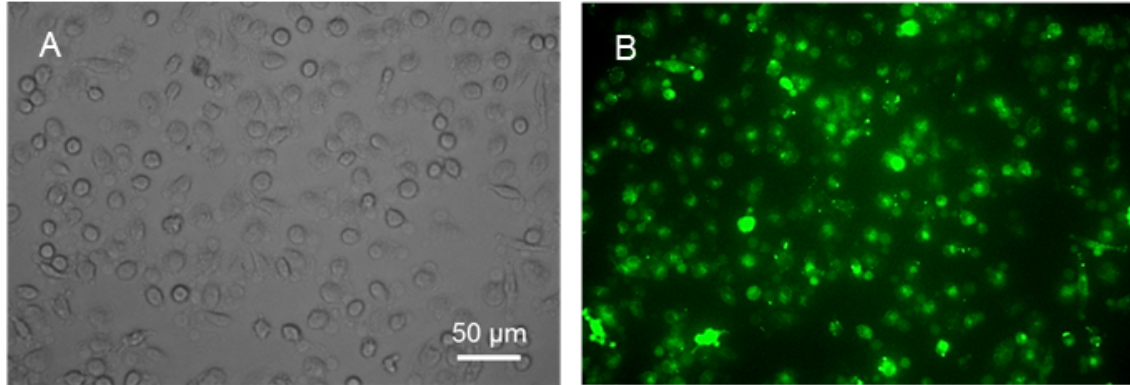


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie mit (FAM-)InsP₅ und humanen Makrophagen. Primäre humane Monozyten wurden mittels GM-CSF zu Makrophagen differenziert und für 16 h mit FAM-InsP₅ inkubiert. Anschließend wurden sie in 20-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. (A) zeigt die Monozyten im Durchlicht, (B) im Fluoreszenzlicht. Die grün leuchtende Fluoreszenz in (B) ist auf internalisiertes FAM-InsP₅ zurückzuführen.

Abb. 21 (B) zeigt, dass alle Makrophagen grün fluoreszierendes FAM-InsP₅ in großen Mengen aufgenommen haben. Damit ist bewiesen, dass humane Makrophagen, genau wie die aus der Maus, die Fähigkeit besitzen, InsP₅ in hohem Maße zu internalisieren.

Wenn Makrophagen (und ggf. auch Fibroblasten als weitere Akteure der Wundheilung) einen Mechanismus zur Elimination anfallender InsPs darstellen sollten, dann sollten größere Mengen aufgenommener InsPs die Zellviabilität nach Möglichkeit nicht beeinträchtigen. Inwieweit die Lebensfähigkeit der einzelnen Zellreihen durch höhere InsPs-Konzentrationen eingeschränkt wird, wurde mithilfe des MTT-Assays überprüft. Dazu wurden sowohl RAW264.7-Zellen, als auch Fibroblasten mit $25\mu M$ FAM-InsP₅, $16\mu M$ InsP₆ oder $9\mu M$ Fluorescein (zum Ausschluss eines Effektes der farbstoffgebenden Gruppe des FAM-InsP₅) für 24h inkubiert. Das Ergebnis zeigt Abb. 22:

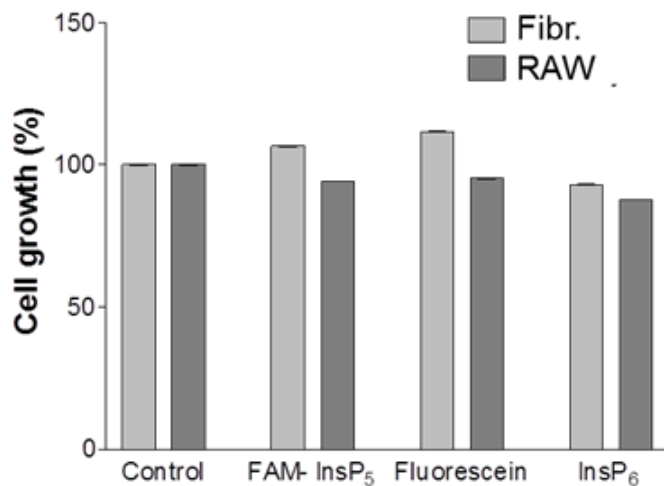


Abbildung 22: Zellviabilitätsassay mit InsPs und Fluorescein. Fibroblasten (Fibr.) und RAW264.7-Zellen (RAW) wurden mit $25\mu M$ FAM-InsP₅, $9\mu M$ Fluorescein oder $16\mu M$ InsP₆ inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne jegliche Intervention (control). Zellviabilität wurde als MTT-Umsatz nach 24-stündiger Inkubation gemessen. Die Messwerte der Kontrollmessung wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD aus mindestens drei unabhängigen Einzelmessungen.

Hierbei wird deutlich, dass weder Fibroblasten noch RAW264.7-Zellen in ihrer Lebensfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe durch die InsPs beeinträchtigt sind.

Makrophagen können also, ähnlich wie Fibroblasten, große Mengen an InsPs aufnehmen, ohne dadurch Schaden zu nehmen.

3.5 Makrophagen verhindern eine InsP-vermittelte Aggregation

Wenn Makrophagen in der Lage sind große Mengen an InsPs zu phagozytieren, vielleicht gelingt es ihnen dann auch, die InsP-vermittelte Thrombozytenaggregation zu verhindern oder die Aggregate zumindest zu verkleinern. Um diese These zu prüfen, wurde gewaschenes Blut unter Zusatz von Fibrinogen mit entweder InsP₅, InsP₆ oder

PBS versetzt. Ein Ansatz wurde mit RAW264.7-Makrophagen für zwei Stunden inkubiert. Ein Kontrollansatz blieb bei ansonsten gleicher Zusammensetzung frei von Makrophagen. Anschließend wurde durch die AG Brehm, UKE, eine CPA durchgeführt.

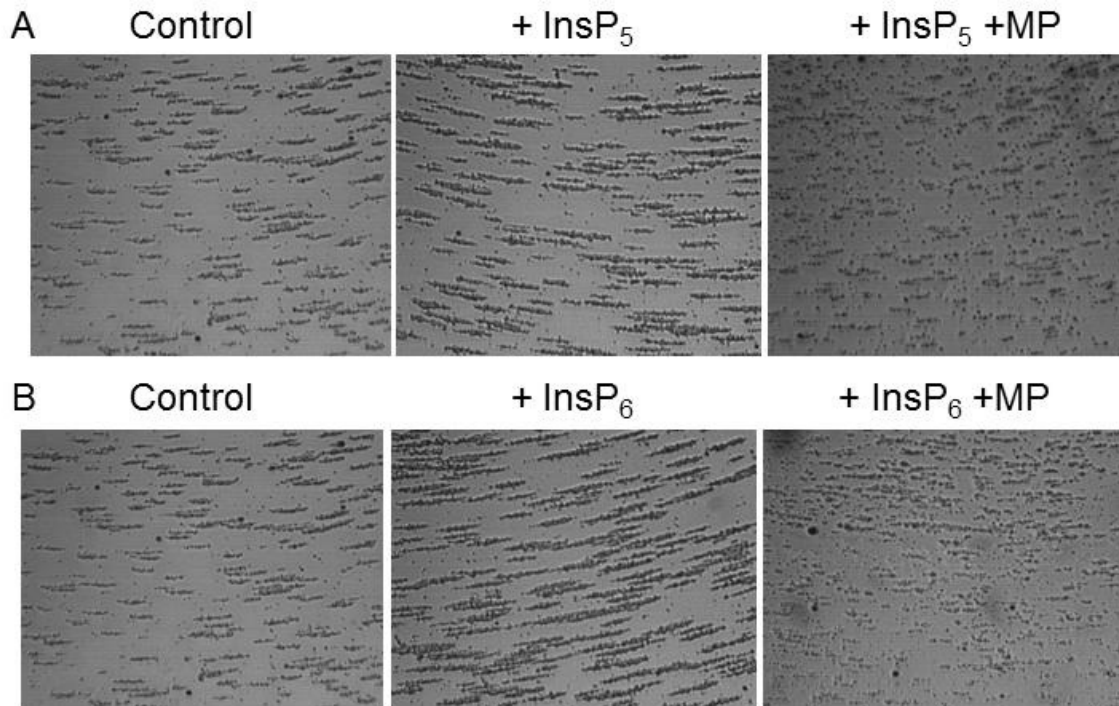


Abbildung 23: CPA-Analyse unter Zusatz von InsPs und Makrophagen.

