

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin des  
Universitätsklinikum Tübingen

**Inhibition der Apoptose kühlgelagerter  
Thrombozyten in  
Apharese-Thrombozytenkonzentraten**

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

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

**vorgelegt von**

**Mättler, Chiara-Tanita**

**2023**

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Tamam Bakchoul

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Bethge

Tag der Disputation: 01.08.2023

Der Liebe meines Lebens gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	ix
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Thrombozytenkonzentrate</i> .....	1
1.2 <i>Eindämmung bakterieller Kontamination</i> .....	4
1.3 <i>Kühllagerung</i> .....	6
1.4 <i>Apoptosewege und Inhibition</i> .....	7
1.4.1 Extrinsische und Intrinsische Apoptose.....	7
1.4.2 Lagerungstemperatur und der intrinsische Apoptoseweg .....	8
1.4.3 Inhibitoren der intrinsischen Apoptose .....	9
1.5 <i>Ziel und Fragestellung</i> .....	11
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Material</i> .....	12
2.1.1 Geräte .....	12
2.1.2 Chemikalien.....	12
2.1.3 Antikörper .....	13
2.1.4 Labormaterialien.....	14
2.2 <i>Methoden</i> .....	15
2.2.1 Gewinnung der Blutprodukte.....	15
2.2.2 Studiendesign und Ablauf .....	15
2.2.3 Datenerhebung.....	16
2.2.4 Statistische Auswertung .....	19
2.2.5 Ethikvotum.....	20
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 <i>G04</i> .....	21

3.1.1 Einfluss von G04 auf die Externalisierung von Phosphatidylserin	
21	
3.1.2 Einfluss von G04 auf das mitochondriale Membranpotenzial von	
kaltgelagerten Thrombozyten.....	26
3.1.3 Einfluss von G04 auf die Zellviabilität.....	29
3.2 <i>Forskolin</i> .....	31
3.2.1 Einfluss von Forskolin auf die Externalisierung von	
Phosphatidylserin.....	31
3.2.2 Einfluss von Forskolin auf das mitochondriale	
Membranpotenzial.....	35
3.2.3 Einfluss von Forskolin auf die Zellviabilität .....	39
3.3 <i>Z-LEHD-FMK</i> .....	41
3.3.1 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf die Externalisierung von	
Phosphatidylserin.....	41
3.3.2 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf das mitochondriale	
Membranpotenzial.....	44
3.3.3 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf die Zellviabilität.....	46
3.4 <i>Vergleich der Inhibitoren</i> .....	47
3.4.1 % Inhibition Apoptose.....	47
3.4.2 Fold Decrease Apoptose .....	49
3.4.3 Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials.....	52
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>54</b>
4.1 <i>G04</i> .....	54
4.2 <i>Forskolin</i> .....	55
4.3 <i>Z-LEHD-FMK</i> .....	57
4.4 <i>Vergleich der Inhibitoren</i> .....	57
4.5 <i>Limitationen der Arbeit</i> .....	60
4.6 <i>Schlussfolgerung und Ausblick</i> .....	61
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>

<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>69</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>70</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <b>Schematische Darstellung des Apoptoseweg</b> und die Wirkungsziele der Inhibitoren .....	8
Abbildung 2: <b>Studiendesign</b> .....	16
Abbildung 3: <b>Beispiel Durchflusszyometrie Graphik der Annexin und Calcein</b> . .....	20
Abbildung 4: <b>G04: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> 22	
Abbildung 5: <b>G04: Inhibition Apoptose in Prozentprozentpunkten</b> .....	24
Abbildung 6: <b>G04 Fold Decrease Apoptose</b> .....	25
Abbildung 7: <b>G04: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> ..	26
Abbildung 8: <b>G04: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> 28	
Abbildung 9: <b>G04: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> .	30
Abbildung 10: <b>Forskolin: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> .....	32
Abbildung 12: <b>Forskolin: Fold Decrease Apoptose</b> .....	35
Abbildung 13: <b>Forskolin: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	37
Abbildung 14: <b>Forskolin: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> . .....	39
Abbildung 15: <b>Forskolin: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> .....	40
Abbildung 16: <b>Z-LEHD-FMK: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> .....	41
Abbildung 17: <b>Z-LEHD-FMK: Inhibition Apoptose in Prozentprozentpunkten</b> . .....	42
Abbildung 18: <b>Z-LEHD-FMK: Fold Decrease Apoptose</b> .....	43

Abbildung 19: <b>Z-LEHD-FMK: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	44
Abbildung 20: <b>Z-LEHD-FMK: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	46
Abbildung 21: <b>Z-LEHD-FMK: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)</b> .....	47
Abbildung 22: <b>Vergleich der Inhibitoren: Inhibition Apoptose in Prozentprozentpunkten</b> .....	49
Abbildung 23: <b>Vergleich der Inhibitoren: Fold Decrease Apoptose</b> .....	50
Abbildung 24: <b>Vergleich der Inhibitoren: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	52



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: <b>Erforderliche Geräte</b> .....	12
Tabelle 2: <b>Erforderliche Chemikalien</b> .....	12
Tabelle 3: <b>Erforderliche Antikörper</b> .....	13
Tabelle 4: <b>Erforderliche Labormaterialien</b> .....	14

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
A-TK	Apharese-Thrombozytenkonzentrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EK	Erythrozytenkonzentrat
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel; Food and Drug Administration
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren; Guaninenucleotide exchange factors
GPIIb $\alpha$	Glykoprotein Iba
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
Pool-TK	Pool-Thrombozytenkonzentrat
PTEN	Phosphat und Tensin homolog
RhoA	Rho-Kinase A
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RT	Raumtemperatur
TBBI	Tranfusionsbedingte Bakterielle Infektion
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF-SF	Tumornekrosefaktor-Superfamilie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer
TRP	Tagesreferenzprobe
UV	Ultraviolett

Leere Seite

# 1. Einleitung

## 1.1 Thrombozytenkonzentrate

Die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten (TK) erfolgt im klinischen Alltag auf zwei, sich in Anzahl der Spender und Herstellungsverfahren unterscheidenden, Arten. Nach der Querschnitts-Leitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der deutschen Bundesärztekammer werden die Pool-Thrombozytenkonzentrate (Pool-TK) von mehreren, in der Regel 4, Spendern gewonnen <sup>1</sup>. Der Herstellungsprozess eines Pool-TK beginnt mit dem Vollblut der multiplen Spender, deren AB0-Blutgruppen übereinstimmen müssen. Der Kombination der Buffy Coats des Vollblutes mit dem Lagerungsmedium, in Form von Plasma oder Additivlösung, ist die Entfernung von Leukozyten gefolgt, wobei Verfahren wie Zentrifugation, aber auch Separation sowie Filtration zum Einsatz kommen <sup>2</sup>. Das entstehende Pool-TK ist leukozytendepletiert, wie es in Deutschland, seit 2002, allgemein der Fall ist <sup>3</sup>. Das Apharese-Thrombozytenkonzentrat (A-TK) wird, im Gegensatz zum Pool TK, nicht von mehreren, sondern von einem einzelnen Blutspender gewonnen <sup>1</sup>. Die Hämapharese beinhaltet das Entfernen definierter Blutkomponenten wie Thrombozyten im Falle der Thrombozytenapharese, sodass bereits durch die Bedingungen der Herstellung ein thombozytenreiches, Leukozyten-reduziertes Blutprodukt entsteht <sup>2</sup>. Auch bei den A-TK können additive Lösungen zum Einsatz kommen. In den entsprechenden TK findet eine teilweise Ersetzung des Blutplasmas durch die Lösung statt. Bestimmte Restmengen an Leukozyten ( $< 1 \times 10^6$  /TK) sowie Erythrozyten ( $< 3 \times 10^9$  /TK) sind nicht auszuschließen, jedoch, wie auch Additivlösung und Plasma, nicht von klinischer Relevanz. Nach den aktuellen Leitlinien, werden sowohl A-TK als auch Pool-TK, bei kontinuierlicher gleichförmiger Bewegung, erreicht durch Agitatoren, bei Temperaturen von  $22 \pm 2$  °C gelagert <sup>1</sup>. Unter diesen Bedingungen ist eine Lagerungszeit von bis zu 4 Tagen vorgesehen, wobei die erlaubte Lagerungsdauer durch

Pathogenreduktion oder negative Untersuchungsbefunde auf bakterielle Kontamination auf bis zu 5 Tagen erhöht werden kann <sup>2</sup>.

Ein Bedarf an TK-Transfusionen kann aus prophylaktischen oder therapeutischen Gründen für bestimmte Patientengruppen relevant werden. Die Notwendigkeit kann sowohl auf einer Thrombozytopenie als auch einer Thrombozytenfunktionsstörung beruhen. Behandlungsziel ist die Abnahme des Risikos, beziehungsweise das Sistieren bestehender, lebensbedrohlicher Blutungen. Ein bedeutendes Kriterium zur Bestimmung der Transfusionsbedürftigkeit stellt derzeit die absolute Thrombozytenzahl dar. Diese ist für jene Patientinnen und Patienten, deren Gerinnungssystem, abgesehen von der Anzahl der Thrombozyten, keine Pathologien aufweist, besonders relevant. Auch der klinischen Symptomatik sollte Beachtung geschenkt werden. Sie kann auf Thrombozytenfunktionsstörungen, beispielsweise durch das Auftreten von Petechien, hinweisen. Eine Einteilung der Blutungssymptomatik erfolgt nach der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) in 4 Graden, wobei die Blutungen vom Grad 4 die höchste Bedrohlichkeit für die betroffenen PatientInnen darstellen <sup>1</sup>.

Die Ursachen für eine gestörte Funktion von Thrombozyten und daraus resultierende Komplikationen, können nicht selten auf iatrogenen Ursachen, wie der Einnahme spezifischer Medikamente, beruhen. Neben bestimmten Antibiotika, Lipidsenkern, Antidepressiva und einer Vielzahl weiterer Medikamente, sind insbesondere Thrombozytenaggregationshemmer, wobei reversible von irreversiblen Inhibitoren unterschieden werden, die häufigste Ursache für eine erworbene Störung der Thrombozytenfunktion <sup>1</sup>. Geringer ist die Prävalenz kongenitaler Thrombozytenfunktionsstörungen <sup>4</sup>

Eine Patientengruppe, für die eine Indikationsprüfung im Hinblick auf TK-Transfusionen, von großer Relevanz ist, sind PatientInnen mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen. Diagnostik und Therapie von invasivem Charakter erfordern die Evaluation der Transfusionsbedürftigkeit bei einer Patientengruppe, die nicht selten Thrombozytopenien aufweist <sup>3,5</sup>. Ein Beispiel für eine diagnostische Option, für welche, trotz ihrer Assoziation mit geringem

Blutungsrisiko, insbesondere wegen folgenschwerer Konsequenzen von Blutung in Rückenmarksnähe, die Betrachtung der Thrombozytenzahl bedeutend ist, ist die Lumbalpunktion. Der Konsens fachlicher Experten ist ein Transfusionstrigger von  $< 50\,000$  Thrombozyten /  $\mu\text{L}$  für elektive und  $< 20\,000$  /  $\mu\text{L}$  für notfallmäßige Lumbalpunktionen. Die Querschnitts-Leitlinie der Bundesärztekammer listet eine Reihe von Faktoren, die das Risiko für Blutungen bei Thrombozytopenie erhöhen, so unter anderem auch Fieber, Infektionen, Leukozytose, klinische Blutungszeichen und Graft-versus-Host-Disease (GvHD)<sup>1</sup>

Treten Blutungen auf, muss zwischen nicht-transfusionsbedürftigen (WHO Grad 1-2), welche gewöhnlich keine TK-Gabe erfordern, sowie akuten, die PatientInnen gefährdenden Blutungen, unterschieden werden<sup>1</sup>. Die Gefährdung durch die Blutung kann beispielweise durch ihre Lokalisation bedingt sein. Unter Betrachtung des Blutverlustes und Bedrohlichkeit, neben Anzahl und Funktion der Thrombozyten, wird die Entscheidung der Transfusionsbedürftigkeit individuell getroffen. Akut gefährdete PatientInnen werden in der Regel ab einem Transfusionstrigger von  $< 50\,000$  /  $\mu\text{L}$  transfundiert. Der rechtzeitige Beginn einer TK-Transfusion, mit 1 TK ab 6 Erythrozytenkonzentrat(en) (EK), anschließend pro 4 EK, sollte "bei massiven und bedrohlichen Blutungen mit erwarteter Massivtransfusion" vorgenommen werden<sup>1</sup>

Eine Kompatibilität von Spender und Empfänger sollte, wenn möglich, angestrebt werden. Diese Kompatibilität bezieht sich zum einen auf das AB0-System, dessen Blutgruppenmerkmale von Thrombozyten getragen werden. Zum anderen besteht ein Bezug zu humanen Thrombozyten-Antigenen, welche zusammen mit den Humanes Leukozytenantigen-Merkmalen (HLA-Merkmale) der Klasse 1, gegenüber dem AB0-System, im Hinblick der Frage nach ihrer Kompatibilität, priorisiert werden<sup>1,3</sup>. Für TK-Transfusionen bei Mädchen und Frauen, die sich im gebärfähigen Alter befinden, ist ein Rhesus-Faktor D kompatibles Produkt zu verwenden<sup>1,6</sup>

Beim Umgang mit TK ist nicht nur die Prüfung auf ein kompatibles Blutprodukt wichtig, es gibt eine Reihe weiterer Faktoren, die Einfluss auf die Sicherheit und das Ergebnis der Transfusion nehmen.

## 1.2 Eindämmung bakterieller Kontamination

Insgesamt ist das Nebenwirkungsprofil thrombozytärer Transfusionen eher günstig, schwere Komplikationen sind selten, ein Restrisiko als Folge der prophylaktischen oder therapeutischen Gabe von TK bleibt jedoch bestehen<sup>3,7</sup>. Zur Vermeidung gefürchteter Komplikationen wie transfusionsbedingter bakterieller infektionen (TBBi) und septischer Transfusionsreaktionen gibt es multiple Ansatzpunkte, denen das Ziel der Reduktion des Kontaminationsrisikos gemeinsam ist<sup>7</sup>. Auch wenn die bakteriellen Kontaminationen in ihrer Häufigkeit überwiegen, bleibt die Gefahr der Verunreinigung der Blutprodukte mit Viren, Parasiten, aber auch Leukozyten weiterhin bestehen<sup>7-9</sup>. Verglichen mit anderen Blutprodukten, weisen TK die höchste Prävalenz für Infektionen, Sepsis und Todesfälle auf (FDA Research 2022). Mit einer Häufigkeit von 1:1000 bis 1:2500 stellen Kontaminationen mit Bakterien, welche meist der physiologischen Hautflora entstammen, den quantitativ bedeutendsten Anteil der Ursachen für die genannten Komplikationen dar<sup>7,11-13</sup>. Das Bakterienwachstum kann durch die aktuell vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, wie Temperaturen von  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ständige Agitation und die Gasdurchlässigkeit der Beutelsysteme, begünstigt werden<sup>1,7</sup>. Der Versuch die Kontaminationswahrscheinlichkeit gering zu halten, beginnt bei der Entnahme des TK. Relevant sind Fragen nach dem aktuellen Gesundheitszustand der Spender, in ihrer Verlässlichkeit jedoch individuell sehr unterschiedlich und von der Fragestellung abhängig<sup>14</sup>. Durch das Verwerfen/Umleiten der ersten abgenommenen Milliliter des Produktes, kann eine Verunreinigung durch Hautkeime reduziert werden<sup>15</sup>. Bei der Testung auf bakterielle Kontamination können Teststrategien angewandt werden, welche auf Zellkulturen basieren. Diese sind in ihrer Sensitivität jedoch eingeschränkt<sup>7</sup>. Bei früher Testung sind falsch negative Ergebnisse möglich, da der Ausgangswert der Bakterien potenziell noch zu gering ist, um als positiv befundet werden zu

können. Für das Testsystem BacT/ALERT® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) wird vom Hersteller empfohlen, dass mehr als 24 Stunden zwischen der Entnahme des Blutproduktes und Probenentnahme für die Kultur liegen <sup>16</sup>. Die Bundesärztekammer empfiehlt allerdings eine *“möglichst kurze Lagerungsdauer”* für *“ein optimales Transfusionsergebnis”* <sup>1</sup>. Schnellere Befundungen sind durch Testsysteme möglich, die zur Erkennung bakterieller Bestandteile, wie Peptidglykane, konzipiert wurden. Auch sie weisen Schwächen, unter anderem in Form widersprüchlicher Ergebnisse, auf <sup>7</sup>.

Weiterhin besteht die Option eine Pathogenreduktion durch bestimmte technische Verfahren zu erreichen, wobei sich Systeme der Anwendung ultravioletten (UV) Lichtes unterschiedlicher Wellenlänge bedienen <sup>17</sup>. Das in Deutschland angewandte System bedarf einer Additivlösung, welche photosensibilisierendes Amotosalen, ein synthetisch hergestelltes Psoralen, enthält <sup>1,17</sup>. Das Gemisch aus TK und additiver Lösung wird UVA-Strahlung für 3 bis 5 Minuten ausgesetzt, um die Abtötung eines breiten Spektrums von potenziell pathogenen Bakterien, aber auch von Viren sowie Parasiten zu bewirken <sup>7</sup>. Der Bestrahlung ist die Adsorption von Reagenzien und Abbauprodukten gefolgt <sup>1</sup>. Neben dem Abtöten von Keimen erfolgt eine Inaktivierung von Leukozyten, welche durch den Herstellungsprozess nicht eliminiert wurden. Sie bergen das Risiko einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus oder Cytomegalievirus des Transfusionsempfängers sowie einer GvHD <sup>7</sup>. Studien weisen, neben Effektivität, auch auf die Sicherheit des Verfahrens hin <sup>18-20</sup>. Kritische Stimmen geben zu bedenken, dass es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen pathogenreduzierenden Verfahren und Therapierefraktärität, beziehungsweise erhöhtem Bedarf an TK, bei hämatologisch-onkologischen PatientInnen gibt <sup>21</sup>.

Eine mögliche Zukunftsperspektive für lagerungsbedingte Läsionen von Thrombozyten sowie bakterielle Kontaminationen sind Optimierungen der Lagerungsbedingungen, beispielsweise durch Kühllagerung der TK <sup>22</sup>.