Gewaschenes Blut wurde mit 150mg/dl Fibrinogen und PBS (control), $16\mu\text{M}$ InsP_5 oder InsP_6 für zwei Stunden ohne bzw. mit (+MP) Zusatz von 6×10^4 Makrophagen pro Test inkubiert. Mittels CPA wurde die Aggregatgröße gemessen, ausgewertet wurde mittels Impact-R-Device und Thrombinoscope-Software. Die Experimente wurden durch die AG Brehm (UKE) durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Einzelmessungen, jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

Eine Betrachtung der CPA-Aggregate unter dem Mikroskop (siehe Abb. 23) zeigte, dass die Thrombozytenaggregate unter Zusatz von Makrophagen deutlich kürzer und kleiner wurden als ohne Makrophagenzusatz.

In der quantitativen Messung (siehe dazu Abb. 24) wird deutlich, dass Makrophagen die komplette aggregatfördernde Wirkung der InsPs aufheben können. Die Aggregatgröße entspricht dabei der Kontrollgruppe. Da Makrophagen physiologischerweise im Blut vorkommen, wäre dies ein Effekt, der auch in vivo eine übermäßige Aggregation verhindern könnte.

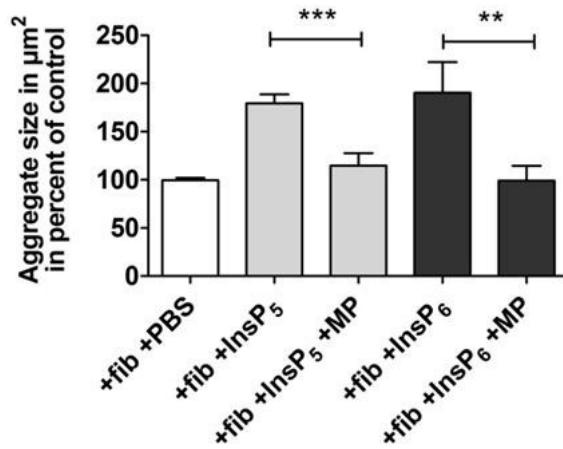


Abbildung 24: CPA-Analyse unter Zusatz von InsPs und RAW264.7-Makrophagen.

Gewaschenes Blut wurde mit 150mg/dl Fibrinogen und PBS (control), $16\mu\text{M}$ InsP₅ oder InsP₆ für zwei Stunden ohne bzw. mit (+MP) Zusatz von 6×10^4 RAW264.7-Makrophagen pro Test durchgeführt. Mittels CPA wurde die Aggregatgröße bestimmt. Die Experimente wurden durch die AG Brehm (UKE) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD aus mindestens drei voneinander unabhängigen Einzelexperimenten, jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

Interessant wäre das Ausmaß zu kennen, in welchem Makrophagen in der Lage sind, InsPs aus dem Blut zu entfernen. Bislang wurden niedrige physiologische InsPs-Dosierungen ($16\mu\text{M}$ InsP₅ und InsP₆, sowie $25\mu\text{M}$ FAM-InsP₅) eingesetzt.

Inwieweit Makrophagen auch bei höheren Konzentrationen InsPs internalisieren können, wurde in folgendem Experiment untersucht: Hierbei wurden RAW264.7-Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen an FAM-InsP₅ für 16 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Fluoreszenz der Zelllysate photometrisch bestimmt.

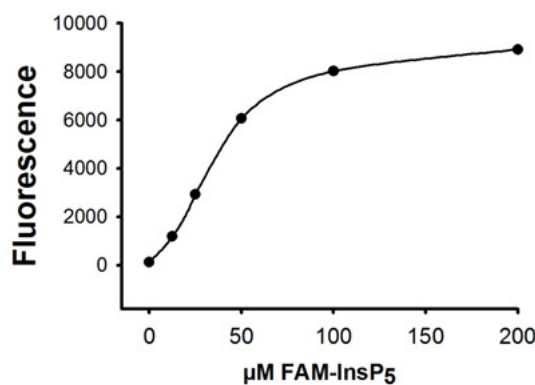


Abbildung 25: Aufnahmekapazität an FAM-InsP₅ in RAW264.7-Zellen.

RAW264.7-Zellen wurden mit $12.5, 25, 50, 100$ und $200\mu\text{M}$ FAM-InsP₅ versetzt und nach 16-stündiger Inkubationszeit lysiert. Bei 490nm wurde die Fluoreszenz der löslichen Zellfraktionen im Fluorimeter bestimmt. Fluoreszenzintensität pro μg Protein wurde berechnet. Dargestellt ist eine repräsentative Messung aus insgesamt drei voneinander unabhängigen Einzelexperimenten.

Die Auswertung in Abb. 25 zeigt deutlich, dass eine lineare Beziehung zwischen FAM-InsP₅-Konzentration und -aufnahme in die Makrophagen bis zu etwa $50\mu\text{M}$ besteht. Zwischen 50 und $100\mu\text{M}$ flacht die Kurve ab, die Aufnahmekapazität ist ge-

sättigt. Dies bedeutet, dass bei InsPs-Konzentrationen größer als $50\mu M$ Makrophagen nicht mehr in der Lage sind das Blut komplett von InsPs zu reinigen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war es, eine Wirkung von InsPs (und hier v.a. von InsP₅ und InsP₆) auf die Blutgerinnung zu untersuchen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass InsP₅ und InsP₆ die Größe von Thrombozytenaggregaten beeinflussen. Dabei wurden die Aggregate umso größer, je mehr Phosphatgruppen am Inositol gebunden waren. Den größten Effekt erzielte InsP₆. Die Wirkung der InsPs ließ sich dabei auf eine direkte Interaktion mit Fibrinogen zurückführen. Die Thrombinsynthese oder eine direkte Thrombozyteninteraktion blieben unbeeinflusst.

Zusätzlich veränderten InsP₅ und InsP₆ die Fibrinstruktur: Gebildete Fibrinfäden wurden dicker und hatten insgesamt mehr Thrombozyten gebunden; dabei war das Netz weniger fein verästelt und wies große Zwischenräume auf.

Bereits bekannt war die Elimination freier InsPs durch die MINPP1. Als zusätzlichen Mechanismus zeigten wir, dass auch Makrophagen in der Lage sind, InsPs bis zu Konzentrationen zwischen 50 und 100 μ M aus dem Blut zu eliminieren.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss der InsPs auf die Thrombozytenaggregation

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass InsPs die Größe von Thrombozytenaggregaten beeinflussen. Dabei ist die Wirkung auf die Aggregatgröße umso stärker, je mehr Phosphatreste am Inositol gebunden sind. Ein Grund hierfür könnte in der starken negativen Ladung der InsPs begründet sein: Dass negative Ladungen die Aggregation beeinflussen können, ist bereits von Polyphosphaten bekannt (Smith und Morrissey, 2014; Whyte et al., 2016). Der genaue Mechanismus ist bislang jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es wird eine Wirkung auf die Fibrinpolymerisierung angenommen (siehe 4.2.2).

Wir konnten zusätzlich und erstmalig zeigen, dass mit InsPs-gebildete Polymere insgesamt mehr Thrombozyten binden können. Von Polyphosphaten ist eine solche Eigenschaft nicht bekannt. InsPs unterscheiden sich in dieser Hinsicht von diesen. Möglicherweise können InsPs via Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-R (ein Fibrinogenre-

zeptor an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten) an Thrombozyten binden und diese quervernetzen. Dieses stünde im Einklang mit unseren Erkenntnissen, dass InsPs keine Wirkung auf inaktive Thrombozyten ausüben: InsPs konnten nicht direkt an der Thrombozytenoberfläche binden und Thrombozyten auch nicht direkt aktivieren.

Damit ist der Mechanismus der InsPs von einem weiteren Molekül unterschiedlich, welches ebenfalls viele Phosphatgruppen und somit auch eine starke negative Ladung besitzt, nämlich ADP. ADP bewirkt durch Bindung an den $P2Y_{12}$ -R eine direkte Thrombozytenaktivierung (van der Meijden et al., 2005).

InsPs werden nicht durch Endozytose in die Thrombozyten aufgenommen. Damit reagieren Thrombozyten anders als viele andere Zellreihen, für die eine unspezifische Endozytose für (FAM-)InsP₅ vermutet wird (Riley et al., 2014).

In der CAT ließ sich keine Wirkung der InsPs auf die Thrombinsynthese nachweisen. InsPs lassen die Thrombinsynthese und damit die plasmatische Gerinnung unbeeinflusst. Damit wirken InsPs in dieser Hinsicht anders als Polyphosphate (Smith et al., 2010): Polyphosphate aktivieren den intrinsischen Signalweg durch Interaktion mit den Gerinnungsfaktoren XII, XI, V und II und führen zu einem schnelleren Erreichen des Thrombinfunktions.

Der Mechanismus der InsPs zur Bildung von Thrombozytenaggregaten durch Bindung von Thrombozyten unterscheidet sich damit von ADP sowie von Polyphosphaten.

4.2.2 Wirkung auf die Fibrinpolymerisierung

Bereits bekannt war eine besondere Affinität von InsP₅ und InsP₆ für Fibrinogen (Grint et al., 2012). Unsere Arbeitsgruppe zeigt erstmalig, dass die aggregatfördernde Wirkung der InsPs in einer Interaktion mit Fibrinogen begründet liegt. Dabei verändern InsPs die Struktur von Fibrinpolymeren: Es wurden nicht nur mehr Thrombozyten gebunden, gebildete Fäden waren auch deutlich dicker; das gebildete Fibrinnetz war weniger verzweigt und wies große Poren auf.

Leider stellte sich im Verlauf dieser Dissertation heraus, dass das von uns verwendete InsP₅ mit geringen Mengen ADP verunreinigt war. Die nach der Laborarbeit dieser Doktorarbeit generierten Daten mit reinem InsP₅ konnten die aggregatfördernde und strukturstörende Wirkung des InsP₅ nicht mehr stützen. Ein Effekt von InsP₆ hingegen war weiterhin deutlich messbar.

Unser Ergebnis ist damit z.T. mit Grint (Grint et al., 2012) vereinbar. Dieser hatte keinen Effekt von InsP₅ auf die Fibrinpolymerisierung feststellen können. Interessanterweise konnte Grint jedoch auch keine Wirkung von InsP₆ auf Fibrinstruktur und Polymergröße finden. Der genaue Grund dafür ist bislang unklar, zumal wir in jeder durchgeführten Messung ein verändertes Fibrinnetzwerk feststellen konnten. Grint bestimmte die Polymere spektrophotometrisch bei 450nm (Wolberg et al., 2002). Obwohl diese Messung gängige Praxis ist, haben andere Arbeitsgruppen mehrheitlich bei 400 bzw. 405nm Fibrinpolymere gemessen (Smith et al., 2010; Wolberg et al., 2002). In zukünftigen Messungen sollte das Experiment bei diesen Wellenlängen wiederholt werden. Nicht bekannt ist, wie häufig Grint die photometrische Messung durchführte. Es ist jedoch anzunehmen, dass unsere Arbeitsgruppe insgesamt mehr Einzelmessungen durchgeführt hat. Zudem konnten wir durch Verwendung unterschiedlicher Methoden die aggregatfördernde Wirkung von InsP₆ auf die Fibrinpolymerisierung mehrfach reproduzieren.

Auch Polyphosphate können Fibrinogen mit hoher Affinität binden (Mutch et al., 2010). Von langkettigen Polyphosphaten wird angenommen, dass sie während der Fibrinpolymerisierung in die Fibrinfasern eingebaut werden und damit zu dickeren Fasern führen (Smith und Morrissey, 2014). Kurzkettige Polyphosphate führen hingegen zu keiner Zunahme der Faserdicke (Mutch et al., 2010). Der genaue Mechanismus ist bislang noch ungeklärt. Auch wir stellten mikroskopisch eine Zunahme der Faserdicke fest. Möglicherweise werden auch InsPs ins Faserinnere inkorporiert und wirken damit wie langkettige Polyphosphate. Eine genauere Messung des Faserdurchmessers könnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgen.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Fibrinpolymere im Beisein von (FAM-)InsP₅ einen veränderten Aufbau aufweisen: Fasern waren weniger verzweigt, dichte knotige Areale wechselten sich mit großen Poren ab. Interessanterweise konnte die AG Brehm (UKE) diese Beobachtung im Verlauf dieser Dissertation nicht reproduzieren. Dieses könnte auf zwei Gründe zurückzuführen sein: Einerseits verwendete die Arbeitsgruppe eine leicht veränderte Polymerisierungsmethode: Die Polymerisierung wurde dabei in humanem Plasma durchgeführt; anstelle des FAM-InsP₅ wurde InsP₆ verwendet, welches mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert wurde. Zum anderen wurde ein Konfokalmikroskop benutzt, um auch das Innere der Fibrinpolymere beurteilen

zu können. Hierbei konnten keine eindeutigen Veränderungen festgestellt werden. Die abweichenden Ergebnisse könnten nun entweder auf die veränderte Durchführung zurückgeführt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Poren und Cluster sich nur an der Polymeroberfläche befinden, das Innere der Polymere durch die InsPs jedoch unbeeinflusst bleibt. Dieses wäre mit dem Fluoreszenzmikroskop, welches ich verwendet habe, nicht zu sehen gewesen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die AG Brehm den insgesamt physiologischeren Ansatz gewählt hat, der die tatsächliche in-vivo-Situation besser widerspiegelt. Für genauere Analysen sollten die Polymere noch einmal elektronenmikroskopisch vermessen werden.

Ausgehend von meiner Datenlage scheinen InsPs (und hier scheinbar v.a. InsP₆) ähnlich wie kurzkettige Polyphosphate (mit etwa 60-100 Monomeren) zu wirken: auch hier sind dichte Areale und große Poren beschrieben worden (Mutch et al., 2010; Whyte et al., 2016). Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht gänzlich verstanden ist, wird vermutet, dass Polyphosphate durch ihre stark negative Ladung viele Fibrinogenmonomere binden, welche dann zu einem dichten Maschenwerk auspolymerisieren. Areale mit weniger Polyphosphaten binden daher weniger Fibrinogen und bilden dementsprechend Poren. Mutch (Mutch et al., 2010) zeigte, dass sehr kurze Polyphosphate ohne Effekt blieben. Wir konnten diesen Effekt mit InsP₃ reproduzieren. Auch hier ließ sich keine Wirkung nachweisen.

Der genaue Mechanismus könnte Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen sein. Anzunehmen ist, dass InsP₆ aufgrund seiner starken negativen Ladung an bestimmte Areale im Fibrinogen binden und damit eine bessere Ausgangssituation zur Polymerisierung schaffen kann. Dies führte letztendlich zu einem dichteren Netzwerk.

InsP₆ scheint dabei die Eigenschaften von lang- und kurzkettigen Polyphosphaten in sich zu vereinen, ohne dabei eine Wirkung auf die Gerinnungskaskade zu besitzen.

Einen möglichen Bindungsmechanismus eines InsP₆-Fibrin-Thrombozyten-Polymers in Verbindung mit einer Bindung an den GPIIbIIIa-R zeigt Abb. 26.

Inwieweit Faktor XIII einen Einfluss auf die Verzweigungen im Beisein von InsP₆ ausübt, sollte zukünftig in weiteren Experimenten untersucht werden. Für Polyphosphate konnte bereits gezeigt werden, dass zugefügter Faktor XIII keinen Einfluss auf die Anzahl ausgebildeter Verzweigungen hat (Whyte et al., 2016). Möglicherweise wird die Quervernetzung durch Anlagerung von Polyphosphaten an die Fasern behindert.