### 1.3 Kühlungslagerung

Bei der gekühlten Lagerung von TK handelt es sich keineswegs um ein neues Konzept, vielmehr wurde bereits vor etwa 50 Jahren mit der Fragestellung nach Kühlungslagerung des Blutproduktes geforscht<sup>23,24</sup>. Es sind Probleme wie das Risiko der bakteriellen Kontamination und damit verbundener Konsequenzen, die die Forschung zurück bringen, zu einem Konzept, welches damals keine Anwendung mehr fand<sup>22,25</sup>. Eine Reduzierung des Wachstums von Bakterien durch die Lagerung bei 4°C, was konsequentiell eine Minderung der Wahrscheinlichkeit von TBBI und Sepsis bedeutet, konnte nachgewiesen werden<sup>22,25,26</sup>. Currie et al. stellten bereits 1997 das Potenzial der Lagerung von TK jenseits von 5 Tagen den Raum<sup>26</sup>. Vor dem Hintergrund einer möglichen Verlängerung der Lagerungszeit und Reduzierung des Kontaminationsrisikos, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an Studien zur Kühlungslagerung durchgeführt<sup>22,25,27-30</sup>. Während eine raschere Elimination, beziehungsweise Verkürzung der Zirkulationszeit, der kühlungslagerten Thrombozyten gefunden wurde<sup>22,31</sup>, konnte eine Verbesserung ihrer hämostatischen Funktion gegenüber der Lagerung bei Raumtemperatur festgestellt werden<sup>30,32</sup>. Genutzt werden könnte dieser Vorteil für die Funktionalität durch die Lagerungstemperatur, bei PatientInnen mit akuten Blutungen, wie es in den USA bereits seit einer kürzlichen Genehmigung durch die US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration, FDA) möglich ist<sup>25,30,33</sup>. Sinnvoll, so erachten es Autoren wie Waters et al. sowie Shea et al., ist eine Entscheidung basierend auf der Therapiestrategie beziehungsweise Indikationsstellung. Zu bedenken sei, dass für PatientInnen mit akuten Blutungen, der Bedarf eines TK mit optimaler hämostatischer Funktionalität, dem eines Produktes mit länger andauernder Zirkulation, überwiegt<sup>22,25</sup>. Shea et al. betonen die Chance einer individuelleren, personalisierten Therapie im Bereich von Transfusionen<sup>25</sup>.

## 1.4 Apoptosewege und Inhibition

### 1.4.1 Extrinsische und Intrinsische Apoptose

Grundsätzlich kann zwischen zwei Apoptosewegen unterschieden werden, einem extrinsischen steht ein intrinsischer Weg gegenüber<sup>34</sup>. Mit der Sekretion von Liganden der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNF-SF), als beispielhafter Vertreter zu erwähnen ist der Fas-Ligand, wird die extrinsische Apoptose eingeleitet. Die Herbeiführung des Zelltodes basiert für verschiedene Zelltypen auf teilweise übereinstimmenden, aber auch differierenden Signalwegen. Gemeinsam ist ihnen die Bindung des TNF-SF Liganden an die extrazelluläre Komponente von Todesrezeptoren der TNF-SF, mit folgender Proteolyse sowie Aktivierung von Caspase 8. Die Caspasen 3 und 7 werden durch die aktivierte Caspase 8 gespalten, wodurch sie als Effektor-Caspasen zur Unterbindung zahlreicher essenzieller Zellfunktionen, wie Transkription und Translation, letztlich auch zum Tod von Typ 1-Zellen, führen. Lymphozyten werden zu den Zellen vom Typ 1 gezählt, während Hepatozyten den Typ 2-Zellen zugeordnet werden, deren Zelltod zusätzlich der intrinsischen Apoptose bedarf. Hierbei werden Bad und Bax durch das von der Caspase 8 gespartene Protein Bid aktiviert<sup>35</sup>. Bei der Regulation von Lebensdauer und Zelltod der Thrombozyten kann insbesondere dem intrinsischen Weg der Apoptose eine bedeutende Rolle zugesprochen werden<sup>36</sup>. Die proapoptischen Proteine Bak und Bax sind ein zentrales Element für die Aktivität definierter Signalwege der intrinsischen, auch mitochondrialen, Apoptose. Bak und Bax müssen, zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen, durch die regulatorischen anti-apoptischen Proteine der Bcl-2 Familie, in ihrer Aktivität gehemmt werden<sup>37</sup>. Induziert durch intrazellulären Stress<sup>38</sup>, inhibieren BH3-only Proteine wie Bad die anti-apoptischen Proteine der Bcl-2 Familie, wozu auch Bcl-xL gezählt werden kann<sup>34,39</sup>. Die äußere Mitochondrienmembran stellt den Ort der Oligomerisation der aktivierten Bak und Bax dar, welche zur Porenbildung der Membran und anschließender Freisetzung von Cytochrom C führen. Freigesetzt ins Zytoplasma ist Cytochrom C an der Bildung eines Apoptosoms beteiligt, welches eine Kaskade von Caspasen, beginnend mit Caspase 9 und endend mit Caspase 3 und 7, bedingt<sup>35</sup>. Für die Aktivierung von Bak und Bax, über die Hemmung von

Bcl-xL, bei der intrinsischen Apoptose von Thrombozyten konnte dem BH3-only Protein Bad Bedeutung zugeschrieben werden <sup>40,41</sup>.

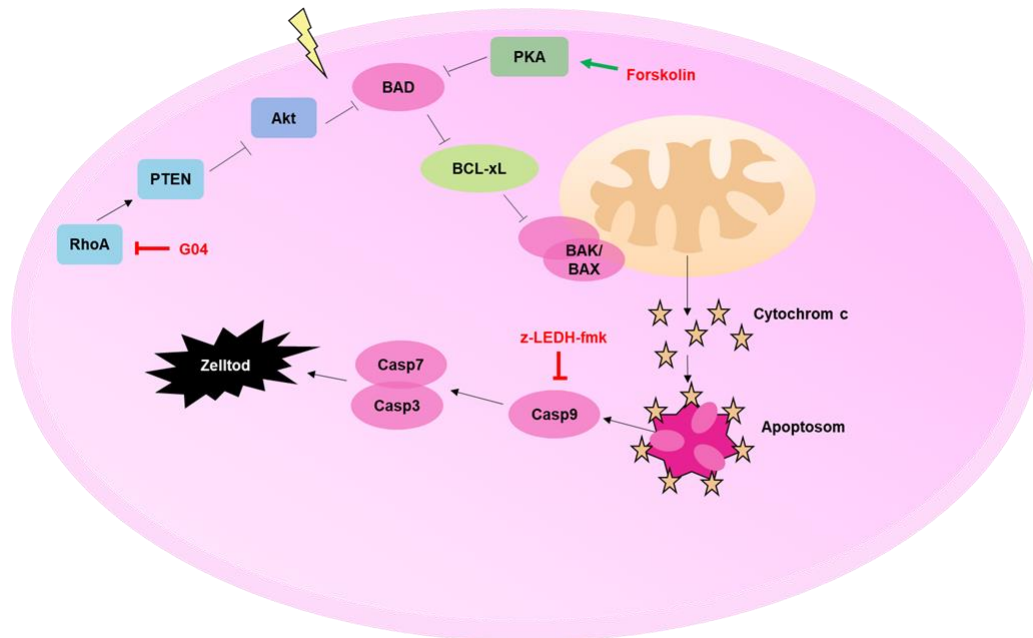


Abbildung 1: **Schematische Darstellung** des Apoptoseweges und der Angriffsstellen der Inhibitoren

#### 1.4.2 Lagerungstemperatur und der intrinsische Apoptoseweg

Van der Wal et al. fanden einen Zusammenhang zwischen der Erwärmung kühlgelagerter Thrombozyten von 0°C auf 37°C und der Dephosphorylierung, respektive der Aktivierung, des Bad Proteins. Diese Veränderung im Phosphorylierungszustand von Bad wird als Folge der verstärkten Zusammenlagerung von Glykoprotein Iba (GPIb $\alpha$ ) in der Zellmembran der gekühlten Thrombozyten diskutiert <sup>42</sup>. Das vermehrte Auftreten der dephosphorylierten, aktiven Form von Bad, ging mit einer Abnahme des aktiven anti-apoptischen Bcl-xL, gleichzeitig auch mit einer Zunahme des aktiven pro-apoptischen Bax, einher <sup>42</sup>. Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum und der Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran folgt der Oligomerisation von Bax in der äußeren Mitochondrienmembran <sup>42,43</sup>. Zudem konnten erhöhte

Konzentrationen aktiver Caspase 9 als Initiator der Caspasen-Kaskade, aber auch eine verstärkte Oberflächenexpression von Phosphatidylserin bei kühlgelagerten Thrombozyten gefunden werden. Phosphatidylserin dient als makrophagozytäres Signal und kann als Marker apoptotischer Zellen angesehen werden <sup>42,44</sup>.

### 1.4.3 Inhibitoren der intrinsischen Apoptose

Zentrales Element der vorliegenden Arbeit war der Versuch der Apoptoseinhibition bei Thrombozyten, für welche die genannten zellulären Prozesse bei Kühlung angenommen werden. Die drei verwendeten Inhibitoren greifen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Signalkaskaden der intrinsischen Apoptose ein.

Von den untersuchten Apoptose-Inhibitoren interveniert G04, auch Rhosin, ein spezifischer Inhibitor der Rho-Kinase A (RhoA), upstream zu den beiden anderen Inhibitoren, Forskolin und Z-LEHD-FMK (Abbildung 1). RhoA wird zu den GTPasen der Rho-Familie gezählt, welche eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren, so auch Einfluss auf das Zytoskelett ausüben <sup>45</sup>. Die Phosphatase PTEN (Phosphat und Tensin homolog) ist Substrat der RhoA <sup>46</sup>. Um RhoA zu aktivieren, bedarf es dem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintri-phosphat (GTP), erreicht wird dies durch sogenannte Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl. Guanine nucleotide exchange factors, GEFs). Die Beeinflussung der Interaktion der RhoA mit ihren GEFs und eine resultierende Abnahme des GTP-Austausches, als Folge der Bindung von G04 an spezifische GEF-Bindungsstellen der Rho-Kinase, wird derzeit angenommen <sup>45</sup>. Eine Aktivierung von RhoA bei kühlgelagerten Thrombozyten konnte von Hegde et al. nachgewiesen werden, aber auch die Möglichkeit mit Anwendung des RhoA-Inhibitors G04 die Phagozytose dieser Thrombozyten über einen mehrtägigen Zeitraum zu verhindern. Weitere Einflüsse, welche durch Kälte auf Thrombozyten ausgeübt werden und die Apoptose verstärkt hervorrufen, konnten durch RhoA-Inhibition vermindert werden <sup>47</sup>. Mit der Verwendung des RhoA spezifischen Inhibitors G04 sollte in dieser Arbeit zu einem vergleichsweise

frühen Zeitpunkt in den intrinsischen Apoptoseweg eingegriffen und Einfluss auf die Apoptose der gekühlten Thrombozyten ausgeübt werden.

Mit zunehmender Alterung und Lagerung von Thrombozyten wird eine reduzierte Aktivität der Proteinkinase A (PKA) nachgewiesen. Während diese Inaktivierung der PKA mit verstärkter Apoptoseaktivität einhergeht (Abbildung 1), führt die Aktivierung derselben im Gegenzug zur Abnahme der Apoptoseaktivität von Thrombozyten <sup>41</sup>. In dieser Arbeit sollte nun auch die Möglichkeit der Apoptoseinhibition, durch Einwirkung des PKA-Aktivators Forskolin <sup>48</sup>, auf kühlgelagerte Thrombozyten untersucht werden.

Von den untersuchten Inhibitoren greift der Caspase 9 Inhibitor Z-LEHD-FMK wohl am weitesten downstream in der Apoptosekaskade ein (Abbildung 1). Z-LEHD-FMK inhibiert Caspase 9, als Initiator-Caspase der Caspasen-Kaskade der intrinsischen Apoptose, kompetitiv und irreversibel <sup>35,49</sup>. Es wurde eine deutlich erniedrigten Apoptoseaktivität durch Anwendung von Z-LEHD-FMK an Embryonalzellen tierischen Ursprungs nachgewiesen <sup>49</sup>. Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die Frage nach dem potenziellen Einfluss von Z-LEHD-FMK, neben G04 und Forskolin, auf das Ausmaß der Apoptose von Thrombozyten in kühlgelagerten A-TK.

## 1.5 Ziel und Fragestellung

Thrombozytenkonzentrate stellen eine bedeutende Therapieoption in der Transfusionsmedizin dar. Sie werden, nach aktuellem Wissenstand, bei Raumtemperatur gelagert und können, nach einer maximalen Lagerungsdauer von 5 Tagen, der Patientenversorgung nicht mehr zur Verfügung gestellt werden. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Kühlung bei 4°C, gegenüber der Lagerung bei Raumtemperatur, die Apoptose der Thrombozyten in Aphaese-Thrombozytenkonzentraten verstärkt induziert<sup>31</sup>. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher zu klären, ob eine Verlängerung der Lagerungszeit von kühlgelagerten (4°C) Aphaese-Thrombozytenkonzentraten durch Inhibition des intrinsischen Apoptoseweges der Thrombozyten erreicht werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen daher die folgenden Fragen beantworten:

- Kann durch die Behandlung mit verschiedenen Apoptose-Inhibitoren (G04, Forskolin, Z-LEHD-FMK) die intrinsische Apoptose von bei 4°C gelagerten Thrombozyten in Thrombozytenkonzentraten inhibiert werden?
- Gibt es einen Apoptose-Inhibitor, welcher, in einer zu bestimmenden Konzentration, vergleichend die Apoptose am stärksten inhibiert?
- Wie lange hält die möglicherweise nachweisbare Inhibition der Apoptose durch die oben genannten Inhibitoren an?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle Materialien sind nach verschiedenen Kategorien tabellarisch aufgelistet.

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Erforderliche Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agitator	noctua GmbH, Mössingen, Deutschland
Cell-Dyn Ruby hematological	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA
Flow-cytometer Navios	Beckman Coulter, Brea, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	ilshin Europe, Ede, Niederlande
Heraeus 37 °C Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Cell bench, HeraSafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, Deutschland
Research Plus adjustable volume	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research Plus adjustable volume pipets 10; 20; 100; 200; 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotina 46 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
SevenCompact pH meter S210	Mettler-Toledo, Greifensee, Deutschland
Trima Accel	Terumo BCT, Lakewood, CO USA
TubeOne microcentrifuge	Starlab, Hamburg, Deutschland
Vortexer, Reax-Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland

#### 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Erforderliche Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ampuwa, steriles Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Calcein, AM	Life technologies Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Calciumchlorid	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) Phenylhydrazone (FCCP)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes Wasser	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Merck, USA
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
G04 Rho Inhibitor, RHOSIN	emd Millipore Corp., USA, affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Storage solution for Platelets (SSP+)	Macopharma, Mouvoux, Frankreich
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Z-LEHD-FMK, Caspase-9 Inhibitor	BD Biosciences, San Jose, USA

### 2.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Erforderliche Antikörper

Antikörper	Hersteller
APC-konjugierter Annexin V Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 Antibody Cocktail, OptiClone	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
PC5-labelled mouse anti-human CD41, Clone P2	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
PE-labelled Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (TMRE)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA



## 2.1.4 Labormaterialien

Tabelle 4: Erforderliche Labormaterialien.

<b>Labormaterial</b>	<b>Hersteller</b>
100 Sterican 19G	Braun, Melsungen, Deutschland
50 mL tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Care-Lock Adapter	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
BD Vacutainer	BD-Plymouth, Vereinigtes Königreich
Na3Citrate 6.0 mL	
Cuvette FL with Mixer in Dispo System	LABiTec, Labor BioMedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 1.5; 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flow cytometer tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitril Handschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland
oxygen permeable bag	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Pasteur pipet 5 mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
S-Monovette EDTA 7.5 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritze 2 mL	Disomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Einmalspritze 20 mL	Transatlantic Handelsgesellschaft Stolpe&Co. mbH, Neu-Anspach, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung der Blutprodukte

Die für diese Studie verwendeten Blutprodukte wurden, nach ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung, gesunden Spendern entnommen. Die Entnahme erfolgte in der Blutspendezentrale des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen. Sowohl die Aphareses-Thrombozytenkonzentrate, als auch das Vollblut, wurden gemäß der Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer gewonnen. Eine Selektion anhand der Blutgruppe fand nicht statt. Insgesamt wurden die Thrombozytenkonzentrate von sieben Probanden in die Studie eingeschlossen.

### 2.2.2 Studiendesign und Ablauf

#### 2.2.2.1 Überblick

Im Rahmen der Studie wurde die Auswirkung verschiedener Rahmenbedingungen und Inhibitoren auf die Apoptose der Thrombozyten in Apharesis-Thrombozytenkonzentraten (A-TK) untersucht. Nach Gewinnung des A-TK von gesunden Blutspendern, wurde dieses zunächst für eine Stunde auf einem Agitator gelagert. Der Tag der Entnahme des A-TK und der Herstellung der verschiedenen Proben wird als Tag 0 definiert. An Tag 0 wurde das A-TK auf die Baby-Beutel aufgeteilt und auf verschiedene Weise inkubiert. Zum einen mit drei unterschiedlichen Apoptose-Inhibitoren, welche mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt wurden. Zum anderen wurden die TKs mit DMSO als Vehikelkontrolle sowie unbehandelt inkubiert, wobei die unbehandelte Probe hier als Puffer (4°C) bezeichnet wird. Die Lagerung der Proben erfolgte unter ständiger Agitation bei 4°C, wobei eine mit DMSO behandelte Kontrollprobe bei Raumtemperatur gelagert wurde. Eine schematische Darstellung des Studiendesigns kann dem Abbildung 2 entnommen werden. Nachdem an Tag 0 die Apoptose und Zellzahl des TK, vor Behandlung mit Inhibitoren oder Lösungsmittel, im Vergleich zur Tagesreferenzprobe (TRP) gemessen wurde, um die Validität des Konzentrates sicherzustellen, wurden die Messungen der Apoptose mittels Durchflusszytometrie an den Tagen 1, 4, 7 und 10 durchgeführt.