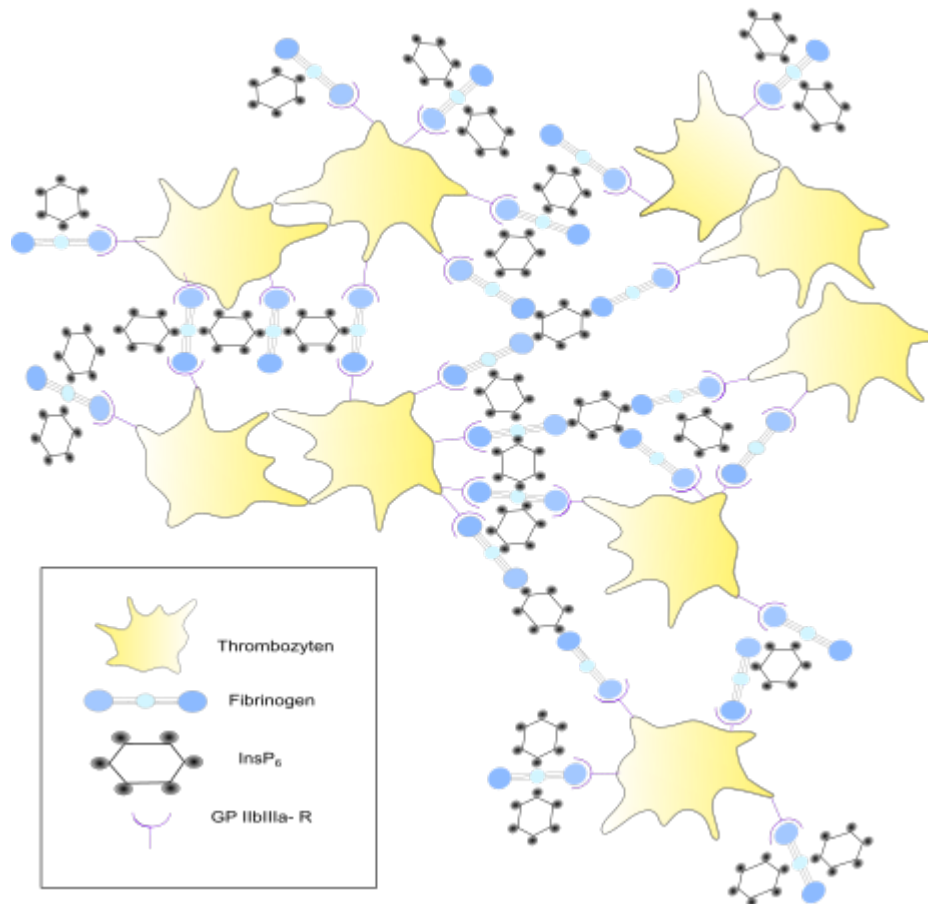


Abbildung 26: Möglicher Mechanismus der InsP_6 -vermittelten aggregationsfördernden Wirkung auf Thrombozyten via Fibrinogen und GPIIb/IIIa-R , Abbildung des Fibrinogen entnommen aus: (European Bioinformatics Institute, 2018).

Interessanterweise konnte in stimulierten Thrombozyten eine Zunahme an InsP_4 und InsP_5 detektiert werden (Mayr, 1988). In bislang unveröffentlichten Daten konnte unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit der AG Brehm, UKE, nachweisen, dass stimulierte Thrombozyten eine dreifach höhere Konzentration an InsP_6 aufweisen. Vielleicht nutzen Thrombozyten InsP_6 ähnlich wie Polyphosphate, um ein größeres, dichteres Netzwerk zu kreieren.

Mit Polyphosphaten gebildete Polymere sind resistenter gegen Fibrinolyse (Mutch et al., 2010) und gleichzeitig plastisch verformbar (Ryan et al., 1999). Dieses bietet enorme Vorteile bei der Bildung eines Thrombus. Auch die Wirkung des InsP_6 könnte so in vivo „genutzt“ werden. Hierbei wäre ein weiterer Vorteil, dass durch InsP_6 insge-

samt mehr Thrombozyten im Fibrinpolymer gebunden und der Thrombus so zusätzlich stabilisiert würde. Damit könnten InsP₆ eine tatsächliche Rolle in vivo spielen. Die in-vivo-Relevanz sollte jedoch in weiteren Untersuchungen genauer untersucht werden.

Die Hämostase ist ein lebenswichtiger Prozess, der streng kontrolliert werden muss. Eine ungenügende Gerinnung führt zu lebensgefährlichen Blutungen. Eine übersteigerte Koagulation hingegen kann Thrombosen und Embolien begünstigen. Wir untersuchten daher mögliche Mechanismen der InsP-Elimination.

4.2.3 Einfluss von Makrophagen und Fibroblasten auf die InsP₆-vermittelte Thrombozytenaggregation

Humanes Plasma ist frei von InsPs. Bislang wurde dies auf die Aktivität der MINPP1, einer Phosphatase, zurückgeführt (Windhorst et al., 2013). Wir zeigen erstmals, dass auch Makrophagen und Fibroblasten in der Lage sind, InsPs in großen Mengen zu phagozytieren. Bislang wurde zellulären Mechanismen der InsPs-Elimination wenig Beachtung geschenkt. Dabei spielen Makrophagen als „professionelle“ Phagozyten eine wesentliche Rolle in der Wundheilung und sind zusammen mit Fibroblasten auch nach einer Gewebsverletzung vor Ort. Wir konnten zeigen, dass Makrophagen sogar so potent in der Phagozytose sind, dass sie den gerinnungsfördernden Einfluss der InsPs aufheben können, ohne dabei selbst Schaden zu nehmen. Ab einer Konzentration zwischen 50 und 100 μ M ist ihre Kapazität zur Elimination freier InsPs verbraucht. Dies bedeutet, dass bei sehr hohen Konzentrationen freier InsPs, beispielsweise bei starkem Zellzerfall z.B. im Rahmen einer Tumorlyse oder einer starken Gewebsverletzung, InsP₆ dennoch seine gerinnungsfördernden Eigenschaften zeigen könnte. Um die tatsächliche Relevanz in vivo nachzuweisen, müssten einerseits die Kapazität der MINPP1 im Blut zur Elimination freier InsPs bestimmt und andererseits Makrophagen und die MINPP1 gemeinsam inkubiert werden. Erst dann ließen sich genaue Aussagen zur Thromboseneigung durch InsP₆ treffen. Auch könnten Mausmodelle helfen, eine in-vivo-Situation zu untersuchen.

4.2.4 Fazit

InsP₆ fördert die Thrombozytenaggregation. Dabei wird die Fibrinpolymerisierung beeinflusst: InsP₆ wirkt einerseits wie langkettige Polyphosphate und bildet dickere Fasern, vermutlich durch Einbau von InsP₆ ins Faserinnere. Zum anderen bildet es dichte Netzwerke mit knotigen Arealen abgewechselt von großen Poren, eine Eigenschaft, die von kurzkettigen Polyphosphaten beschrieben wurde.

InsP₆-Fibrin-Polymere können insgesamt mehr Thrombozyten binden. Eventuell gelingt dies durch Bindung von InsP₆ an Fibrinogen, welches wiederum an den GPIIb/IIIa-R an der Thrombozytenoberfläche bindet.

Möglicherweise sezernieren aktivierte Thrombozyten InsP₆, um das gebildete Fibrinnetzwerk zu festigen.

Unter pathologischen Bedingungen jedoch, z.B. bei einem Zellzerfall im Rahmen einer Tumorlyse oder einer großen Gewebsverletzung, könnten die freigesetzten InsPs eine Steigerung der Thrombozytenaggregation bewirken.

Fest steht, dass eine genaue Regulation der InsP-Konzentration im Blut elementar ist, um einer übersteigerten Gerinnung vorzubeugen. Dies geschieht einerseits durch die MINPP1. Wir konnten zeigen, dass auch Gewebsmakrophagen und Fibroblasten potente Zellen zur Elimination freier InsPs darstellen.

4.3 Ausblick

InsPs und ihre Wirkung auf die Blutgerinnung sind ein so komplexes und auch spannendes Thema, dass eine Dissertation allein bei Weitem nicht ausreicht, um alle offenen Fragen zu beantworten.

Zum einen sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Wirkungsmechanismus sowie die Fibrinstruktur aufzuklären: So könnte bspw. durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) der Faserdurchmesser sowie das Polymerinnere von InsP₆-Fibrinpolymeren exakt vermessen und mit durch Polyphosphaten gebildeten Polymeren verglichen werden.

Zusätzlich könnten elektronische Bindungssimulationen eine mögliche InsP₆-Bindungsstelle im Fibrinogen detektieren. Wäre diese bekannt, ließen sich genauere Vermutungen anstellen, ob und inwieweit Fibrinogen als Link zwischen InsP₆ und dem GPIIb/IIIa-R agieren kann. Eine experimentelle Überprüfung, ob tatsächlich eine Bindung von InsP₆ via Fibrinogen an diesen Rezeptor erfolgt, könnte durch Inkubation

mit dem GPIIb/IIIa-R-Blocker Abciximab erfolgen (Usta et al., 2016): Dabei müsste nach Blockade der Rezeptoren die InsP₆-vermittelte Wirkung auf die Thrombozytenbindung aufgehoben werden.

Interessant wäre zu wissen, inwieweit Faktor XIII einen zusätzlichen Einfluss auf die Ausbildung von Verzweigungen im Fibrinpolymer ausüben kann: Dazu sollte Faktor XIII einem Polymerisationsansatz zugefügt und die Wirkung mit einem Kontrollansatz verglichen werden. Ähnliches wurde bereits mit Polyphosphaten durchgeführt (Mutch et al., 2010).

Um die Eliminationskapazität von Makrophagen und der MINPP1 festzustellen, sollten beide Agenzien gemeinsam mit InsP₆ und Thrombozyten inkubiert werden. Mithilfe der CPA könnte dann eine Konzentration bestimmt werden, ab welcher im Plasma verbleibendes InsP₆ die Aggregation beeinflussen kann.

Inzwischen ist die InsP-Konzentration in stimulierten Thrombozyten bekannt. Zusätzlich sollten jedoch unterschiedliche ethnische Gruppen auf den InsP-Gehalt ihrer Thrombozyten hin untersucht werden. Um dieser Frage nachzugehen, könnten Thrombozyten zuerst durch Thrombin stimuliert und anschließend mittels HPLC-Analyse auf erreichte InsP-Konzentrationen untersucht werden.

Ebenso sind die Eigenschaften des entstandenen Fibrinnetzwerkes unter InsP₆-Einfluss bislang unbekannt und bilden ein spannendes Forschungsfeld. Mithilfe der Rheometrie könnten Viskosität und Steifigkeit gebildeter InsP₆-Fibrin-Polymere ermittelt werden (Ryan et al., 1999; Whyte et al., 2016).

Weiterführende Experimente könnten zudem Patienten mit Gerinnungsstörungen einschließen: So zeigte Hernandez-Ruiz (Hernandez-Ruiz et al., 2009), dass einige Patienten mit Blutungsneigung weniger Polyphosphate in den δ -Granulae besitzen. Möglicherweise ließe sich bei bestimmten Blutungsneigungen auch eine Veränderung im InsP-Gehalt stimulierter Thrombozyten feststellen.

Polyphosphate wurden bereits als mögliche Zielstrukturen für Medikamente vorgeschlagen: Dabei könnten gegen Polyphosphate gerichtete Antikörper als gerinnungshemmende Medikamente genutzt werden (Smith et al., 2012; Travers et al., 2014). Die Antikoagulation erfolgt hierbei v.a. durch Ausschaltung der fördernden Wirkung von Polyphosphaten auf den intrinsischen Signalweg der Gerinnungskaskade. Da InsP₆ die Gerinnungskaskade jedoch unbeeinflusst lässt, ist es für diese Verwendung ungeeignet. Es könnte jedoch als gerinnungsfördernde Substanz eingesetzt werden, bspw.

als Zusatz in Gewebekleber.

Gewebekleber bestehen bislang entweder aus synthetischen Monomeren wie Cyanoacrylat (Histoacryl[®], Dermabond[®]), oder aus organischen Molekülen wie Fibrinogen. Beiden Molekülen ist gemeinsam, dass sie nach Applikation in der Wunde rasch auspolymerisieren und so zu einem primären Wundverschluss führen. Ein Nachteil der synthetischen Kleber ist ihre oft exotherme Reaktion bei der Polymerisierung sowie, dass sie toxisch wirken oder nicht resorbierbar sind (Schneider und Otto, 2012). Sie werden größtenteils für oberflächliche Wunden eingesetzt. Organische Kleber, bspw. Fibrinkleber (z.B. Tisseel[®]), enthalten neben Fibrinogen auch FXIII, Thrombin und Calcium (Petersen et al., 2004). Sie eignen sich aufgrund ihrer organischen Herkunft für innere Wunden, durch ihre geringe Festigkeit sind sie jedoch zum Gewebeverschluss unter Spannung ungeeignet. An dieser Stelle könnte InsP₆ zum Einsatz kommen: Durch Beimischung von InsP₆ könnte das Fibrinnetz gestärkt werden, ohne die Gerinnungskaskade zu beeinflussen und möglicherweise eine übermäßige Gerinnung auszulösen. Auch allergische Reaktionen, wie sie bspw. unter GRF-Kleber in seltenen Fällen auftreten, wären unter mit InsP₆-versetztem Fibrinkleber nicht zu beobachten.

Eine Möglichkeit der Untersuchung wären Mausmodelle. Hierbei könnte die Blutungszeit einer Wunde mit InsP₆-versetzten Fibrinkleber mit Fibrinkleber ohne InsP₆-Zusatz verglichen werden. Im Falle eines schnelleren oder festeren Wundverschlusses, könnte InsP₆ die Einsatzmöglichkeiten von Fibrinkleber verbessern.

Diese Aufzählung zeigt, dass InsPs auch in Zukunft ein spannendes Forschungsfeld bleiben, das bei Weitem noch nicht ausgeschöpft ist.

5 Zusammenfassung

InsP₅ und InsP₆ sind in tierischen Zellen weit verbreitet. Ihnen kommen vielfältige Aufgaben zu. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass InsP₅ und InsP₆ mit hoher Affinität an Fibrinogen binden. Eine physiologische Funktion ist bislang unbekannt. In dieser Dissertation wurde erstmalig ein Effekt von InsPs auf Thrombozytenaggregation und Fibrinpolymerisierung untersucht. Dabei konnte mittels Cone and Plate(let) Analysis (CPA) gezeigt werden, dass InsP₆ die Größe von Thrombozytenaggregaten beeinflusst. Polymerisierungsassays zeigten, dass InsP₆ dabei die Fibrinpolymerisierung in einer Art und Weise beeinflusst, wie dies bereits von Polyphosphaten bekannt war: Dabei führte es zu dickeren Fibrinfasern, eine Eigenschaft, die von langkettigen Polyphosphaten beobachtet wurde. Zum anderen förderte es die Ausbildung dichter, knotiger Areale und weiter Poren, dieses wurde von kurzen Polyphosphaten beschrieben. Insgesamt wurden mehr Thrombozyten an den Polymeren gebunden. Dies könnte auf eine Interaktion von InsP₆ mit Fibrinogen und dem GPIIbIIIa-R aktivierter Thrombozyten zurückzuführen sein.

Trotz des hohen Zellumsatzes im Blut und trotz erhöhter InsPs-Spiegel in stimulierten Thrombozyten, ist humanes Plasma InsP-frei. Dieses wurde bislang auf das Vorhandensein der MINPP1, einer hochaktiven Phosphatase im Plasma, zurückgeführt. Mithilfe von Zellkulturen konnten wir erstmals zeigen, dass auch humane Makrophagen und Fibroblasten, die eine wichtige Rolle in der Wundheilung einnehmen, den aggregatfördernden Effekt des InsP₆ auf die Thrombusformation aufheben können. Ab einer Konzentration zwischen 50 – 100 μ M war ihre Kapazität zur Phagozytose verbraucht. Zusätzlich zu einem möglichen Bindungsmechanismus schlagen wir InsP₆ als Zusatz fibrinhaltiger Gewebekleber für einen schnelleren und stabileren Wundverschluss vor.