Es wurde die Auswirkung von Lagerungszeit sowie der verschiedenen Apoptose-Inhibitoren im Vergleich zur unbehandelten 4°C-gelagerten Probe erforscht. Um einen möglichen Einfluss des verwendeten Vehikels DMSO erfassen zu können, wurde ebenfalls eine Probe mit DMSO inkubiert und bei 4°C gelagert. An allen Tagen wurden Lysate der Proben hergestellt, welche bei -80°C gelagert wurden, um für Western Blots zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung zu stehen.

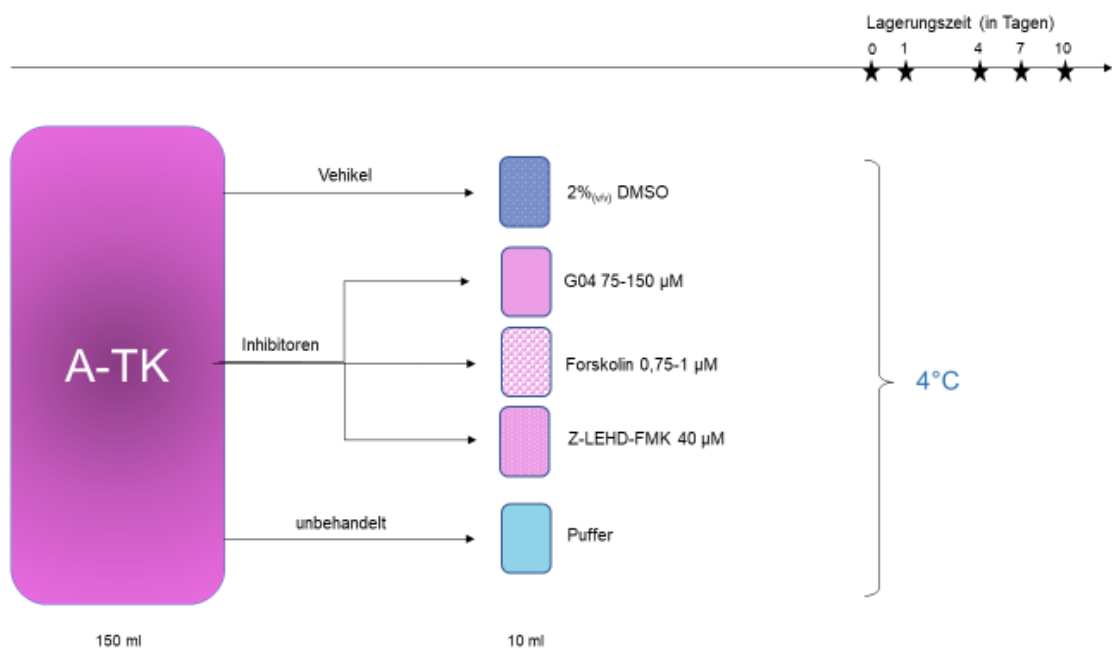


Abbildung 2: **Studiendesign**, schematische Darstellung der Behandlung der verschiedenen A-TK sowie ihrer Lagerungstemperatur

## 2.2.3 Datenerhebung

### 2.2.3.1 Thrombozytenkonzentrat

Das TK wurde mithilfe des Zellseparators Trima Accel (Terumo BCT, Lakewood, USA) gewonnen. Den Thrombozyten in 35% Plasma wurde die Additivlösung SSP+ (Macopharma, Mouvaux, Frankreich) zugefügt. Am Ende des Herstellungsprozesses enthielt ein, in dem gasdurchlässigen, sterilen Beutelsystem Compoflex (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

aufbewahrtes, A-TK etwa 150 mL und  $1-2 \times 10^{11}$  Thrombozyten. Vor Behandlung des A-TK auf verschiedene Weise, wurde dieses für eine Stunde bei RT auf einem Agitator aufbewahrt.

#### 2.2.3.2 Zellzahlmessung

Zur Bestimmung der Zellzahl der Thrombozytenkonzentrate und die TRP wurde CellDyn (Abbott, Illinois, USA) verwendet, wobei die Zahl der Thrombozyten sowie weiterer Blutzellen gemessen wurden. Um die TRP zu gewinnen und dessen Zellzahl messen zu können, wurde das in Citrat-Monovetten abgenommene Vollblut gesunder Blutspender bei  $120 \times g$  für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss der Zellzahlmessung, erfolgte eine Zellzahleinstellung der Thrombozyten auf  $3 \times 10^5$  Zellen /  $\mu\text{L}$  mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS).

#### 2.2.3.3 Apoptose-Inhibitoren

An Tag 0 wurden jeweils 10 mL des A-TK auf mehrere sterile Beutel (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) verteilt, wobei sterile Care-Lock Adapter (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) zur Senkung der Kontaminationswahrscheinlichkeit verwendet wurden. Die Aufteilung und Inkubation wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Unmittelbar nach entsprechender Inkubation wurden die Proben bei  $4^\circ\text{C}$ , unter ständiger Agitation gelagert. Die TK wurden mit den Apoptose-Inhibitoren G04 in den Konzentrationen 75-150  $\mu\text{M}$ , Forskolin in 0,75-1  $\mu\text{M}$  und Z-LEHD-FMK in 40  $\mu\text{M}$  behandelt. Alle Inhibitoren wurden in dem Vehikel DMSO verdünnt. Weiterhin wurde ein TK mit 2% DMSO bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert, als Vehikelkontrolle. Dazu wurde ein unbehandeltes TK bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert, um eine potenzielle Auswirkung des Vehikels auszuschließen.

Eine vorangegangene Titration der Inhibitoren an sowohl TRP als auch TK, wurde für die G04-Konzentrationen 600, 300 und 150  $\mu\text{M}$  vorgenommen. Die Titration von Forskolin in 0,5, 0,75, 1, 1,5 und 2  $\mu\text{M}$  wurde ebenfalls an TK

durchgeführt. Vor Beginn dieser Arbeit wurde der Inhibitor Z-LEHD-FMK bereits durch Irene Marini titiert, wodurch 40  $\mu\text{M}$  als die optimale Konzentration etabliert wurde.

#### 2.2.3.4 Färbung mit Annexin und Calcein

In ein Durchflusszytometrie-Röhrchen mit 100  $\mu\text{L}$  Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (TRIS-Puffer) wurden  $3 \times 10^5$  Thrombozyten aus den A-TK hinzugegeben. Die Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{L}$  APC Annexin V (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 1  $\mu\text{L}$  Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 15 min bei RT gefärbt. Die Proben wurden bei RT im Dunkeln für 30 min inkubiert. Unmittelbar im Anschluss an die Verdünnung mit 400  $\mu\text{L}$  TRIS-Puffer, wurden die Proben von dem Durchflusszytometer Navios (Beckman Coulter, Brea, USA) analysiert. Als Positivkontrolle dienten frische Thrombozyten aus TRP. Diese Messungen wurden für das Ausgangs-TK an sowie für die verschieden behandelten TKs an den Tagen 1, 4, 7 und 10 vorgenommen.

#### 2.2.3.5 Färbung mit Tetramethylrhodaminethylester/TMRE und CD41

Die Thrombozyten der A-TK wurden auf  $3 \times 10^5$  Zellen/ $\mu\text{L}$  eingestellt. Für jede TK-Probe wurden drei 1,5 ml Eppendorf Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit 20  $\mu\text{L}$  PBS (Proben A-C), ein viertes mit 19  $\mu\text{L}$  PBS und 1  $\mu\text{L}$  FCCP (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) (Probe D) befüllt. Zu den Proben A-D wurden jeweils 25  $\mu\text{L}$  der mit PBS verdünnten Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 37°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Die Proben A wurden mit 5  $\mu\text{L}$  IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 Isotypkontrolle (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gefärbt. Die Proben B wurden mit 5  $\mu\text{L}$  CD41-PC5 (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich), die Proben C sowie D mit jeweils 5  $\mu\text{L}$  von 500 nM TMRE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), gefärbt. Alle Proben wurden dann bei RT im Dunkeln für weitere 30 min inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurde der Inhalt der Eppendorf Tubes in, mit 450  $\mu\text{L}$  gefüllte, Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und unmittelbar am

Durchflusszytometer analysiert. Als Positivkontrolle dienten frische Thrombozyten aus TRP. Diese Messungen wurden für das Ausgangs-TK an Tag 0, sowie für die verschiedenen behandelten TKs an den Tagen 1, 4, 7 und 10 vorgenommen.

#### **2.2.4 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 8 (La Jolla, USA) verwendet, wobei  $p < 0.05$  als statistisch signifikant angesehen wurde. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Der Vergleich des Mittelwertes zweier abhängiger Gruppen erfolgte durch den gepaarten *t*-Test. Zur Analyse der Streuung der Mittelwerte wurden die einfaktorielle (eine Variable) sowie die zweifaktorielle (zwei Variablen) Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Für die Anlegung von Tabellen mit Messdaten wurde Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) verwendet. Schaubilder wurden mithilfe von Microsoft PowerPoint (Microsoft, Redmond, USA) erstellt.

##### **2.2.4.1 Durchflusszytometrie Auswertung**

Zur Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie wurde die Kaluza Analysesoftware (Beckman Coulter, Brea, USA) verwendet.

Zur Zweiparameterdarstellung und Auswertung der Annexin- und Calcein-Färbungen wurden Punktdarstellungen (Dot Plots) verwendet, sodass Subpopulationen identifiziert werden konnten.

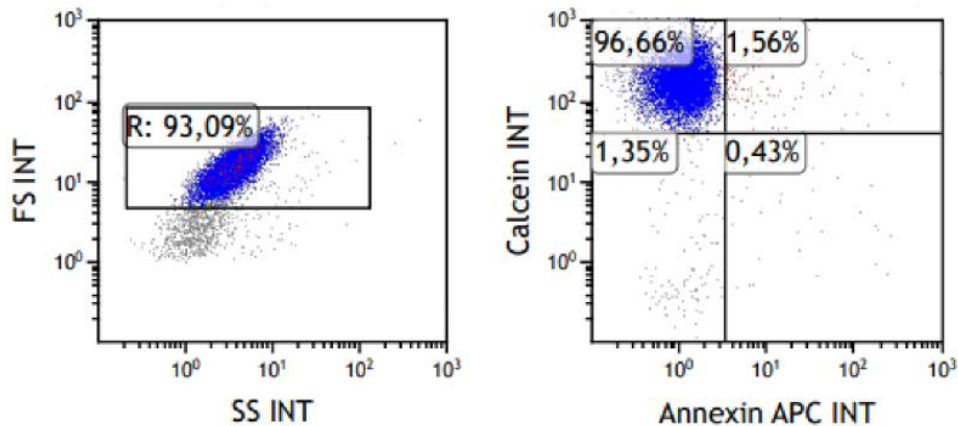


Abbildung 3: **Beispiel Durchflusszyometrie** Graphik der Annexin und Calcein Doppelfärbung eines A-TK mit G04 150µM nach 4 Tagen Lagerung bei 4°C.

Zur Auswertung und Vergleichbarkeit des TMRE-Protokolls wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) hinzugezogen. Die relative MFI berechnet sich aus dem Verhältnis des MFI der Isotypkontrolle zum MFI des Antikörpers TMRE. Hierbei wird der MFI des TMRE durch den MFI der Isotypkontrolle der selben A-TK Probe dividiert.

$$\text{relative MFI (TMRE)} = \frac{\text{MFI (TMRE)}}{\text{MFI (Isotypkontrolle)}}$$

### 2.2.5 Ethikvotum

Die Studie erfolgte nach Zustimmung durch die zuständige Ethikkommission am Universitätsklinikum Tübingen und gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (Projekt-Nr. 507/2017BO1).

### 3. Ergebnisse

Zur Quantifizierung einer potenziellen Inhibition der intrinsischen Apoptose in kühlgelagerten Thrombozyten, wurden 7 Thrombozytenkonzentrate mit G04, Forskolin oder Z-LEHD-FMK behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden diese mit Annexin, als Marker der Phosphatidylserin-Externalisierung, sowie TMRE, welches das mitochondriale Membranpotenzial veranschaulicht und Calcein, zur Darstellung der Zellviabilität, gefärbt.

#### 3.1 G04

##### 3.1.1 Einfluss von G04 auf die Externalisierung von Phosphatidylserin

Als Marker der Apoptose wurde Annexin APC eingesetzt, welches das auf der Oberfläche apoptotischer Thrombozyten zu findende Phosphatidylserin bindet. Die Angabe der Annexin-positiven Zellen, respektive deren Mittelwertes, erfolgt in Prozent. Es liegen Daten für 7 TK, zu 4 Messzeitpunkten (Tag 1, 4, 7 und 10) vor, welche statistisch gepaart mittels dem abhängigen *t*-Test analysiert wurden. Die Kontrollproben des unbehandelten und bei 4°C gelagerten TK (4°C) wiesen an Tag 4 ein signifikant höheres Signal Annexin-positiver, apoptotischer Zellen auf als an Tag 1 (4°C Tag 1 vs. Tag 4 Mittelwert  $\pm$  Standardfehler:  $1,55 \pm 0,25$  vs.  $5,70 \pm 0,78$ , respektive, ***t*(6)= 5,5, p= 0,0015**). Auch für die an Tag 7 ( $19,94 \pm 4,69$ , ***t*(6)= 3,95, p= 0,0076**) sowie Tag 10 ( $57,60 \pm 5,58$ , ***t*(6)= 9,86, p<0,0001**) gemessenen Zellen war eine statistische Signifikanz im Vergleich zu Tag 1 nachweisbar (Abbildung 4). Es konnte demnach ein apoptotischer Effekt der Zellen über den Messzeitraum anhand der 4°C-Proben festgestellt werden. Um einen möglichen anti-apoptotischen Effekt durch das Lösungsmittel der Inhibitoren auszuschließen, wurde die Vehikelkontrolle 4°C + DMSO mit der 4°C Kontrolle verglichen. Dieser Vergleich der TK bei 4°C mit und ohne DMSO ergab für alle Messtage eine nicht signifikante Differenz der Annexin-positiven Zellen (4°C vs. 4°C + DMSO Tag 1:  $1,55 \pm 0,25$  vs.  $1,82 \pm 0,17$ , ***t*(6)= 1,10, p= 0,3120**; Tag 4:  $5,70 \pm 0,78$  vs.  $5,22 \pm 0,83$ , ***t*(6)= 1,04, p= 0,3375**; Tag 7:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $17,59 \pm 3,08$ , ***t*(6)= 1,01, p= 0,3497**; Tag 10:  $57,60 \pm 5,58$  vs.  $60,17 \pm 5,06$ , ***t*(6)= 1,61, p= 0,1590**). Diese Daten lassen darauf schließen, dass der Vehikel DMSO keinen Einfluss auf die durch Kälte induzierte Apoptose hat.



Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte der Vergleich der Inhibitoren im Weiteren mit der unbehandelten 4°C Kontrolle. Wie in Abbildung 4 erkennbar konnte an Tag 7 für beide gemessenen Konzentrationen des RhoA-Inhibitors G04 (75 µM und 150 µM), ein signifikant geringerer Anteil Annexin-positiver Zellen gefunden werden als bei 4°C ohne Inhibitoren (4°C vs. 75 µM G04:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $12,48 \pm 3,41$ ,  $t(6)= 2,98$ ,  $p= 0,0248$ ; 4°C vs. 150 µM G04:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $9,39 \pm 1,8$ ,  $t(6)= 2,46$ ,  $p= 0,0491$ ). Auch an Tag 10 war die Differenz von 4°C ( $57,60 \pm 5,58$ ) zu 75 µM G04 ( $45,64 \pm 4,94$ ) signifikant ( $t(6)= 3,55$ ,  $p= 0,0121$ ), wobei auch hier G04 den geringeren Anteil aufwies. Bei einem Mittelwert von etwa 33% für die Konzentration 150 µM ( $33 \pm 4,74$ ), war, zu 4°C an Tag 10, eine hochsignifikante Differenz ( $t(6)= 8,55$ ,  $p= 0,001$ ) nachweisbar. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann ein anti-apoptotischer Effekt auf Thrombozyten durch den Inhibitor G04 in den Konzentrationen 75 µM und eine noch stärkere Auswirkung durch 150 µM angenommen werden, welcher hier bis einschließlich Tag 10 nach Gewinnung des TK festgestellt wurde.

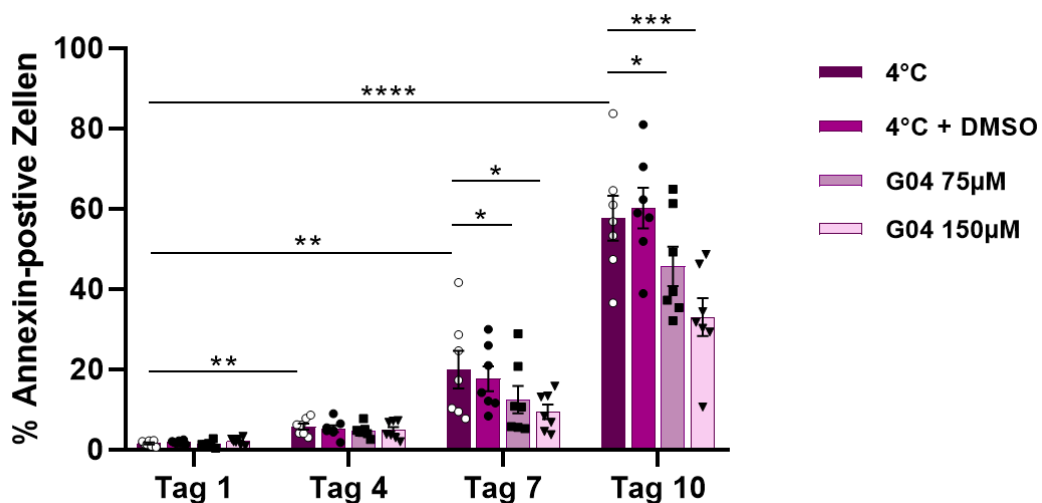


Abbildung 4: **G04: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75 µM und 150 µM bei 4°C Lagerung. Vergleich von G04 gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n= 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p< 0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

Im Weiteren soll das Ausmaß der Apoptoseinhibition durch G04 dargestellt werden, wobei die Angabe als Differenz zur 4°C Kontrolle in Prozentpunkten erfolgt. In diesem Rahmen wurden auch die beiden untersuchten Konzentrationen zueinander verglichen. An Tag 1 wurde eine signifikant höhere Apoptoseinhibition durch G04 75 µM ( $0,23 \pm 0,23$ ) als durch 150 µM ( $-0,50 \pm 0,32$ ) festgestellt ( **$t(6) = 2,94$ ,  $p = 0,0258$** ). Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Differenzen zu 4°C zu Beginn der Inkubation, insbesondere an Tag 1, sehr gering sind, sodass bereits kleine Abweichungen eine statistische Signifikanz abbilden können. Sowohl an Tag 4, als auch an Tag 7, war die Differenz zwischen den Konzentrationen nicht signifikant (75 µM vs. 150 µM G04 Tag 4:  $1,01 \pm 0,65$  vs.  $0,91 \pm 0,98$ ,  **$t(6) = 0,11$ ,  $p = 0,9151$** ; Tag 7:  $7,46 \pm 2,51$  vs.  $10,55 \pm 4,29$ ,  **$t(6) = 0,95$ ,  $p = 0,3767$** ). Mit einer Inhibition der Apoptose um etwa 25 Prozentpunkte gegenüber der 4°C Kontrolle konnte G04 in 150 µM (Tag 10:  $24,61 \pm 2,88$ ) die Apoptose hochsignifikant stärker inhibieren als G04 in 75 µM ( $11,96 \pm 3,37$ ,  **$t(6) = 4,46$ ,  $p = 0,0043$** ). Langfristig gesehen, kann 150 µM als die Konzentration mit dem geringsten Anteil an Annexin-positiven und demnach apoptotischen Thrombozyten angenommen werden und daraus auf den stärkeren anti-apoptotischen Effekt dieser Konzentration geschlossen werden.