6 Summary

InsP₅ and InsP₆ are the most abundant Inositolphosphates (InsPs) within mammalian cells as they exhibit multiple functions. Currently, it has been demonstrated that InsP₅ as well as InsP₆ can bind to fibrinogen with high affinity although a physiological function remains elusive. This PhD-thesis investigates for the first time effects of InsPs on platelet aggregation and fibrin polymerisation. By cone and plate(let) analysis, we observed an increase of platelet aggregate size in the presence of InsP₆. Fibrinogen polymerisation assays revealed an alteration of fibrin network structure as detected for long polyphosphates. However, fibrin network was also altered in a way known for shorter polyphosphates: tight knobs and wide pores were detected. Fibrin polymeres exhibit an enhanced platelet adhesion, which could be due to interaction with GPIIbIIIa-R on activated platelet surface. Although cell turnover is high in human plasma, no InsPs could be measured. This was attributed to MINPP1, a highly active human plasma phosphatase. Using human macrophages and fibroblasts as cell model, we showed that both cell lines can prevent effects on platelet function without interfering with cell viability. Therefore, we propose macrophages which play an important role during wound healing as second mechanism for clearing human plasma from InsP₆ up to concentrations between 50 to 100 μM . We also suggest a possible binding mechanism for InsP₆ and fibrinogen. A possible clinical use for InsP₆ could be as supplement in fibrin tissue glues for a faster and more stable wound closure.

7 Sicherheit und Entsorgung

Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung der Sicherheitsdatenblätter der gentechnischen Anlage in Laboren der Sicherheitsstufe II durchgeführt.

Die verwendeten Chemikalien wurden gemäß ihrer Gefahren- und Sicherheitshinweise gehandhabt und entsorgt.

Transfizierte eukaryotische Zellen und Zellkulturen zählen als gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Alle Zellsuspensionen und kontaminierten Materialien wurden daher gemäß der Biostoffverordnung (BioStoffV) und der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) vor der Entsorgung oder Wiederverwertung autoklaviert. Mit GVO in Berührung gekommene Oberflächen wurden sorgfältig mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

1	Unterschiedliche Darstellungsformen für Inositol.	2
2	FAM-InsP ₅ (Riley et al., 2014).	3
3	Phosphatidylinositol (Falkenburger et al., 2010).	4
4	InsP-Synthese (Thota und Bhandari, 2015)	6
5	Klassisches Modell der plasmatischen Gerinnung (Riddel Jr et al., 2007) . .	10
6	Schematische Darstellung des zellbasierten Gerinnungsmodells (Hoffman, 2003).	12
7	Polyphosphate (Morrissey und Smith, 2015).	16
8	Coomassie Brilliant-Blue G250 (Thermo Fisher Scientific, 2018).	24
9	Visualisierte Eichgerade.	25
10	Umsetzung von MTT in Formazan (Sittampalam et al., 2004).	31
11	Schematischer Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung der CPA	32
12	LCI mit humanen Thrombozyten unter Zugabe von InsP ₆	37
13	CPA unter Zusatz unterschiedlicher InsPs und Fluorescein.	38
14	3D-Rekonstruktion nach Inkubation mit (FAM-)InsP ₅ und Thrombozyten. .	39
15	Photometrische Untersuchung nach Inkubation mit (FAM-)InsP ₅	39
16	CAT-Analyse mit InsP ₆ und ADP.	40
17	CPA mit InsP ₅ und InsP ₆ unter Zusatz von Fibrinogen.	42
18	Fibrinpolymerisation mit (FAM-)InsP ₅ und Thrombozyten.	43
19	Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation mit FAM-InsP ₅	44
20	Fluoreszenzanalyse von Zelllysaten nach Inkubation mit FAM-InsP ₅	45
21	Fluoreszenzmikroskopie mit FAM-InsP ₅ und humanen Makrophagen. . . .	45
22	Zellviabilitätsassay mit InsPs und Fluorescein.	46
23	CPA-Analyse unter Zusatz von InsPs und Makrophagen.	47
24	CPA-Analyse unter Zusatz von InsPs und RAW264.7-Makrophagen.	48
25	Aufnahmekapazität an FAM-InsP ₅ in RAW264.7-Zellen.	48
26	Möglicher Mechanismus der InsP ₆ -vermittelten Wirkung	54

Tabellenverzeichnis

1	Exemplarische photometrische Messung	25
2	Exemplarische Berechnung der Proteinkonzentration	26

Abkürzungsverzeichnis

5-PPT	Inositol-1,4,5-trisphosphat-5-Phosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APC	Aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CAT	Calibrated Automated Thrombin Generation
CPA	Cone and Plate(let) Analysis
DAG	Diacylglycerin
DCF	2,7-Dichlorfluorescein
DIPP	Diphosphoinositolpolyphosphatphosphohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FI-XIII	Gerinnungsfaktoren (I- XIII), aktivierte Faktoren werden durch 'a' gekennzeichnet
FI/ Ia	Fibrinogen/ Fibrin
FII/ IIa	Prothrombin/ Thrombin
FIII	TF, Tissue Factor, Gewebefaktor
FXII	Hagemann-Faktor
FAM-InsP ₅	fluoreszierendes Amino-InsP ₅
FCS	fetales Kälberserum, (fetal calf serum)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPIb-R	Glykoprotein Ib-Rezeptor (Integrin)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HMWK	High molecular weight kininogen
InsPs	Inositolphosphate
Ins(1,2,3,4,5)P ₅	D-myo-Inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphat
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	D-myo-Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphat
Ins(1,3,4,5)P ₄	D-myo-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat

Ins(1,3,4,5)P ₄	D-myo-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
Ins(1,4,5)P ₃	D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat
Ins(3,4,5,6)P ₄	D-myo-Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphat
InsP ₆	D-myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat
IP3-K/ ITPK	Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinase
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
IPMK/ IPK2	Inositolphosphatmultikinase
IPPK	Inositolpentakisphosphat 2-Kinase
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LCI	Life Cell Imaging
MINPP1	Multiple Inositolphosphat Phosphatase 1
MPER	Mammalian Protein Extraktion Reagent
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCIUB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry
NHEJ	Non-homologous end joining
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PG E ₁	Prostaglandin E ₁
PFA	Paraformaldehyd
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol(4,5) biphosphat (PI(4,5)P ₂)
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase
PLC	Phospholipase C
PS	Polystyrol
PSF	Platelet Stimulation Factor
PP	Polypropylen
PtdIns	Phosphatidylinositol
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
tRNA	transfer RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute, (revolutions per minute)
TF	Tissue Factor, Gewebefaktor, FIII, Thromboplastin
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TM	Thrombomodulin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
Vf	Verdünnungsfaktor
vWF	von-Willebrand-Faktor

Literatur

- Agranoff, B. W. (2009). Turtles All the Way: Reflections on myo-Inositol. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21121–21126. doi:10.1074/jbc.X109.004747
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological reviews*, 93(3), 1019–1137.
- Bergmeier, W. & Hynes, R. O. (2011). Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(2), a005132. doi:10.1101/cshperspect.a005132
- Bernas, T. & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315.
- Berridge, M. J. & Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341(6239), 197.
- Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 11.
- Berridge, M. V. & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), 474–482.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Chakraborty, A., Kim, S. & Snyder, S. H. (2011). Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals. *Sci. Signal.* 4(188), re1.
- Chi, H., Yang, X., Kingsley, P. D., O’Keefe, R. J., Puzas, J. E., Rosier, R. N., Shears, S. B. & Reynolds, P. R. (2000). Targeted deletion of Minpp1 provides new insight into the activity of multiple inositol polyphosphate phosphatase in vivo. *Molecular and cellular biology*, 20(17), 6496–6507.
- Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145(3638), 1310–1312.

- De Craene, J.-O., Bertazzi, D. L., Bär, S. & Friant, S. (2017). Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 634.
- Drašković, P., Saiardi, A., Bhandari, R., Burton, A., Ilc, G., Kovačević, M., Snyder, S. H. & Podobnik, M. (2008). Inositol hexakisphosphate kinase products contain diphosphate and triphosphate groups. *Chemistry & biology*, 15(3), 274–286.
- Drayer, A. L., Pesesse, X., De Smedt, F., Woscholski, R., Parker, P. & Erneux, C. (1996). Cloning and expression of a human placenta inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase. *Biochemical and biophysical research communications*, 225(1), 243–249.
- Efanov, A. M., Zaitsev, S. V. & Berggren, P.-O. (1997). Inositol hexakisphosphate stimulates non- Ca^{2+} -mediated and primes Ca^{2+} -mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4435–4439.
- Engelmann, B. & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(1), 34.
- European Bioinformatics Institute. (2018). Protein of the month Fibrinogen. Abgerufen am: 27.08.2018 um 10:30. Zugriff unter https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B.-C. & Hille, B. (2010). Symposium Review: Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *The Journal of physiology*, 588(17), 3179–3185.
- Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2016). Pharmakologie und Toxikologie - Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. (2. Aufl., S. 456–464). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Gailit, J., Clarke, C., Newman, D., Tonnesen, M. G., Mosesson, M. W. & Clark, R. A. (1997). Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. *Experimental cell research*, 232(1), 118–126.
- Grint, T., Riley, A. M., Mills, S. J., Potter, B. V. & Safrany, S. T. (2012). Fibrinogen—A Possible Extracellular Target for Inositol Phosphates. *Messenger*, 1(2), 160–166.
- Hanakahi, L. A., Bartlett-Jones, M., Chappell, C., Pappin, D. & West, S. C. (2000). Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell*, 102(6), 721–729.

- Heinrich, P. C., Müller, M. & Graeve, L. (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie -. (S. 877–892). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Helmis, C., Blechner, C., Lin, H., Schweizer, M., Mayr, G. W., Nielsen, P. & Windhorst, S. (2013). Malignant H1299 tumour cells preferentially internalize iron-bound inositol hexakisphosphate. *Bioscience reports*, 33(5), e00075.
- Hemker, H. C. & Béguin, S. (1995). Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thrombosis and haemostasis*, 74(1), 134–138.
- Hemker, H. C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., De Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T. & Béguin, S. (2003). Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 33(1), 4–15.
- Hernandez-Ruiz, L., Saez-Benito, A., Pujol-Moix, N., Rodriguez-Martorell, J. & Ruiz, F. (2009). Platelet inorganic polyphosphate decreases in patients with delta storage pool disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), 361–363.
- Hoffman, M. (2003). A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews*, 17, S1–S5.
- Illies, C., Gromada, J., Fiume, R., Leibiger, B., Yu, J., Juhl, K., Yang, S.-N., Barma, D. K., Falck, J. R., Saiardi, A. et al. (2007). Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic β cells. *Science*, 318(5854), 1299–1302.
- Irvine, R. F. (2005). Inositide evolution—towards turtle domination? *The Journal of physiology*, 566(2), 295–300.
- Irvine, R. F., Letcher, A., Heslop, J. & Berridge, M. J. (1986). The inositol tris/tetrakisphosphate pathway—demonstration of Ins (1, 4, 5) P₃ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*, 320(6063), 631–634.
- Irvine, R. F., Moor, R. M., Pollock, W., Smith, P. & Wreggett, K. (1988). Inositol phosphates: proliferation, metabolism and function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 320(1199), 281–298.
- NC-IUB. (1989). Numbering of atoms in myo-inositol. Recommendations 1988. *Eur. J. Biochem.* 180, 485–486.
- IUPAC. (2018). Numbering of atoms in myo-inositol. Abgerufen am 23.09.2017 um 15:30. Zugriff unter <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol/myo.html>

- Josso, F. & Prou-Wartelle, O. (1965). Interaction of tissue factor and factor VII at the earliest phase of coagulation. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica. Supplementum*, 17, 35–44.
- Kamath, S., Blann, A. & Lip, G. (2001). Platelet activation: assessment and quantification. *European heart journal*, 22(17), 1561–1571.
- Kim, E., Ahn, H., Kim, M. G., Lee, H. & Kim, S. (2017). The expanding significance of inositol polyphosphate multikinase as a signaling hub. *Molecules and cells*, 40(5), 315.
- Kornberg, A., Rao, N. N. & Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 89–125.
- Kreutz, R. P., Nystrom, P., Kreutz, Y., Miao, J., Kovacs, R., Desta, Z., Flockhart, D. A. & Jin, Y. (2013). Inhibition of platelet aggregation by prostaglandin E1 (PGE1) in diabetic patients during therapy with clopidogrel and aspirin. *Platelets*, 24(2), 145–150.
- Lee, Y.-S., Mulugu, S., York, J. D. & O'shea, E. K. (2007). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*, 316(5821), 109–112.
- Letcher, A. J., Schell, M. J. & Irvine, R. F. (2008). Do mammals make all their own inositol hexakisphosphate? *Biochemical Journal*, 416(2), 263–270.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). Histologie -. (3. Aufl., S. 116–117, 242–249, 268–276). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ma, Y. & Lieber, M. R. (2002). Binding of inositol hexakisphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 10756–10759.
- Macbeth, M. R., Schubert, H. L., VanDemark, A. P., Lingam, A. T., Hill, C. P. & Bass, B. L. (2005). Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*, 309(5740), 1534–1539.
- Macfarlane, R. (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202(4931), 498.
- Malabanan, M. M. & Blind, R. D. (2016). Inositol polyphosphate multikinase (IPMK) in transcriptional regulation and nuclear inositide metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 279–285.
- Marieb, E. N. (2015). Essentials of Human Anatomy & Physiology -. (11. Aufl., S. 124–125). New York: Vital Source (for Pearson) VST E+p.

- Marlar, R. A. & Griffin, J. H. (1981). Alternative pathways of thromboplastin-dependent activation of human factor X in plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 370(1), 325–335.
- Mayr, G. W. (1988). A novel metal-dye detection system permits picomolar-range hplc analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochemical Journal*, 254(2), 585–591.
- Morrison, B. H., Bauer, J. A., Kalvakolanu, D. V. & Lindner, D. J. (2001). Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon- β in ovarian carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24965–24970.
- Morrissey, J. H. & Smith, S. A. (2015). Polyphosphate as modulator of hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13, S92–S97.
- Mutch, N. J., Engel, R., de Willige, S. U., Philippou, H. & Ariëns, R. A. (2010). Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood*, 3980–3988.
- Odom, A. R., Stahlberg, A., Wente, S. R. & York, J. D. (2000). A role for nuclear inositol 1, 4, 5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science*, 287(5460), 2026–2029.
- Petersen, B., Barkun, A., Carpenter, S., Chotiprasidhi, P., Chuttani, R., Silverman, W., Hussain, N., Liu, J., Taitelbaum, G. & Ginsberg, G. G. (2004). Tissue adhesives and fibrin glues: November 2003. *Gastrointestinal endoscopy*, 60(3), 327–333.
- Rando, O. J., Chi, T. H. & Crabtree, G. R. (2003). Second messenger control of chromatin remodeling. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10(2), 81.
- Raschke, W., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261–267.
- Rassow, J. & Hauser, K. (2016). Duale Reihe Biochemie -. (4. Aufl., S. 721–726). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Reinke, J. & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43.
- Riddel Jr, J. P., Aouizerat, B. E., Miaskowski, C. & Lillicrap, D. P. (2007). Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 24(3), 123–131.

- Riley, A. M., Windhorst, S., Lin, H.-Y. & Potter, B. V. (2014). Cellular internalisation of an inositol phosphate visualised by using fluorescent InsP5. *ChemBioChem*, 15(1), 57–67.
- Ruiz, F. A., Lea, C. R., Oldfield, E. & Docampo, R. (2004). Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44250–44257.
- Ryan, E. A., Mockros, L. F., Weisel, J. W. & Lorand, L. (1999). Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophysical journal*, 77(5), 2813–2826.
- Safrany, S. T., Caffrey, J. J., Yang, X., Bembenek, M. E., Moyer, M. B., Burkhart, W. A. & Shears, S. B. (1998). A novel context for the ‘MutT’ module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *The EMBO Journal*, 17(22), 6599–6607.
- Saiardi, A., Caffrey, J. J., Snyder, S. H. & Shears, S. B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 468(1), 28–32.
- Saiardi, A., Erdjument-Bromage, H., Snowman, A. M., Tempst, P. & Snyder, S. H. (1999). Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Current Biology*, 9(22), 1323–1326.
- Saiardi, A., Nagata, E., Luo, H. R., Snowman, A. M. & Snyder, S. H. (2001). Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39179–39185.
- Savion, N. & Varon, D. (2006). Impact—the cone and plate (let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 35(1-2), 83–88.
- Schneider, G. & Otto, K. (2012). In vitro and in vivo studies on the use of Histoacryl® as a soft tissue glue. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(7), 1783–1789.
- Shears, S. B. (2015). Inositol pyrophosphates: why so many phosphates? *Advances in biological regulation*, 57, 203–216.
- Shears, S. B., Baughman, B. M., Gu, C., Nair, V. S. & Wang, H. (2017). The significance of the 1-kinase/1-phosphatase activities of the PPIP5K family. *Advances in biological regulation*, 63, 98–106.