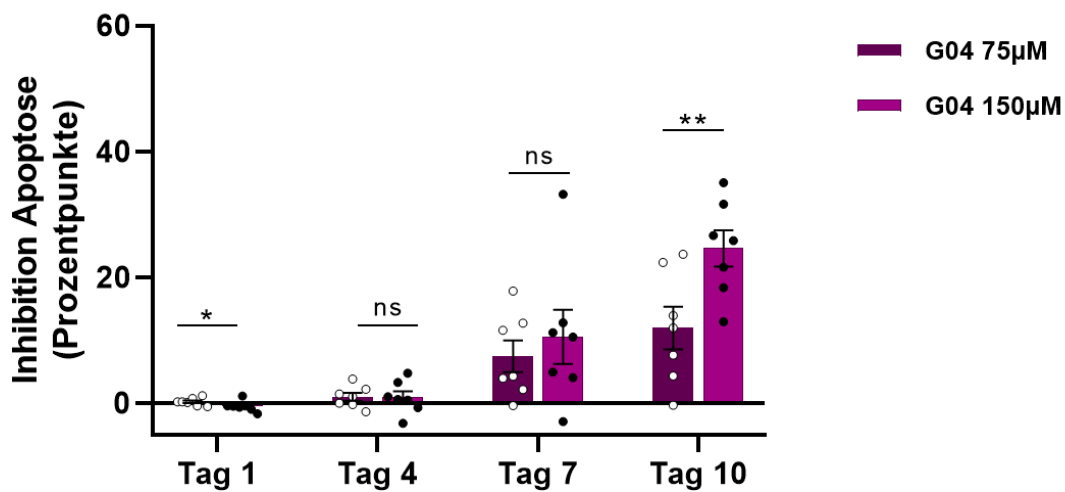


Abbildung 5: **Inhibition Apoptose in Prozentprozentpunkten** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75 µM und 150 µM bei 4°C.Lagerung. Inhibition Apoptose ist definiert als Differenz: % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt) - % Annexin-positiver Thrombozyten G04 (75/ 150 µM). Vergleich der beiden Konzentrationen gegeneinander. Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit n= 7, dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. \* p<0,05; ns: nicht signifikant.

Als weitere Darstellungsmöglichkeit wurde das Verhältnis des prozentualen Anteils Annexin-positiver Zellen der 4°C Kontrolle zu 75 µM, respektive 150 µM, G04 als Quotient (% Annexin-positiver Zellen G04 / % Annexin-positiver Zellen 4°C) bestimmt. Dieses Verhältnis wird im Weiteren mit dem Begriff Fold Decrease bezeichnet, welcher eine relative Änderung ausdrückt. In der Abbildung 6v ist die 4°C Kontrolle an allen Messtagen mit einem Wert von 1 dargestellt. An Tag 1 war die Differenz des Verhältnisses zu 4°C (1,00) weder für 75 µM ( $0,88 \pm 0,14$ ,  $t(6) = 0,88$ ,  $p = 0,4143$ ) noch 150 µM ( $1,49 \pm 0,28$ ,  $t(6) = 1,78$ ,  $p = 0,1247$ ) statistisch signifikant. Ebenfalls konnte an Tag 4 für keine der beiden Konzentrationen eine statistische Signifikanz gefunden werden (4°C vs. 75 µM:  $1,00$  vs.  $0,88 \pm 0,12$ ,  $t(6) = 1,02$ ,  $p = 0,3486$ ; 4°C vs. 150 µM:  $1,00$  vs.  $0,89 \pm 0,17$ ). An Tag 7 wurde ein signifikant geringeres Verhältnis für 75 µM ( $0,65 \pm 0,10$ ,  $t(6) = 3,68$ ,  $p = 0,0103$ ) sowie 150 µM G04 ( $0,56 \pm 0,13$ ,  $t(6) = 3,43$ ,  $p = 0,0139$ ) gemessen. Hochsignifikant war der Fold Decrease zu 4°C (1,00) an Tag 10 für

75  $\mu\text{M}$  G04 ( $0,80 \pm 0,05$ ,  $t(6) = 4,19$ ,  $p = 0,0057$ ). Der Fold Decrease an Tag 10 war für 150  $\mu\text{M}$  ebenfalls hochsignifikant geringer als  $4^\circ\text{C}$  ohne Inhibitor ( $0,56 \pm 0,06$ ,  $t(6) = 7,73$ ,  $p = 0,0002$ ), wobei die Signifikanz von  $4^\circ\text{C}$  zu 150  $\mu\text{M}$  G04 höher war als zu 75  $\mu\text{M}$  (Abbildung 6). Aus den Messungen und Berechnungen ergibt sich demnach, dass an Tag 10 in den mit 75  $\mu\text{M}$  G04 inkubierten TK etwa 80% der apoptotischen Thrombozyten zu finden sind, welche in den TK ohne Inhibitor bei  $4^\circ\text{C}$  Lagerung (gleichgesetzt mit 100%) nachzuweisen sind. Für G04 in 150  $\mu\text{M}$  sind es ungefähr 56% der apoptotischen Zellen und demnach 44% weniger als bei  $4^\circ\text{C}$  ohne G04, was eine Differenz von 24 Prozentpunkten zu 75  $\mu\text{M}$  G04 bedeutet. Schlussfolgernd kann eine stärkere Apoptoseinhibition durch die Konzentration 150  $\mu\text{M}$  des Inhibitors angenommen werden. Auch ist eine verstärkte relative Apoptoseinhibition im zeitlichen Verlauf auffallend (Abbildung 6).

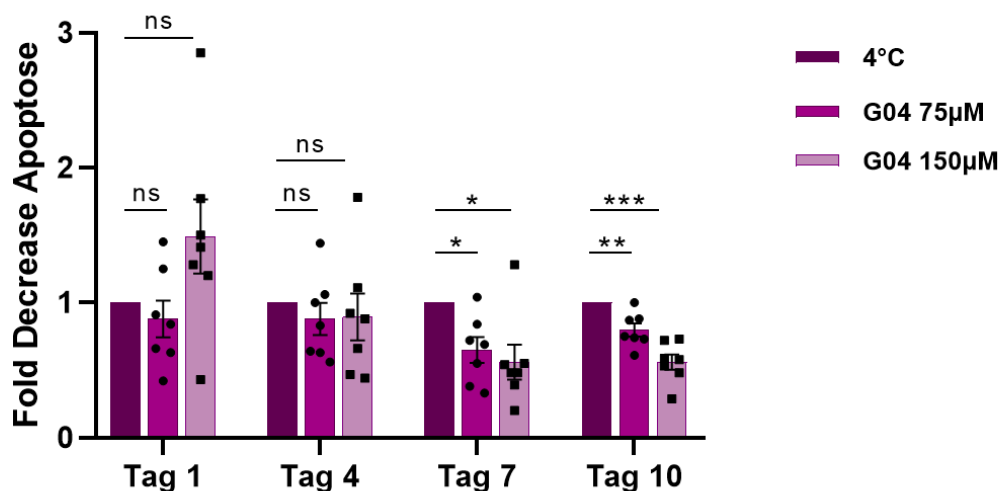


Abbildung 6: **G04 Fold Decrease Apoptose** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  bei  $4^\circ\text{C}$ -Lagerung. Der Fold Decrease stellt die relative Änderung des prozentualen Anteils Annexin-positiver Thrombozyten bei Behandlung mit G04 (75 und 150  $\mu\text{M}$ ) dar (% Annexin-positiver Thrombozyten G04 / % Annexin-positiver Thrombozyten  $4^\circ\text{C}$  [unbehandelt]). Vergleich von G04 (75 und 150  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle ( $4^\circ\text{C}$ ). Die  $4^\circ\text{C}$  Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (% Annexin-positiver Thrombozyten  $4^\circ\text{C}$  / % Annexin-positiver Thrombozyten  $4^\circ\text{C}$ ). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: nicht signifikant.

### 3.1.2 Einfluss von G04 auf das mitochondriale Membranpotenzial von kaltgelagerten Thrombozyten

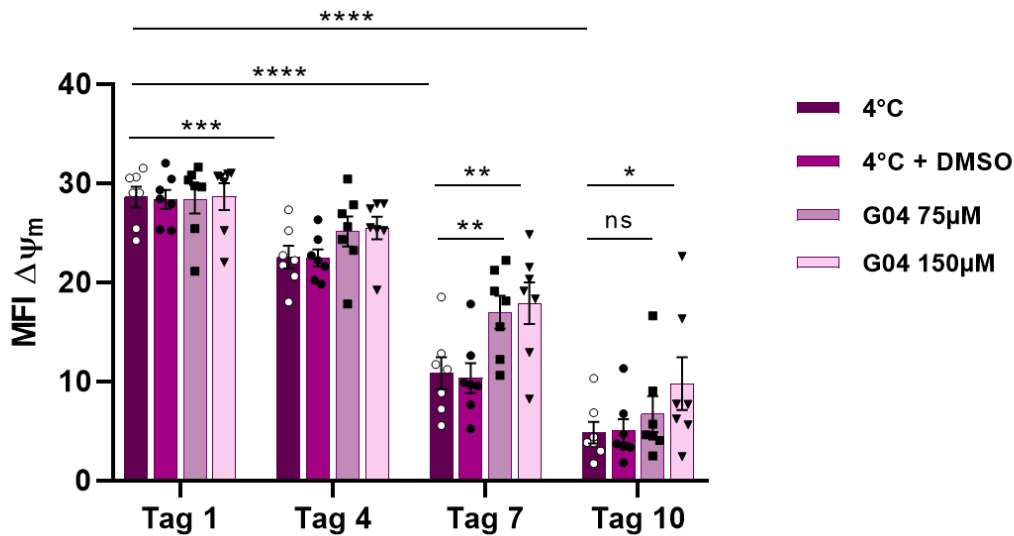


Abbildung 7: **G04: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Vergleich von G04 (75/ 150  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ; ns: nicht signifikant.

Wie zuvor beschrieben in Kapitel 1.4, hat die Induktion des intrinsischen Apoptoseweges den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) zur Folge, welcher mit einer Abnahme des Signals von Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) assoziiert ist. Die Angabe der Stärke des TMRE-Signals erfolgt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zu den Messzeitpunkten Tag 1, 4, 7 und 10, wobei Messdaten zu TK von 7 Blutspendern vorliegen. Die Ergebnisse der Messungen wurden statistisch gepaart verglichen. Zur Feststellung eines potenziellen apoptotischen Effektes über die Abnahme des TMRE-Signals im zeitlichen Verlauf, wurden die Messdaten der 4°C Kontrolle ohne Inhibitor (4°C) an den Tagen 4, 7 und 10 mit den Daten von Tag 1 verglichen. Wie der Abbildung 7 entnommen werden kann, wurde bei diesem Vergleich eine hochsignifikante Abnahme des MFI von Tag 1 zu Tag 4 nachgewiesen (MFI  $\Delta\Psi_m$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C Tag 1 vs. Tag 4: 28,60

$\pm 1,05$  vs.  $22,53 \pm 1,14$ ,  $t(6) = 6,23$ ,  $p = 0,0008$ ), während zu den Tagen 7 und 10 eine höchst signifikante Abnahme gefunden wurde (MFI  $\Delta\Psi_m$   $4^\circ\text{C}$  Tag 1 vs. Tag 7:  $28,60 \pm 1,05$  vs.  $10,83 \pm 1,61$ ,  $t(6) = 9,27$ ,  $p < 0,0001$ ; Tag 1 vs. Tag 10:  $28,60 \pm 1,05$  vs.  $4,84 \pm 1,08$ ,  $t(6) = 15,06$ ,  $p < 0,0001$ ). Über den Messzeitraum fand somit eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials, ausgedrückt als MFI des TMRE, statt, wodurch auf einen zunehmenden apoptotischen Effekt im Zeitverlauf geschlossen werden kann. Der MFI der Vehikelkontrolle  $4^\circ\text{C}$  + DMSO war zu allen Zeitpunkten nicht signifikant zur  $4^\circ\text{C}$  Probe (MFI  $\Delta\Psi_m$   $4^\circ\text{C}$  vs.  $4^\circ\text{C}$  + DMSO Tag 1:  $28,60 \pm 1,05$  vs.  $28,36 \pm 0,95$ ,  $t(6) = 0,78$ ,  $p = 0,4674$ ; Tag 4:  $22,53 \pm 1,14$  vs.  $22,44 \pm 0,86$ ,  $t(6) = 0,16$ ,  $p = 0,8815$ ; Tag 7:  $10,83 \pm 1,61$  vs.  $10,34 \pm 1,51$ ,  $t(6) = 1,38$ ,  $p = 0,2183$ ; Tag 10:  $4,84 \pm 1,08$  vs.  $5,01 \pm 1,19$ ,  $t(6) = 0,91$ ,  $p = 0,3983$ ). Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte der Vergleich der Inhibitoren im Weiteren mit der unbehandelten  $4^\circ\text{C}$  Kontrolle.

Unter Ausschluss eines signifikanten anti-apoptotischen Einflusses des Lösungsmittels der Inhibitoren, wurden die Konzentrationen 75 und 150  $\mu\text{M}$  des Apoptoseinhibitors G04 im Weiteren gegen die  $4^\circ\text{C}$  Kontrolle ausgewertet. Gegenüber  $4^\circ\text{C}$ , war der  $\Delta\Psi_m$  der mit G04, in den Konzentrationen 75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$ , behandelten TK, an Tag 7 hochsignifikant höher (MFI  $\Delta\Psi_m$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler  $4^\circ\text{C}$  vs. 75  $\mu\text{M}$  G04:  $10,83 \pm 1,61$  vs.  $16,99 \pm 1,67$ ,  $t(6) = 5,69$ ,  $p = 0,0013$ ;  $4^\circ\text{C}$  vs. 150  $\mu\text{M}$  G04:  $10,83 \pm 1,61$  vs.  $17,88 \pm 2,11$ ,  $t(6) = 4,64$ ,  $p = 0,0036$ ). Hingegen konnte an Tag 10 keine statistisch signifikante Differenz des mitochondrialen Membranpotenzials zwischen  $4^\circ\text{C}$  und G04 in 75  $\mu\text{M}$  gefunden werden (MFI  $\Delta\Psi_m$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler  $4^\circ\text{C}$  vs. 75  $\mu\text{M}$  G04:  $4,84 \pm 1,08$  vs.  $6,71 \pm 1,82$ ,  $t(6) = 2,39$ ,  $p = 0,0542$ ). Von den in Abbildung 7 dargestellten Proben gab es einzig zu G04 in 150  $\mu\text{M}$  eine statistische Signifikanz (MFI  $\Delta\Psi_m$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler  $4^\circ\text{C}$  vs. 150  $\mu\text{M}$ :  $4,84 \pm 1,08$  vs.  $9,79 \pm 2,67$ ,  $t(6) = 2,58$ ,  $p = 0,0419$ ). Somit wiesen die bei  $4^\circ\text{C}$  gelagerten, mit 150  $\mu\text{M}$  G04 behandelten, Thrombozyten das höchste mitochondriale Membranpotenzial nach einer Lagerungsdauer von 7 und 10 Tagen auf, was die geringste Apoptoseaktivität, respektive die stärkste Apoptoseinhibition, annehmen lässt.

Um den Einfluss des Apoptoseinhibitors zu quantifizieren, wurde das Verhältnis des MFI  $\Delta\Psi_m$  von 75 und 150  $\mu\text{M}$  G04 zu  $4^\circ\text{C}$  bestimmt. Dieses Verhältnis (MFI

$\Delta\Psi_m$  G04 / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C) wird als Ratio  $\Delta\Psi_m$ . Zu Beginn des Messzeitraums, einen Tag nach Inkubation der TK, waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (Ratio  $\Delta\Psi_m$  Tag 1, 4°C vs. 75  $\mu$ M G04: 1,00 vs.  $0,99 \pm 0,03$ ,  $t(6)= 0,46$ ,  $p= 0,6615$ ; 4°C vs. 150  $\mu$ M G04: 1,00 vs.  $1,00 \pm 0,02$ ,  $t(6)\approx 0$ ,  $p>0,9999$ ). An Tag 4 war der Ratio  $\Delta\Psi_m$  sowohl für 75  $\mu$ M, als auch 150  $\mu$ M G04 signifikant höher als der Ratio der Kontrolle (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Tag 4, 4°C vs 75  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,11 \pm 0,03$ ,  $t(6)= 3,29$ ,  $p= 0,0167$ ; 4°C vs. 150  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,14 \pm 0,05$ ,  $t(6)= 2,86$ ,  $p= 0,0287$ ). Das  $\Delta\Psi_m$  Signal (MFI) war bei einer Konzentration von 75  $\mu$ M G04 66%, bei 150  $\mu$ M 72% höher als ohne Inhibitor an Tag 7. Beide dieser Differenzen sind statistisch hochsignifikant (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Tag 7, 4°C vs. 75  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,66 \pm 0,14$ ,  $t(6)= 4,82$ ,  $p= 0,0029$ ; 4°C vs. 150  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,72 \pm 0,18$ ,  $t(6)= 3,98$ ,  $p= 0,0073$ ). Weiterhin war der Ratio  $\Delta\Psi_m$  für 75  $\mu$ M sowie für 150  $\mu$ M G04 am 10. Tag nach Gewinnung ebenfalls hochsignifikant höher (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Tag 10, 4°C vs. 75  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,35 \pm 0,07$ ,  $t(6)= 4,93$ ,  $p= 0,0026$ ; 4°C vs. 150  $\mu$ M G04:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,95 \pm 0,25$ ,  $t(6)= 3,76$ ,  $p= 0,0094$ ). Es wurde ein um

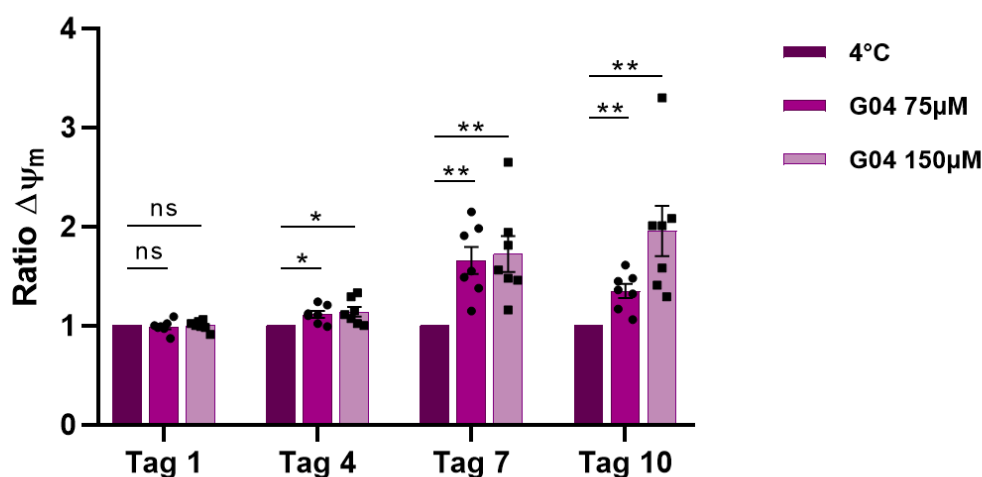


Abbildung 8: **G04: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75  $\mu$ M und 150  $\mu$ M bei 4°C-Lagerung. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  stellt die relative Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des  $\Delta\Psi_m$  von Thrombozyten bei Behandlung mit G04 (75/ 150  $\mu$ M) dar (MFI  $\Delta\Psi_m$  G04 / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C (unbehandelt)). Vergleich von G04 (75/ 150  $\mu$ M) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C). Die 4°C Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n= 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; ns: nicht signifikant.

95% stärkeres Signal des mitochondrialen Membranpotenzials durch G04 in der Konzentration 150  $\mu\text{M}$  am Ende des Messzeitraums gemessen. Der MFI war durch Behandlung mit 75  $\mu\text{M}$  G04 um 35% höher, wobei durch die gepaarte statistische Auswertung eine etwas höhere Signifikanz für 75  $\mu\text{M}$  gefunden wurde.

### 3.1.3 Einfluss von G04 auf die Zellviabilität

Zur Kontrolle und Erhöhung der Validität der vorliegenden Arbeit wurde, neben einem Marker der späten Apoptose (Annexin) und des mitochondrialen Membranpotenzials (TMRE), Calcein als Marker lebensfähiger Zellen eingesetzt. Die Messdaten sind in Prozent (%) Calcein-positiver Zellen, zu den Messzeitpunkten 1, 4, 7 und 10 Tage nach Gewinnung und Inkubation der TK-Proben, angegeben und in Abbildung 9 als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler graphisch dargestellt. Es liegen zu allen Zeitpunkten die Daten von 7 TK vor, welche statistisch gepaart ausgewertet wurden. Wie bei den zuvor beschriebenen Färbungen, wurde auch hier die 4°C Kontrolle im Verlauf des Messzeitraums dargestellt und analysiert. Sowohl an Tag 4, als auch Tag 7, war der Anteil Calcein-positiver Thrombozyten hochsignifikant geringer, als an Tag 1 (% Calcein-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C Tag 1 vs. Tag 4:  $97,05 \pm 0,32$  vs.  $92,46 \pm 0,81$ ,  **$t(6) = 4,75$ ,  $p = 0,0032$** ; Tag 1 vs. Tag 7:  $97,05 \pm 0,32$  vs.  $78,13 \pm 4,74$ ,  **$t(6) = 3,93$ ,  $p = 0,0077$** ). Von Tag 1 zu Tag 10 war eine höchst signifikante Abnahme des Anteils Calcein-positiver Zellen zu verzeichnen ((% Calcein-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C Tag 1 vs. Tag 10:  $97,05 \pm 0,32$  vs.  $40,20 \pm 5,47$ ,  **$t(6) = 10,26$ ,  $p < 0,0001$** ). Kongruent zu den Ergebnissen der Färbungen mit Annexin und TMRE, ist durch die statistisch signifikante Abnahme des Anteils Calcein-positiver Zellen über den Zeitraum von 10 Tagen, eine Abnahme lebensfähiger, respektive Zunahme apoptotischer, Zellen anzunehmen. Es wurde auch hier ein zeitlich bedingter, apoptotischer Effekt festgestellt. In der Gegenüberstellung der Proben mit und ohne DMSO ergab sich für die Tage 1 bis 7 keine signifikante Differenz (4°C vs. 4°C + DMSO Tag 1:  $97,05 \pm 0,32$  vs.  $96,91 \pm 0,40$ ,  **$t(6) = 0,38$ ,  $p = 0,7167$** ; Tag 4:  $92,46 \pm 0,81$  vs.



91,23 ± 1,68,  $t(6) = 0,91$ ,  $p = 0,8815$ ; Tag 7: 78,13 ± 4,74 vs. 80,42 ± 3,32,  $t(6) = 1,06$ ,  $p = 0,3304$ ). Einzig an Tag 10 war eine statistische Signifikanz vorzufinden (% Calcein-positiver Zellen, Mittelwert ± Standardfehler, 4°C vs. 4°C + DMSO: 40,20 ± 5,47 vs. 33,07 ± 3,98,  $t(6) = 2,52$ ,  $p = 0,0453$ ). Da die Vehikelkontrolle hierbei den geringeren Anteil lebensfähiger Zellen aufweist, ist von keiner zusätzlichen anti-apoptotischen Wirkung des Vehikels DMSO auszugehen, sodass der Vergleich der Proben mit 75 und 150 µM G04 zur Kontrolle ohne DMSO (abgekürzt als 4°C) erfolgte. G04 wies, in beiden getesteten Konzentrationen, an Tag 7 einen signifikant höheren Anteil an Zellen auf, welche als Calcein-positiv identifiziert wurden (% Calcein-positiver Zellen, Mittelwert ± Standardfehler, 4°C vs. 75 µM G04: 78,13 ± 4,74 vs. 86,06 ± 3,55,  $t(6) = 3,31$ ,  $p = 0,0162$ ; 4°C vs. 150 µM G04: 78,13 ± 4,74 vs. 89,12 ± 1,84,  $t(6) = 2,79$ ,  $p = 0,0317$ ). Mit 61% Calcein-positiver Zellen nach 10 Tagen, bei 4°C Lagerung und Inkubation mit 150 µM G04, waren diese TK als jene mit dem höchsten Mittelwert zu eruieren (Abbildung 9). Hierbei war die Differenz zur 4°C Kontrolle statistisch hochsignifikant (% Calcein-positiver Zellen, Mittelwert ± Standardfehler 4°C vs.

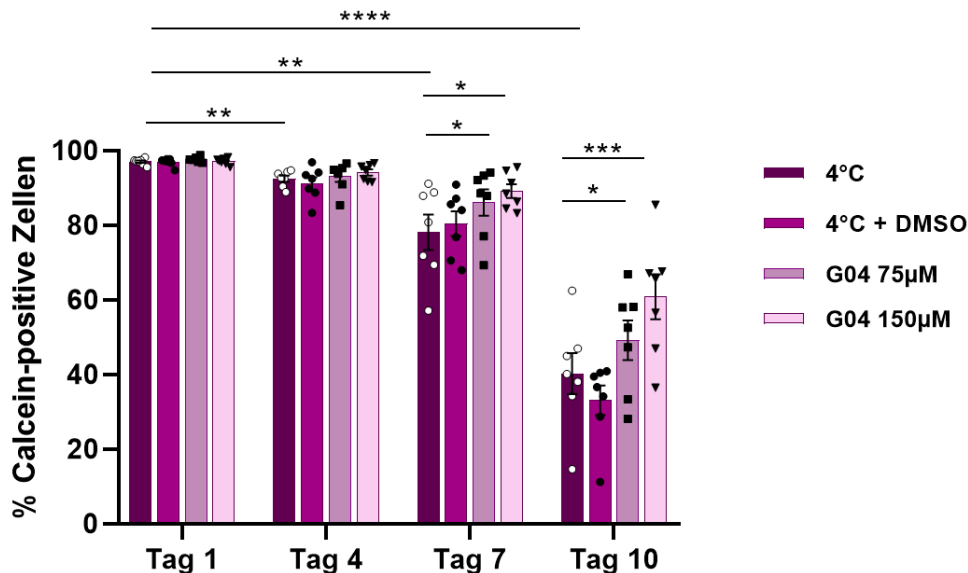


Abbildung 9: **G04: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit G04 in den Konzentrationen 75 µM und 150 µM bei 4°C Lagerung. Vergleich von G04 gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

150  $\mu\text{M}$  G04:  $40,20 \pm 5,47$  vs.  $60,82 \pm 6,02$ ,  $t(6) = 7,58$ ,  $p = 0,0003$ ). Ebenfalls statistisch signifikant, jedoch in geringerem Ausmaß, war der Unterschied zu 75  $\mu\text{M}$  G04 (% Calcein-positiver Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $4^\circ\text{C}$  vs. 75  $\mu\text{M}$  G04:  $40,20 \pm 5,47$  vs.  $49,17 \pm 5,30$ ,  $t(6) = 3,43$ ,  $p = 0,0140$ ). Bei Thrombozyten, welche mit G04 behandelt wurden, war ein deutlich höherer Prozentsatz lebensfähiger Zellen vorzufinden, wobei die Konzentration 150  $\mu\text{M}$  einen stärkeren Einfluss auf die Inhibition der Apoptose zu haben scheint.

## 3.2 Forskolin

### 3.2.1 Einfluss von Forskolin auf die Externalisierung von Phosphatidylserin

Annexin APC wurde als Marker der Apoptose verwendet. Die Angabe der Annexin-positiven Zellen, respektive deren Mittelwertes, erfolgt in Prozent. Es liegen Daten für 7 TK, zu 4 Messzeitpunkten (Tag 1, 4, 7 und 10) vor, welche statistisch gepaart mittels dem abhängigen  $t$ -Test analysiert wurden. In diesem Abschnitt findet sich eine Gegenüberstellung der mit Forskolin, einem die Proteinkinase A aktivierenden Apoptoseinhibitor, behandelten TK und der Kontrollproben. Die Behandlung erfolgte in mit 0,75  $\mu\text{M}$  sowie 1  $\mu\text{M}$  Forskolin, welche in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst sind. Es wurde eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils Annexin-positiver Zellen im zeitlichen Verlauf festgestellt. Hierfür wurden die unbehandelten, kühlgelagerten Proben (abgekürzt mit  $4^\circ\text{C}$ ) an Tag 1 gegen die Tage 4, 7 und 10 statistisch ausgewertet. Es konnte ein apoptotischer Effekt der Zellen über den Messzeitraum anhand der  $4^\circ\text{C}$ -Kontrollprobe gefunden werden. Im nächsten Schritt wurde eine relevante anti-apoptotische Wirkung durch DMSO ausgeschlossen, indem  $4^\circ\text{C}$  mit  $4^\circ\text{C} + \text{DMSO}$  zu allen Messzeitpunkten verglichen wurde, was keine statistische Signifikanz ergab (Kapitel 3.1.1). Die Daten der TK mit 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Forskolin wurden mit den unbehandelten TK verglichen. Gegenübergestellt ergab dieser Vergleich an Tag 7 einen signifikant geringeren Prozentsatz Annexin-positiver Thrombozyten bei beiden Konzentrationen Forskolin-behandelter Proben (% Annexin-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag

7, 4°C vs. 0,75 µM Forskolin:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $6,55 \pm 1,09$ ,  $t(6) = 3,41$ ,  $p = 0,0143$ ; 4°C vs. 1 µM Forskolin:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $6,94 \pm 1,26$ ,  $t(6) = 2,80$ ,  $p = 0,0314$ . Statistisch hochsignifikant und somit die höchste Signifikanz konnte zwischen 4°C und Forskolin in 0,75 µM an Tag 10 gefunden werden. Dabei war der Anteil Annexin-positiver, apoptotischer Zellen zu diesem Messzeitpunkt für die TK mit 0,75 µM Forskolin um etwa 16 Prozentpunkte geringer (% Annexin-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler Tag 10 4°C vs. 0,75 µM Forskolin:  $57,60 \pm 5,58$  vs.  $41,60 \pm 5,97$ ,  $t(6) = 5,46$ ,  $p = 0,0016$ ). Ebenfalls wurde an Tag 10 für 1 µM Forskolin ein statistisch signifikanter, geringerer Prozentsatz apoptotischer Zellen gemessen (% Annexin-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler Tag 10 4°C vs. 1 µM Forskolin:  $57,60 \pm 5,58$  vs.  $43,54 \pm 3,44$ ,  $t(6) = 3,22$ ,  $p = 0,0181$ ). Für beide Konzentrationen von Forskolin ist, anhand der vorliegenden Ergebnisse, ein die Apoptose inhibierender Effekt bei kühlgelagerten Thrombozyten anzunehmen.

Als nächstes wurde aus dem Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen, die Differenz zwischen 4°C und 0,75 µM, respektive 1 µM, Forskolin bestimmt. Diese

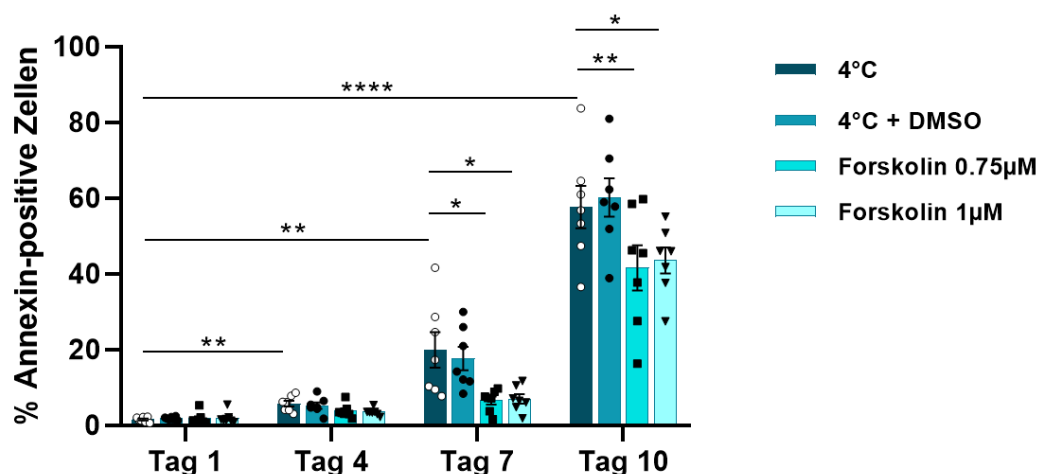


Abbildung 10: **Forskolin: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75 µM und 1 µM bei 4°C Lagerung. Vergleich von Forskolin gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Differenz (% Annexin-positiver Zellen 4°C - % Annexin-positiver Zellen 4°C + Forskolin) wird hier als Inhibition der Apoptose bezeichnet und ist in Prozentpunkten angegeben (Abbildung 11). Dies erlaubte eine direkte Gegenüberstellung der beiden verwendeten Konzentrationen von Forskolin. Aus dem direkten Vergleich der Konzentrationen ergab sich für alle gemessenen Zeitpunkte keine statistische Signifikanz (% Inhibition Apoptose Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 0,75  $\mu$ M vs. 1  $\mu$ M Tag 1:  $-0,24 \pm 0,67$  vs.  $-0,41 \pm 0,76$ ,  $t(6) = 0,18$ ,  $p = 0,8656$ ; Tag 4:  $1,94 \pm 0,59$  vs.  $2,18 \pm 0,58$ ,  $t(6) = 0,67$ ,  $p = 0,5257$ ; Tag 7:  $13,39 \pm 3,92$  vs.  $13,00 \pm 4,65$ ,  $t(6) = 0,44$ ,  $p = 0,6758$ ; Tag 10:  $16,00 \pm 2,93$  vs.  $14,06 \pm 4,36$ ,  $t(6) = 0,46$ ,  $p = 0,6652$ ). Schlussfolgernd kann angenommen werden, dass sowohl 0,75  $\mu$ M als auch 1  $\mu$ M Forskolin eine vergleichbare Auswirkung auf die Inhibition der Apoptose von Thrombozyten bei 4°C-Lagerung haben.