- Shen, X., Xiao, H., Ranallo, R., Wu, W.-H. & Wu, C. (2003). Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science*, 299(5603), 112–114.
- Silcox, D. C., Jacobelli, S. & McCarty, D. J. (1973). Identification of inorganic pyrophosphate in human platelets and its release on stimulation with thrombin. *The Journal of clinical investigation*, 52(7), 1595–1600.
- Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T. et al. (2004). Assay guidance manual.
- Smith, S. A., Choi, S. H., Collins, J. N., Travers, R. J., Cooley, B. C. & Morrissey, J. H. (2012). Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood*, 5103–5110.
- Smith, S. A., Choi, S. H., Davis-Harrison, R., Huyck, J., Boettcher, J., Rienstra, C. M. & Morrissey, J. H. (2010). Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*, 4353–4359.
- Smith, S. A. & Morrissey, J. H. (2008). Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood*, 112(7), 2810–2816.
- Smith, S. A. & Morrissey, J. H. (2014). Polyphosphate: a new player in the field of hemostasis. *Current opinion in hematology*, 21(5), 388.
- Smith, S. A., Mutch, N. J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R. & Morrissey, J. H. (2006). Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 903–908.
- Steger, D. J., Haswell, E. S., Miller, A. L., Wentz, S. R. & O'shea, E. K. (2003). Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science*, 299(5603), 114–116.
- Stephens, D. J. & Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616), 82–86.
- Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K.-H., Dell, A., Jackson, T., Hawkins, P. & Mayr, G. W. (1993). The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate (s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate (s). *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4009–4015.

- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. & Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938), 67.
- Stryer, L., Berg, J. M. & Tymoczko, J. L. (2007). Biochemistry -. (5. Aufl., S. 296–298). Murray Hill, New Jersey: W. H. Freeman.
- Swystun, L. L. & Liaw, P. C. (2016). The role of leukocytes in thrombosis. *Blood*, 753–762.
- Takazawa, K., Lemos, M., Delvaux, A., Lejeune, C., Dumont, J. E. & Erneux, C. (1990). Rat brain inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase. Ca^{2+} -sensitivity, purification and antibody production. *Biochemical journal*, 268(1), 213–217.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). Chemical structures of coomassie brilliant blue dyes R-250 and G-250. Abgerufen am 27.08.2018 um 16:10. Zugriff unter <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20279>
- Thota, S. G. & Bhandari, R. (2015). The emerging roles of inositol pyrophosphates in eukaryotic cell physiology. *Journal of biosciences*, 40(3), 593–605.
- Travers, R. J., Shenoi, R. A., Kalathottukaren, M. T., Kizhakkedathu, J. N. & Morrissey, J. H. (2014). Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*, 3183–3190.
- Travers, R. J., Smith, S. A. & Morrissey, J. H. (2015). Polyphosphate, platelets, and coagulation. *International journal of laboratory hematology*, 37, 31–35.
- Usta, C., Turgut, N. T. & Bedel, A. (2016). How abciximab might be clinically useful. *International journal of cardiology*, 222, 1074–1078.
- Vajanaphanich, M., Schultz, C., Rudolf, M. T., Wasserman, M., Enyedi, P., Craxton, A., Shears, S. B., Tsien, R. Y., Barrett, K. E. & Traynor-Kaplan, A. (1994). Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins (3, 4, 5, 6) P₄. *Nature*, 371(6499), 711.
- van der Meijden, P. E., Feijge, M. A., Giesen, P. L., Huijberts, M., van Raak, L. P. & Heemskerk, J. W. (2005). Platelet P2Y₁₂ receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation. *Thrombosis and haemostasis*, 94(06), 1128–1136.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (S. 237–245). Springer.
- Veiga, N., Torres, J., Domínguez, S., Mederos, A., Irvine, R. F., Díaz, A. & Kremer, C. (2006). The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of

- magnesium (II) and calcium (II): Protein-free soluble InsP6 is limited to 49 μ M under cytosolic/nuclear conditions. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(11), 1800–1810.
- Verbsky, J. W., Wilson, M. P., Kisseleva, M. V., Majerus, P. W. & Wente, S. R. (2002). The synthesis of inositol hexakisphosphate: characterization of human inositol 1, 3, 4, 5, 6-pentakisphosphate 2-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31857–31862.
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M. & Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews*, 93(1), 327–358.
- Welsch, U. & Deller, T. (2011). Lehrbuch Histologie - Unter Mitarbeit von Thomas Deller. (3. Aufl., S. 90–94, 188–190). München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Whyte, C. S., Chernysh, I. N., Domingues, M. M., Connell, S., Weisel, J. W., Ariens, R. A. & Mutch, N. J. (2016). Polyphosphate delays fibrin polymerisation and alters the mechanical properties of the fibrin network. *Thrombosis and haemostasis*, 116(1), 897.
- Wild, T. & Auböck, J. (2007). Manual der Wundheilung - Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung. (1. Aufl., S. 1–6). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Wilson, M. S., Bulley, S. J., Pisani, F., Irvine, R. F. & Saiardi, A. (2015). A novel method for the purification of inositol phosphates from biological samples reveals that no phytate is present in human plasma or urine. *Open biology*, 5(3), 150014.
- Wilson, M. P. & Majerus, P. W. (1996). Isolation of inositol 1, 3, 4-trisphosphate 5/6-kinase, cDNA cloning, and expression of the recombinant enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 11904–11910.
- Windhorst, S., Lin, H., Blechner, C., Fanick, W., Brandt, L., Brehm, M. A. & Mayr, G. W. (2013). Tumour cells can employ extracellular Ins (1, 2, 3, 4, 5, 6) P6 and multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1 (MINPP1) dephosphorylation to improve their proliferation. *Biochemical Journal*, 450(1), 115–125.
- Wolberg, A. S., Gabriel, D. A. & Hoffman, M. (2002). Analyzing fibrin clot structure using a microplate reader. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 13(6), 533–539.
- Wundenberg, T., Grabinski, N., Lin, H. & Mayr, G. W. (2014). Discovery of InsP6-kinases as InsP6-dephosphorylating enzymes provides a new mechanism of cy-

- tosolic InsP6 degradation driven by the cellular ATP/ADP ratio. *Biochemical Journal*, 462(1), 173–184.
- Wundenberg, T. & Mayr, G. W. (2012). Synthesis and biological actions of diphosphoinositol phosphates (inositol pyrophosphates), regulators of cell homeostasis. *Biological Chemistry*, 393(9), 979–998.
- York, J. D., Odom, A. R., Murphy, R., Ives, E. B. & Wente, S. R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science*, 285(5424), 96–100.

Danksagung

Ein großer Dank geht an Priv. Doz. Dr. Sabine Windhorst für die Idee und die umfassende Betreuung dieser Dissertation. Außerdem möchte ich Priv. Doz. Dr. Maria Brehm und Dr. Ulrike Klemm für die exzellente Zusammenarbeit und die Durchführung der CPA danken. Herrn Prof. Bernhard Rauch möchte ich danken für die Durchführung der CAT. Ein großer Dank gebührt ebenfalls Herrn Dr. Andrew Riley sowie Dr. Barry Potter für die Bereitstellung des FAM-InsP₅, hilfreiche Ideen und konstruktive Kritik. Vielen Dank auch an Christine Blechner, die immer hilfreich mit Wort und Tat zur Seite stand.

Danken möchte ich allen Probanden für die Bereitstellung ihrer Thrombozyten, insbesondere Jan Köster und Burkhard Brückmann, die sogar mehrmals ihr Blut zum Gelingen dieser Arbeit zur Verfügung stellten. Ein großes Dankeschön an Jan Köster, Raymond Nquobizita Thata und Dominik Schröder für hilfreiche Tipps und aufmunternde Worte.

Zuletzt noch ein großer Dank an Herrn Christoph Krüger für die Einführung in das Programm L^AT_EX und an meine Familie, die kritisch Korrektur gelesen hat. Danke.

Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: _____

Nina Erdmann
Hamburg, den 21. März 2019