Um den Unterschied apoptotischer Zellen zur unbehandelten °C Probe zu quantifizieren, wurde der zuvor beschriebene Fold Decrease angewandt (Kapitel 3.1.2). Der Fold Decrease gibt hier über die relative Änderung der Annexin-positiven Zellen durch eine Behandlung mit Forskolin Aufschluss. Er wird als Quotient (% Annexin-positiver Zellen Forskolin / % Annexin-positiver Zellen 4°C)

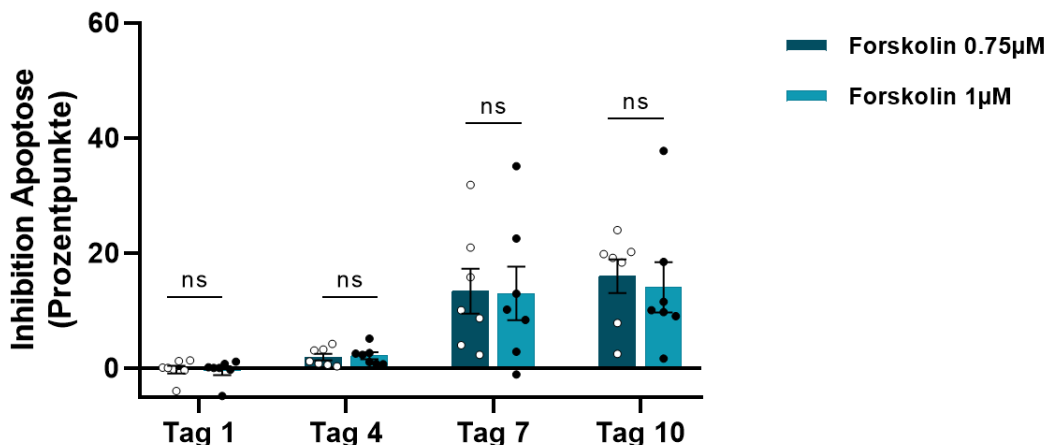


Abbildung 11: **Forskolin: Inhibition Apoptose in Prozentpunkten** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu$ M und 1  $\mu$ M bei 4°C-Lagerung. Inhibition Apoptose ist definiert als Differenz: % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt) - % Annexin-positiver Thrombozyten Forskolin (0,75 und 1  $\mu$ M). Vergleich der beiden Konzentrationen gegeneinander. Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. ns: nicht signifikant.

berechnet. Wie in Abbildung 12 dargestellt, nimmt die 4°C Kontrolle an allen Messtagen den Wert 1 an (% Annexin-positiver Zellen 4°C / % Annexin-positiver Zellen 4°C). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte zwischen 4°C und Forskolin in den Konzentrationen 0,75 µM und 1 µM. An Tag 1 war die Differenz des Verhältnisses weder für 0,75 µM ( $1,35 \pm 0,47$ ,  $t(6) = 0,75$ ,  $p = 0,4798$ ) noch 1 µM (Fold Decrease Apoptose, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. 0,75 µM,  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,35 \pm 0,47$ ,  **$t(6) = 0,75$ ,  $p = 0,4798$** ; 4°C vs. 1 µM  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,96 \pm 1,10$ ,  $t(6) = 0,88$ ,  $p = 0,4151$ ) statistisch signifikant. Hochsignifikant waren hingegen alle der in Abbildung 12 dargestellten Vergleiche ab Tag 4 bis einschließlich Tag 10. An Tag 4 war durch Forskolin in 0,75 µM ein 0,67-facher Anteil apoptotischer Zellen anzutreffen, während es an Tag 7 lediglich ein 0,38-facher Anteil war. Zum letzten Zeitpunkt, an Tag 10, näherten sich die Werte wieder an, hier erreichte der Fold Decrease einen Wert von 0,70, doch blieb die Differenz statistisch hochsignifikant (Fold Decrease Apoptose, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. 0,75 µM Tag 4:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $0,67 \pm 0,07$ ,  **$t(6) = 4,49$ ,  $p = 0,0041$** ; Tag 7:  $1,00$  vs.  $0,38 \pm 0,07$ ,  **$t(6) = 8,33$ ,  $p = 0,0002$** ; Tag 10:  $1,00$  vs.  $0,70 \pm 0,06$ ,  **$t(6) = 4,66$ ,  $p = 0,0035$** ). Auch die Differenzen zum Fold Decrease von 1 µM Forskolin waren für diesen Zeitraum hochsignifikant geringer (Fold Decrease Apoptose, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. Forskolin 1 µM: Tag 4,  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $0,65 \pm 0,05$ ,  **$t(6) = 6,52$ ,  $p = 0,0006$** ; Tag 7:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $0,45 \pm 0,13$ ,  **$t(6) = 4,27$ ,  $p = 0,0052$** ; Tag 10:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $0,77 \pm 0,05$ ,  **$t(6) = 4,83$ ,  $p = 0,0029$** ). Diese Werte der beiden Konzentrationen von Forskolin, welche sich ab Tag 4 unter einem Wert von 1,0 bewegen, zeigen, dass eine relative Abnahme apoptotischer Thrombozyten bei Kühlung durch Forskolin erreicht werden

konnte. Es waren nach 7 Tagen 62% weniger, respektive 38% der apoptotischen Zellen anzutreffen, was durch eine Inkubation mit 0,75  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Die höchste statistische Signifikanz ( $p= 0,0002$ ) und der größte prozentuale Unterschied (62%) wurden den Ergebnissen entsprechend an Tag 7 mit 0,75  $\mu\text{M}$  des Inhibitors gemessen.

### 3.2.2 Einfluss von Forskolin auf das mitochondriale Membranpotenzial

Zur Erfassung von Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi\text{m}$ ), wurde Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) verwendet (Kapitel 2.2.3.5). Die Angabe der Quantifizierung von  $\Delta\Psi\text{m}$  erfolgt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des TMRE-Signals. Es wurden Messungen zu 4 Zeitpunkten nach Inkubation, an den Tagen 1, 4, 7 und 10, durchgeführt. Für den Tag 4 liegen für die TK mit 1  $\mu\text{M}$  Forskolin Daten zu 6 Blutspendern vor. Zu allen anderen Messzeitpunkten und für die anderen TK liegen Daten zu 7 Spendern vor, welche statistisch gepaart ausgewertet wurden. Über eine statistische

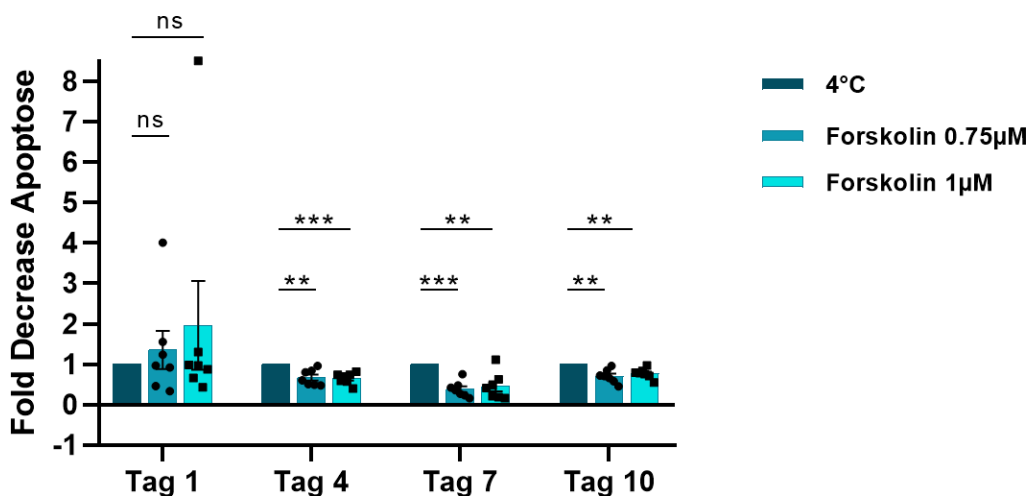


Abbildung 12: **Forskolin: Fold Decrease Apoptose** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Der Fold Decrease stellt die relative Änderung des prozentualen Anteils Annexin-positiver Thrombozyten bei Behandlung mit Forskolin (0,75 und 1  $\mu\text{M}$ ) dar (% Annexin-positiver Thrombozyten Forskolin / % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt)). Vergleich von Forskolin (0,75 und 1  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C). Die 4°C Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (% Annexin-positiver Thrombozyten 4°C / % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n= 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p< 0,001$ ; ns: nicht signifikant.

Signifikanz der Abnahme des MFI  $\Delta\Psi_m$  (MFI) im zeitlichen Verlauf anhand der unbehandelten 4°C TK, konnte ein apoptotischer Effekt der kühlgelagerten Thrombozyten über den Messzeitraum nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Tag 1 waren der MFI von 4°C an Tag 4 hochsignifikant, an den Tagen 7 und 10 höchst signifikant geringer. Auch konnte eine signifikante anti-apoptotische Wirkung des Vehikels DMSO ausgeschlossen werden, indem die Vehikelkontrolle (4°C + DMSO) mit der unbehandelten 4°C verglichen wurde, was zu keinem der Messzeitpunkte eine statistische Signifikanz ähnlich wie die Beobachtungen für die G04-behandelten Proben (Kapitel 3.1.2). Fortan erfolgte die Gegenüberstellung zwischen 4°C und 4°C mit Forskolin in 0,75  $\mu\text{M}$ , respektive 1  $\mu\text{M}$ . Das Resultat der statistischen Tests kann der Abbildung 13 entnommen werden. Gegenüber 4°C war der  $\Delta\Psi_m$  der mit 0,75  $\mu\text{M}$  behandelten TK statistisch signifikant höher an Tag 7 (MFI  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 7, 4°C vs. Forskolin 0,75  $\mu\text{M}$ ,  $10,83 \pm 1,61$  vs.  $12,74 \pm 1,65$ ,  **$t(6) = 3,94$ ,  $p = 0,0076$** , 4°C vs. Forskolin 1  $\mu\text{M}$   $10,83 \pm 1,61$  vs.  $13,13 \pm 1,62$ ,  **$t(6) = 3,70$ ,  $p = 0,0101$** ). Auch an Tag 10 konnte ein signifikant stärkeres  $\Delta\Psi_m$  Signal für beide Konzentrationen von Forskolin gefunden werden (MFI  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 10, 4°C vs. 0,75  $\mu\text{M}$  Forskolin:  $4,84 \pm 1,08$  vs.  $6,26 \pm 1,41$ ,  **$t(6) = 3,54$ ,  $p = 0,0123$** ; 4°C vs. 1  $\mu\text{M}$  Forskolin:  $4,84 \pm 1,08$  vs.  $6,61 \pm 1,74$ ,  **$t(6) = 2,61$ ,  $p = 0,0403$** ). Durch die beschriebenen statistisch signifikant höheren MFI-Werte kann für beide Konzentrationen von Forskolin eine Verminderung der apoptotischen Aktivität angenommen werden. Diese Untersuchung bezieht sich auf die mitochondrialen Membranpotenzial Veränderungen, welche Upstream im intrinsischen Apoptoseweg als Annexin anzutreffen sind. Der höchste MFI, respektive der geringste apoptotische Effekt, festgelegt am Einfluss auf  $\Delta\Psi_m$ ,

wurde sowohl an Tag 7 als auch Tag 10, durch die Behandlung mit 0,75 und 1  $\mu\text{M}$  Forskolin erreicht

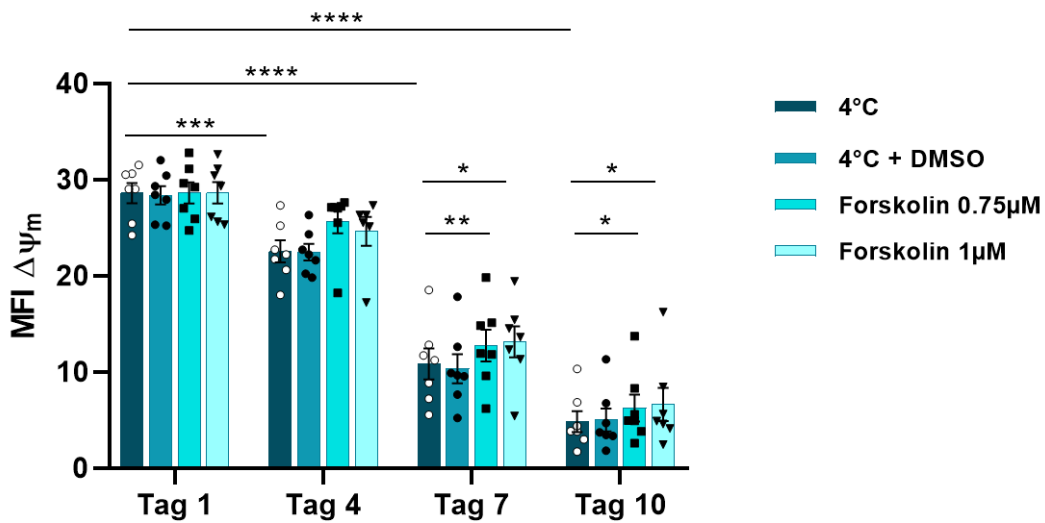


Abbildung 13: **Forskolin: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Vergleich von Forskolin (0,75 und 1  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$  (Ausnahme:  $n=6$  für Forskolin 1  $\mu\text{M}$  an Tag 4), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

Die Bestimmung des Verhältnisses des  $\Delta\Psi_m$  von 0,75 und 1  $\mu\text{M}$  Forskolin zu 4°C, ermöglichte die Quantifizierung des Einflussflusses von Forskolin auf  $\Delta\Psi_m$  und rückschließend auf die intrinsische Apoptose. Bezeichnet wird dieses Verhältnis (MFI  $\Delta\Psi_m$  Forskolin / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C) als Ratio  $\Delta\Psi_m$  und ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Wie oben angemerkt, liegen für die Konzentration 1  $\mu\text{M}$  Forskolin an Tag 4 Daten zu 6 TK vor, zu den weiteren Zeitpunkten und für die anderen Behandlung liegen Daten zu 7 TK vor. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  nimmt für 4°C zu allen Zeitpunkten der Messung den Wert 1 (MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C) an (Abbildung 13). Einen Tag nach Inkubation der TK waren keine statistisch signifikanten Differenzen zu verzeichnen (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 1: 4°C vs. 0,75  $\mu\text{M}$  Forskolin, 1,00 vs.  $1,00 \pm 0,03$ ,  $t(6)=0,11$ ,  $p=0,9169$ ; 4°C vs. 1  $\mu\text{M}$  Forskolin, 1,00 vs.  $1,00 \pm 0,03$ ,  $t(6)=0,14$ ,  $p=0,8902$ ). An Tag 4 war auch der Ratio  $\Delta\Psi_m$  zu 1  $\mu\text{M}$  Forskolin nicht signifikant abweichend (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. 1  $\mu\text{M}$  Forskolin:



1,00 vs.  $1,09 \pm 0,05$ ,  $t(5) = 1,76$ ,  $p = 0,1394$ ). Am gleichen Messtag war eine statistisch signifikante Abweichung für  $0,75 \mu\text{M}$  vorzufinden (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $4^\circ\text{C}$  vs.  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin:  $1,00$  vs.  $1,15 \pm 0,05$ ,  $t(6) = 2,74$ ,  $p = 0,0338$ ). Der  $\Delta\Psi_m$  war 1,15-fach höher durch die Behandlung mit  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin im Vergleich mit  $1 \mu\text{M}$  Forskolin. An Tag 7 war der Ratio  $\Delta\Psi_m$  für Forskolin  $0,75 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  statistisch hochsignifikant im Vergleich mit unbehandelten TK (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $4^\circ\text{C}$  vs. Forskolin  $0,75 \mu\text{M}$ ,  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,19 \pm 0,05$  statistisch hochsignifikant  $t(6) = 3,76$ ,  $p = 0,0094$ ,  $4^\circ\text{C}$  vs. Forskolin  $1 \mu\text{M}$   $1,00 \pm 0,00$  vs.  $1,24 \pm 0,09$ ,  $t(6) = 2,66$ ,  $p = 0,0375$ ). Der MFI,  $\Delta\Psi_m$ , war bei einer Konzentration von  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin nach 10 Tagen 1,32-fach, respektive 32%, höher als bei unbehandelten TK. Diese Differenz ist statistisch hochsignifikant (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 10,  $4^\circ\text{C}$  vs.  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin:  $1,00$  vs.  $1,32 \pm 0,08$ ,  $t(6) = 4,08$ ,  $p = 0,0065$ ). Durch die Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Forskolin wurde eine 1,34-fache, statistisch hochsignifikante Abweichung am Ende des Messzeitraums (Tag 10) erreicht (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $4^\circ\text{C}$  vs.  $1 \mu\text{M}$  Forskolin:  $1,00$  vs.  $1,34 \pm 0,05$ ,  $t(6) = 6,83$ ,  $p = 0,0005$ ). Damit wiesen die mit  $1 \mu\text{M}$  Forskolin behandelten TK nach 10 Tagen die größere Differenz und die höhere statistische Signifikanz auf.

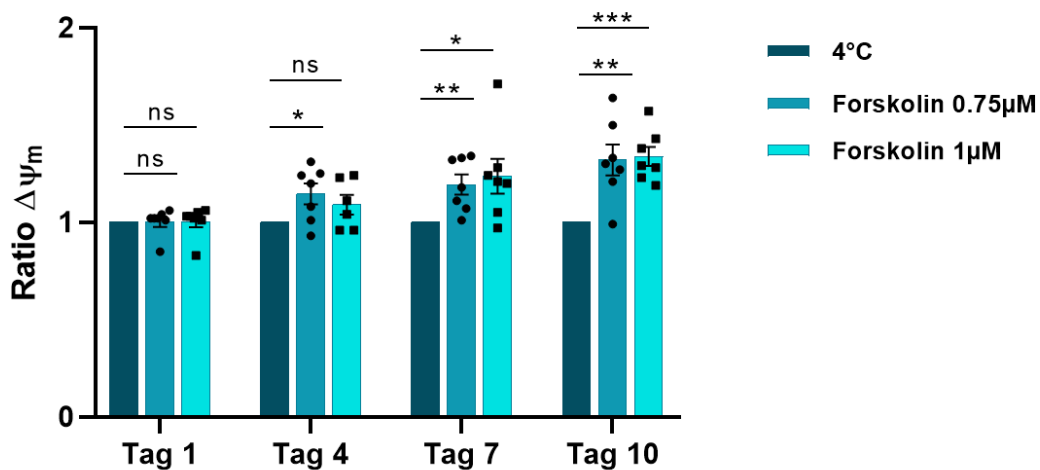


Abbildung 14: **Forskolin: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  stellt die relative Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des  $\Delta\Psi_m$  von Thrombozyten bei Behandlung mit Forskolin (0,75 und 1  $\mu\text{M}$ ) dar (MFI  $\Delta\Psi_m$  Forskolin / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C (unbehandelt)). Vergleich von Forskolin (0,75 und 1  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C). Die 4°C Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$  (Ausnahme:  $n=6$  für Forskolin 1  $\mu\text{M}$  an Tag 4), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  ns: nicht signifikant.

### 3.2.3 Einfluss von Forskolin auf die Zellviabilität

Die Verwendung von Calcein, als Marker lebensfähiger Zellen, sollte zu einer erhöhten Validität der Arbeit und ihrer Ergebnisse beitragen. **Abbildung 15: Forskolin: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 4°C Lagerung. Vergleich von Forskolin gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ . Wie in Kapitel 3.1.3 erläutert, wurde über die signifikante Abnahme Calcein-positiver Thrombozyten im zeitlichen Verlauf, anhand der unbehandelten 4°C Kontrolle (4°C), das Vorhandensein eines apoptotischen Effektes verifiziert (Abbildung 12). Im Folgenden wurden die Konzentrationen

0,75 und 1  $\mu\text{M}$  des Apoptoseinhibitors Forskolin gegen 4°C ausgewertet, nachdem ein signifikanter anti-apoptotischer Einfluss des Lösungsmittels DMSO ausgeschlossen werden konnte, wie für G04 (Kapitel 3.1.3). Sowohl an Tag 7, als auch Tag 10, wurde ein signifikanter Anteil Calcein-positiver Zellen durch Forskolin in 0,75  $\mu\text{M}$  gefunden, als bei 4°C ohne Inhibitor. An Tag 7 waren 87%, an Tag 10 51%, der Thrombozyten Calcein-positiv. Die Differenz zu 4°C war an beiden Messtagen statistisch hochsignifikant (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler 4°C vs. 0,75  $\mu\text{M}$  Forskolin Tag 7:  $78,13 \pm 4,74$  vs.  $87,08 \pm 3,28$ ,  $t(6) = 4,27$ ,  $p = 0,0053$ ; Tag 10:  $40,20 \pm 5,47$  vs.  $51,09 \pm 6,09$ ,  $t(6) = 4,23$ ,  $p = 0,0055$ ). Auch für 1  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde an Tag 7 und 10 ein höherer Anteil Calcein-positiver Zellen mit statistischer Signifikanz gemessen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler 4°C vs. 1  $\mu\text{M}$  Forskolin Tag 7:  $78,13 \pm 4,74$  vs.  $87,22 \pm 2,00$ ,  $t(6) = 2,80$ ,  $p = 0,0310$ ; Tag 10:  $40,20 \pm 5,47$  vs.  $49,08 \pm 4,45$ ,  $t(6) = 2,61$ ,  $p = 0,0403$ ). Beide Konzentrationen des Inhibitors konnten mit statistischer Signifikanz die Abnahme des Prozentsatzes lebensfähiger Zellen bei kühlgelagerten (4°C) Thrombozyten reduzieren.

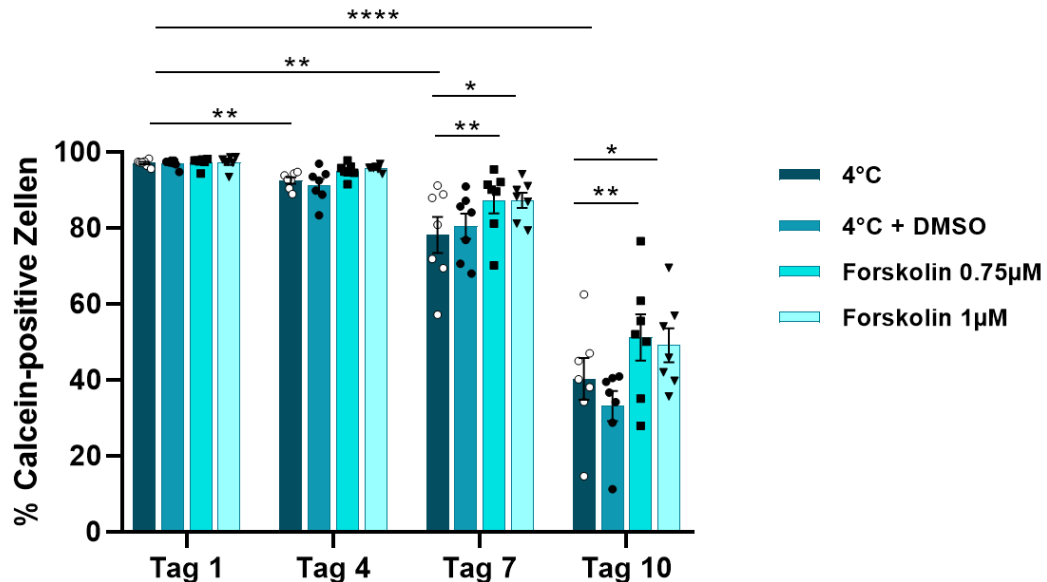


Abbildung 15: **Forskolin: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit Forskolin in den Konzentrationen 0,75  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 4°C Lagerung. Vergleich von Forskolin gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3 Z-LEHD-FMK

#### 3.3.1 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf die Externalisierung von Phosphatidylserin

Zum Nachweis von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der untersuchten Thrombozyten, wurde Annexin verwendet (Abbildung 16). In den Folgenden Kapiteln ist die Auswertung der Messdaten des Caspase 9 Inhibitors Z-LEHD-FMK erläutert, welcher in DMSO gelöst wurde. In Kapitel 3.1.1 wurde der apoptotische Effekt anhand des Vergleichs des Prozentsatzes der unbehandelten 4°C Kontrolle (4°C) von Tag 1 zu den Tagen 4, 7 und 10 dargelegt. Entnommen werden kann die statistische Signifikanz zudem der Abbildung 16. Die Differenz von 4°C zur Vehikelkontrolle (4°C + DMSO) wurde statistisch für alle Messtage untersucht, zu allen Zeitpunkten jedoch keine statistische Signifikanz gefunden (Abbildung 16). Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Daten von Z-LEHD-FMK, denen der 4°C-Kontrolle gegenübergestellt. Während an Tag 7 10% der Thrombozyten mit Z-LEHD-FMK Annexin-positiv waren, waren es an Tag 10 39%. Der Unterschied war an Tag 7 statistisch

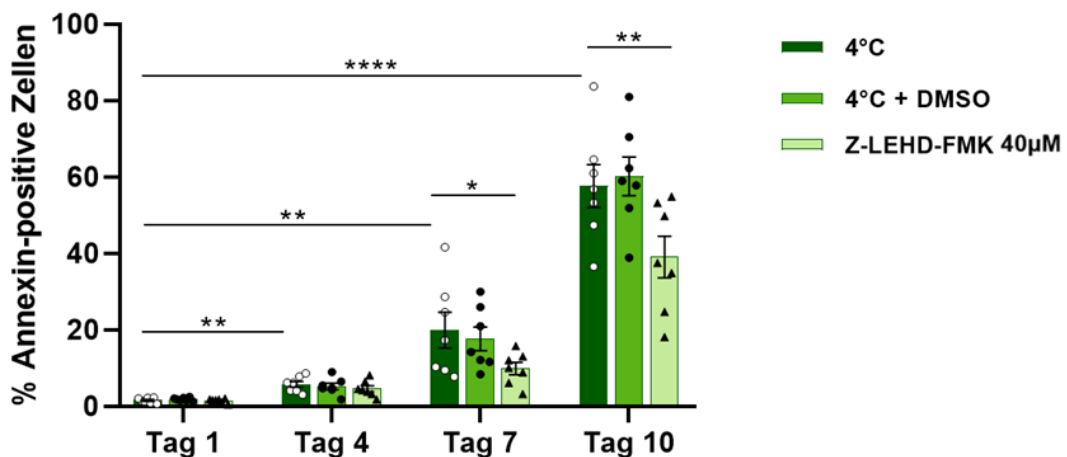


Abbildung 16: Z-LEHD-FMK: Anteil Annexin-positiver Thrombozyten in Prozent (%) bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40 µM bei 4°C Lagerung. Vergleich von Z-LEHD-FMK gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit n= 7, dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001.

signifikant, an Tag 10 hochsignifikant, geringer als ohne Inhibitor (% Annexin-positive Zellen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. Z-LEHD-FMK Tag 7:  $19,94 \pm 4,69$  vs.  $9,85 \pm 1,61$ ,  $t(6) = 3,05$ ,  $p = 0,0225$ ; Tag 10:  $57,60 \pm 5,58$  vs.  $39,00 \pm 5,41$ ,  $t(6) = 4,49$ ,  $p = 0,0042$ ). Für Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu\text{M}$  ist demnach eine signifikante Apoptoseinhibition kühlgelagerter Thrombozyten, für einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen, anzunehmen.

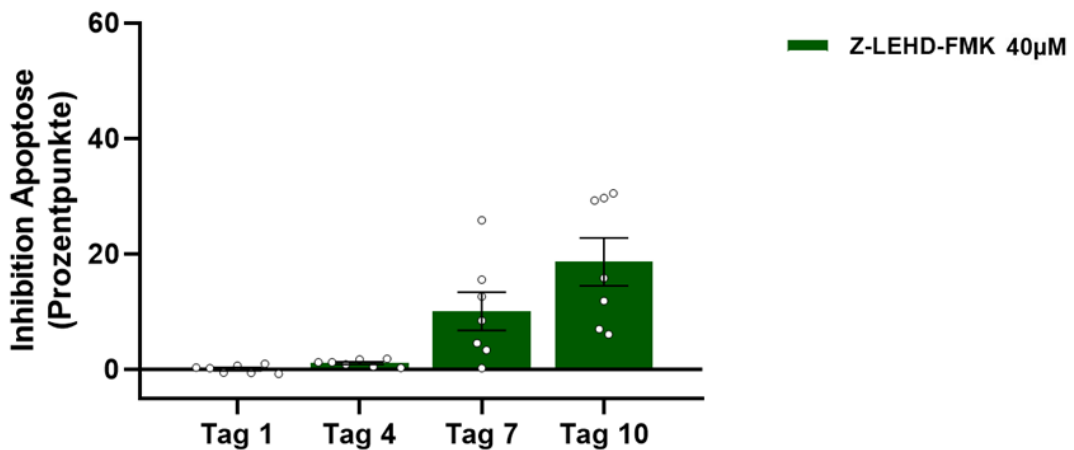


Abbildung 17: **Z-LEHD-FMK: Inhibition Apoptose in Prozentpunkten** bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Inhibition Apoptose ist definiert als Differenz: % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt) - % Annexin-positiver Thrombozyten Z-LEHD-FMK (40  $\mu\text{M}$ ). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Die Differenz zwischen 4°C und Z-LEHD-FMK (% Annexin-positiver Zellen 4°C - % Annexin-positiver Zellen Z-LEHD-FMK) ist in Prozentpunkten angegeben und in Abbildung 17 dargestellt. Diese Differenz wird als Inhibition der Apoptose interpretiert. Die Diskrepanz nimmt im Laufe des Messzeitraums zu, sie ist an Tag 10 mit etwa 19 Prozentpunkten am größten, gefolgt von 10 Prozentpunkten an Tag 7 (Prozentpunkten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 1:  $0,06 \pm 0,26$ ; Tag 4:  $1,11 \pm 0,22$ ; Tag 7:  $10,09 \pm 3,31$ , Tag 10:  $18,60 \pm 4,15$ ). Die Auswirkung des Caspase 9 Inhibitors auf die Apoptose scheint insbesondere an den Tagen 7 und 10 messbar und somit quantifizierbar zu sein.

Die relative Änderung des Anteils Annexin-positiver, apoptotischer Thrombozyten wird durch den Fold Decrease erfasst. Es handelt sich hierbei um das Verhältnis des Prozentsatzes Annexin-positiver Zellen bei 4°C ohne Inhibitor

zu jenem Prozentsatz bei 4°C mit 40 µM Z-LEHD-FMK (% Annexin-positiver Zellen Z-LEHD-FMK/ % Annexin-positiver Zellen 4°C). Der Abbildung 18 zu entnehmen, wurde der Wert für 4°C mit 1 gleichgesetzt (% Annexin-positiver Zellen 4°C / % Annexin-positiver Zellen 4°C) und gegen den Quotienten von Z-LEHD-FMK statistisch ausgewertet. Zu Beginn waren noch keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen (Fold Decrease Apoptose, Mittelwert ± Standardfehler, Tag 1, 4°C vs. Z-LEHD-FMK: 1,00 vs. 1,05 ± 0,18,  $t(6) = 0,28$ ,  $p = 0,7921$ ). Hingegen war die relative Änderung zu allen anderen Messzeitpunkten statistisch hochsignifikant. Der Fold Decrease war an Tag 4 22%, an Tag 7 45% sowie an Tag 10 37% geringer für Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40 µM. Entsprechend war an Tag 4 der 0,78-fache, an Tag 7 der 0,55-fache und Tag 10 der 0,67-fache Anteil Annexin-positiver Thrombozyten bei den Messungen vorzufinden, sofern die TK mit 40 µM Z-LEHD-FMK inkubiert wurden (Fold decrease, Mittelwert ± Standardfehler, 4°C vs. 40 µM Z-LEHD-FMK Tag 4: 1,00 vs. 0,78 ± 0,05,  $t(6) = 4,38$ ,  $p = 0,0047$ ; Tag 7: 1,00 vs. 0,55 ± 0,08,  $t(6) = 5,74$ ,  $p = 0,0012$ ; Tag 10: 1,00 vs. 0,67 ± 0,07,  $t(6) = 4,72$ ,  $p = 0,0032$ ). Schlussfolgernd

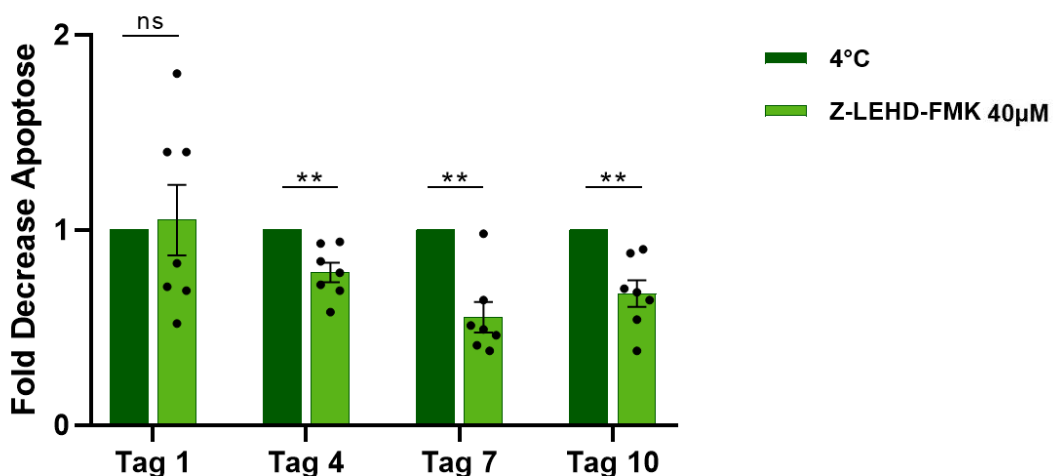


Abbildung 18: **Z-LEHD-FMK: Fold Decrease Apoptose** bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40 µM bei 4°C-Lagerung. Der Fold Decrease stellt die relative Änderung des prozentualen Anteils Annexin-positiver Thrombozyten bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK (40 µM) dar (% Annexin-positiver Thrombozyten Z-LEHD-FMK / % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt)). Vergleich von Z-LEHD-FMK (40 µM) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C). Die 4°C Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (% Annexin-positiver Thrombozyten 4°C / % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. \*\*  $p < 0,01$ ; ns: nicht signifikant.

kann eine statistisch hochsignifikante Abnahme apoptotischer Thrombozyten, respektive eine anti-apoptotische Wirkung, durch Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK bei 4°C angenommen werden. Diese Änderung erreichte ihr gemessenes Maximum, in Relation zur unbehandelten 4°C Probe, mit 45% an Tag 7.

### 3.3.2 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf das mitochondriale Membranpotenzial

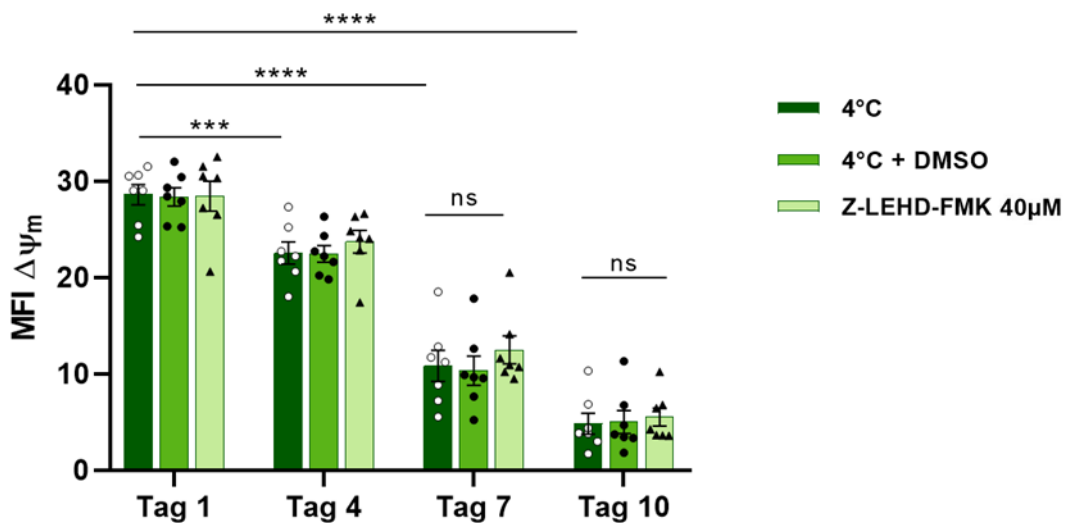


Abbildung 19: **Z-LEHD-FMK: MFI des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu\text{M}$  bei 4°C-Lagerung. Vergleich von Z-LEHD-FMK (40  $\mu\text{M}$ ) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns: nicht signifikant.

Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ), wurden durch Färbung mit Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) erfasst (Kapitel 3.1.2). Die Angabe der Stärke TMRE-Signals erfolgt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und wird als MFI  $\Delta\Psi_m$  bezeichnet (Abbildung 19). Vorliegend sind Daten zu 7 TK, welche statistisch gepaart ausgewertet wurden. Es fanden Messungen zu 4 Zeitpunkten (Tag 1, 4, 7 und 10) statt. Der MFI  $\Delta\Psi_m$  der 4°C Probe ohne Behandlung (abgekürzt 4°C) an Tag 1 wurde gegen die Tage 4, 7 und 10 ausgewertet (Abbildung 20). Diese Auswertung ergab eine statistisch signifikante Abnahme des  $\Delta\Psi_m$  (MFI), respektive apoptotischen Effekt, im zeitlichen Verlauf. Die gleichen Analysen wurden für die anderen Inhibitoren G04 und Forskolin ausgeführt und beziehungsweise in Kapiteln 3.1 und 3.2 präsentiert. Des

Weiteren konnte eine relevante Wirkung auf die Inhibition der Apoptose durch das Lösungsmittel DMSO ausgeschlossen werden, ähnlich wie die anderen Inhibitoren. Der  $\Delta\Psi_m$  von Z-LEHD-FMK wurde, entsprechend diesen Ergebnissen, mit 4°C verglichen. Gegenüber 4°C war weder an Tag 7, noch an Tag 10, eine statistische Signifikanz vorzufinden (MFI  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. 40  $\mu$ M Z-LEHD-FMK Tag 7: 10,83  $\pm$  1,61 vs. 12,50  $\pm$  1,45,  **$t(6)= 1,19$ ,  $p= 0,2777$** ; Tag 10: 4,84  $\pm$  1,08 vs. 5,50  $\pm$  0,94,  **$t(6)= 1,69$ ,  $p= 0,1415$** ). Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu$ M scheint keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die mitochondrialen Veränderungen der intrinsischen Apoptose kühlgelagerter Thrombozyten auszuüben.

Im nächsten Schritt wurde die relative Änderung des MFI  $\Delta\Psi_m$  bestimmt, welche als Ratio  $\Delta\Psi_m$  bezeichnet wird. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  errechnet sich aus dem Verhältnis des MFI  $\Delta\Psi_m$  von Z-LEHD-FMK zu 4°C (MFI  $\Delta\Psi_m$  Z-LEHD-FMK / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C) und ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  für 4°C ohne Inhibitor wurde mit 1 gleichgesetzt (MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C) und gegen den Ratio  $\Delta\Psi_m$  von 40  $\mu$ M Z-LEHD-FMK ausgewertet. Dabei konnte, an allen Messtagen, keine statistische Signifikanz festgestellt werden, was in Abbildung 19 graphisch dargestellt ist (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, 4°C vs. 40  $\mu$ M Z-LEHD-FMK Tag 1: 1,00 vs. 0,99  $\pm$  0,03,  **$t(6)= 0,32$ ,  $p= 0,7609$** ; Tag 4: 1,00 vs. 1,06  $\pm$  0,03,  **$t(6)= 2,22$ ,  $p= 0,0687$** ; Tag 7: 1,00 vs. 1,28  $\pm$  0,22,  **$t(6)= 1,27$ ,  $p= 0,2519$** ; Tag 10: 1,00 vs. 1,27  $\pm$  0,16,  **$t(6)= 1,63$ ,  $p= 0,1534$** ). Damit war der Mittelwert des MFI  $\Delta\Psi_m$  an Tag 10 durch Behandlung mit 40  $\mu$ M Z-LEHD-FMK um das 1,27-fache, respektive 27%, erhöht. Eine signifikante Inhibition auf die mitochondrialen Apoptoseprozesse bei



kühlgelagerten Thrombozyten konnte durch den Caspase 9 Inhibitor Z-LEHD-FMK in der untersuchten Konzentration nicht gefunden werden.

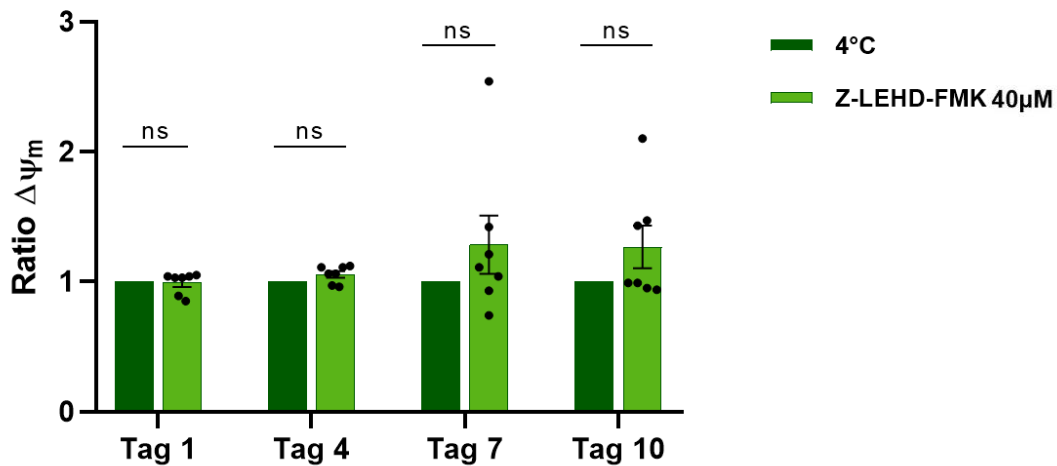


Abbildung 20: **-LEHD-FMK: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu$ M bei 4°C-Lagerung. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  stellt die relative Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des  $\Delta\Psi_m$  von Thrombozyten bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK (40  $\mu$ M) dar (MFI  $\Delta\Psi_m$  Z-LEHD-FMK / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C (unbehandelt)). Vergleich von Z-LEHD-FMK (40  $\mu$ M) gegen die unbehandelte Kontrolle (4°C). Die 4°C Kontrolle wird mit dem Wert 1 gleichgesetzt (MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit n= 7, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. ns: nicht signifikant.

### 3.3.3 Einfluss von Z-LEHD-FMK auf die Zellviabilität

Calcein wurde als Marker lebensfähiger Zellen eingesetzt, dies soll zur Erhöhung der Validität beitragen. Die Daten der 7 TK, an den 4 Messzeitpunkten (Abbildung 21) sind in Prozent (%) Calcein-positiver Zellen, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte gepaart. Über den Vergleich der unbehandelten Probe (abgekürzt 4°C) an Tag 1 mit den Daten der folgenden Messtage, konnte ein zeitlich bedingter, apoptotischer Effekt bestätigt werden. Weiterhin wurde ein signifikanter, die Apoptose inhibierender Effekt, des Lösungsmittels DMSO ausgeschlossen, wie bei G04 und Forskolin, sodass fortan Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu$ M mit 4°C verglichen wurde. An Tag 7 war der Anteil Calcein-positiver Zellen bei Z-LEHD-FMK mit 89% signifikant höher als bei 4°C ohne Inhibitor, wo noch 78% der Thrombozyten Calcein-positiv waren (% Calcein-positiver Zellen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,

Tag 7 4°C vs. 40 µM Z-LEHD-FMK:  $78,13 \pm 4,74$  vs.  $88,53 \pm 1,78$ ,  $t(6)= 3,20$ ,  $p= 0,0186$ ). Am Ende des Messzeitraums, an Tag 10, waren noch 53% der Zellen Calcein-positiv bei Behandlung des TK mit Z-LEHD-FMK. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen statistisch signifikant höheren Prozentsatz als bei 4°C (% Calcein-positiver Zellen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 10 4°C vs. 40 µM Z-LEHD-FMK:  $40,20 \pm 5,47$  vs.  $52,98 \pm 6,35$ ,  $t(6)= 2,77$ ,  $p= 0,0326$ ). Durch den Einfluss des Caspase 9 Inhibitors Z-LEHD-FMK konnten signifikant mehr lebensfähige Zellen erhalten werden, wodurch auf einen anti-apoptotischen Effekt des Inhibitors, in der Konzentration 40 µM, geschlossen werden kann.

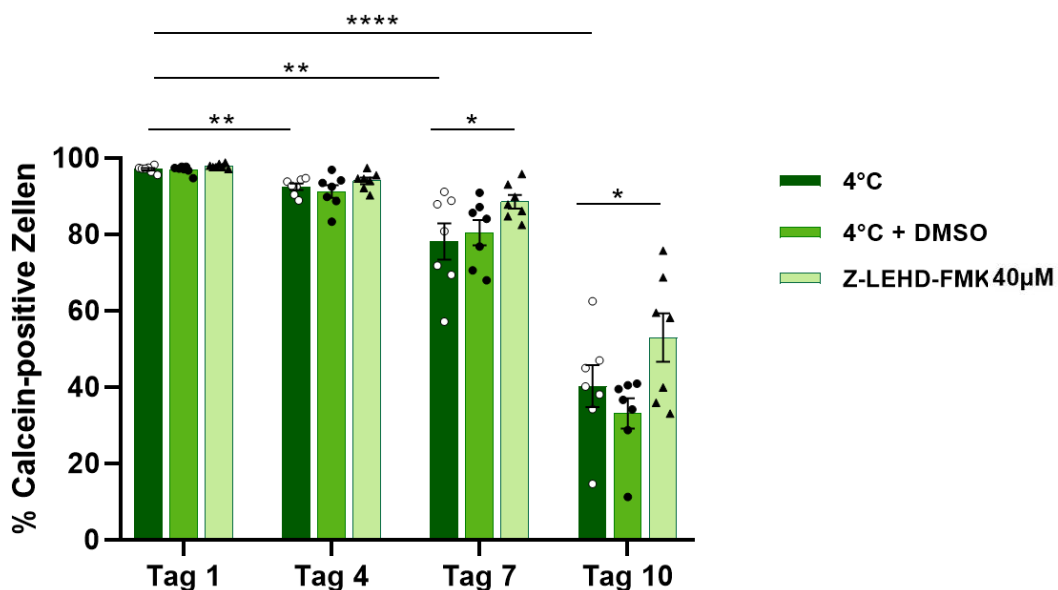


Abbildung 21: **Z-LEHD-FMK: Anteil Calcein-positiver Thrombozyten in Prozent (%)** bei Behandlung mit Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40 µM bei 4°C Lagerung. Vergleich von Z-LEHD-FMK gegen eine unbehandelte Kontrolle (4°C), nach Ausschluss einer signifikanten anti-apoptotischen Wirkung der Vehikelkontrolle (4°C + DMSO). Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation des TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n= 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

### 3.4 Vergleich der Inhibitoren

#### 3.4.1 % Inhibition Apoptose

Nachdem die 3 untersuchten Apoptoseinhibitoren getrennt voneinander ausgewertet wurden (Kapitel 3.1 bis 3.3), erfolgte der direkte Vergleich in der als beste angenommenen Konzentration. Für die als Inhibition der Apoptose

definierte Differenz des Prozentsatzes Annexin-positiver Thrombozyten bei 4°C ohne Behandlung, abzüglich des Prozentsatzes bei Behandlung mit entsprechendem Inhibitor, wurden folgende Konzentrationen gegenübergestellt: G04 150 µM, Forskolin 0,75 µM und Z-LEHD-FMK 40 µM. Diese Gegenüberstellung kann Abbildung 22 entnommen werden. Es liegen Daten zu 7 TK vor, welche statistisch gepaart ausgewertet wurden und als Mittelwert ± Standardfehler in Prozentpunkten angegeben sind. Weder nach einem, noch nach 4 Tagen konnten hierbei statistisch signifikante Differenzen zwischen G04, Forskolin und Z-LEHD-FMK festgestellt werden (Tag 1 G04 vs. Forskolin:  $-0,50 \pm 0,32$  vs.  $-0,24 \pm 0,67$ ,  **$t(6) = 0,39$ ,  $p = 0,7135$** ; Tag 4:  $0,91 \pm 0,98$  vs.  $1,94 \pm 0,59$ ,  **$t(6) = 1,42$ ,  $p = 0,2064$** ; Tag 1 G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $-0,50 \pm 0,32$  vs.  $0,06 \pm 0,26$ ,  **$t(6) = 2,21$ ,  $p = 0,0692$** ; Tag 4:  $0,91 \pm 0,98$  vs.  $1,11 \pm 0,22$ ,  **$t(6) = 0,19$ ,  $p = 0,8522$** ; Tag 1 Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $-0,24 \pm 0,67$  vs.  $0,06 \pm 0,26$ ,  **$t(6) = 0,55$ ,  $p = 0,6030$** ; Tag 4:  $1,94 \pm 0,59$  vs.  $1,11 \pm 0,22$ ,  **$t(6) = 1,41$ ,  $p = 0,2084$** ). An Tag 7 ist bereits optisch (Abbildung 22) eine eindeutige Zunahme der Apoptoseinhibition erkennbar. Hier ist sie für Forskolin in 0,75 µM mit 13 Prozentpunkten am höchsten, die Differenz zu Z-LEHD-FMK statistisch signifikant, während sie zwischen G04 und den anderen Inhibitoren nicht signifikant war (Inhibition Apoptose, Mittelwert ± Standardfehler, Tag 7 G04 vs. Forskolin:  $10,55 \pm 4,29$  vs.  $13,39 \pm 3,92$ ,  **$t(6) = 1,40$ ,  $p = 0,2118$** ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $10,55 \pm 4,29$  vs.  $10,09 \pm 3,31$ ,  **$t(6) = 0,34$ ,  $p = 0,7477$** ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $13,39 \pm 3,92$  vs.  $10,09 \pm 3,31$ ,  **$t(6) = 2,50$ ,  $p = 0,0468$** ). Nach 10 Tagen war die ermittelte Inhibition der Apoptose für G04 am stärksten (Inhibition Apoptose, Mittelwert ± Standardfehler,  $24,61 \pm 2,88$ ), gefolgt von Z-LEHD-FMK (Inhibition Apoptose, Mittelwert ± Standardfehler,  $18,60 \pm 4,15$ ) und Forskolin (Inhibition Apoptose, Mittelwert ± Standardfehler,  $16,00 \pm 2,93$ ), wies jedoch in allen Gegenüberstellungen keine statistische Signifikanz auf, obwohl eine allgemein höhere Inhibition durch G04 beobachtet werden konnte (Tag 10 G04 vs. Forskolin:  **$t(6) = 2,00$ ,  $p = 0,0923$** ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  **$t(6) = 1,03$ ,  $p = 0,3431$** ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  **$t(6) = 0,75$ ,  $p = 0,4812$** ). Insgesamt fällt auf, dass durch alle 3 Reagenzien eine Inhibition der Apoptose, respektive Reduktion apoptotischer Thrombozyten, erreicht werden konnte. Für alle Inhibitoren nimmt

die Differenz Annexin-positiver, apoptotischer Zellen zur unbehandelten Kontrolle, nimmt von einem Messtag zu nächsten zu, erreicht ihr gemessenes Maximum nach 10 Tagen. Bei dieser Analyse wurde, mit etwa 25 Prozentpunkten, G04 in der Konzentration 150  $\mu\text{M}$  als effektivste Behandlung der Thrombozyten in Bezug auf einen anti-apoptotischen Effekt bei Kühlung identifiziert. Gleichzeitig wurde keine statistische Signifikanz zu den anderen Inhibitoren am Ende des Messzeitraums erreicht.

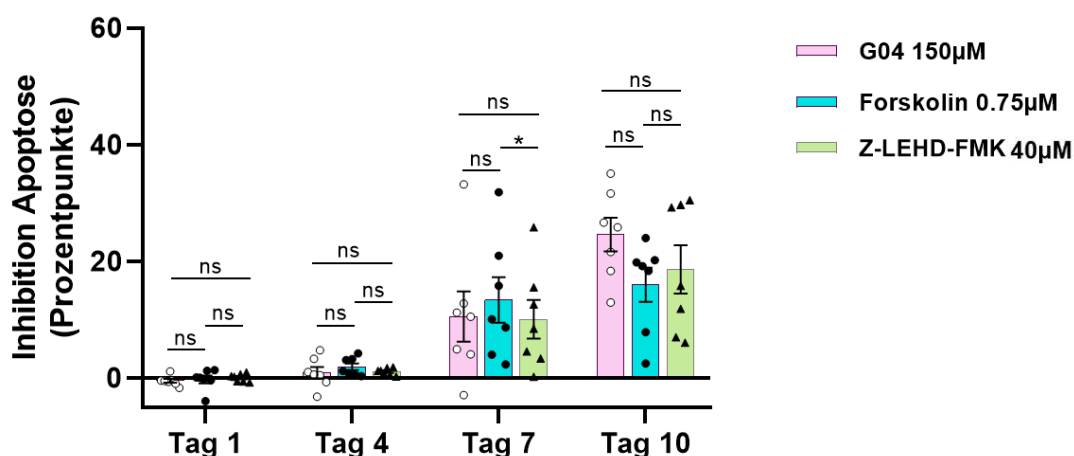


Abbildung 22: **Vergleich der Inhibitoren: Inhibition Apoptose in Prozentprozentpunkten** bei Behandlung mit G04, Forskolin oder Z-LEHD-FMK bei 4°C-Lagerung. Inhibition Apoptose ist definiert als Differenz: % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt) - % Annexin-positiver Thrombozyten Inhibitor (G04/ Forskolin/ Z-LEHD-FMK). Vergleich der effektivsten gemessenen Konzentrationen: 150  $\mu\text{M}$  G04, 0,75  $\mu\text{M}$  Forskolin, 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK. Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n=7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant.

### 3.4.2 Fold Decrease Apoptose

Weiterhin wurde der beschriebene Fold Decrease, als relative Änderung des Anteils Annexin-positiver Thrombozyten zur unbehandelten Kontrolle, verglichen. Dabei wurden die in Abbildung 23 dargestellten Konzentrationen der 3 Inhibitoren gegeneinander analysiert. Die Angabe erfolgt zu 4 Messzeitpunkten für 7 TK als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die statistische Auswertung der 7 TK wurde statistisch gepaart vorgenommen. Ein Fold Decrease  $< 1$  repräsentiert eine

relative Abnahme Annexin-positiver, apoptotischer Zellen durch den entsprechenden Inhibitor im Vergleich zur unbehandelten 4°C Kontrolle.

Sowohl G04 in 150 µM ( $1,49 \pm 0,28$ ), als auch Forskolin in 0,75 µM ( $1,35 \pm 0,47$ ) und Z-LEHD-FMK in 40 µM ( $1,05 \pm 0,18$ ) hatten an Tag 1 einen Fold Decrease  $> 1$ , somit wurde zu diesem Messzeitpunkt ein höherer Prozentsatz Annexin-positiver Zellen in diesen TK gefunden, als ohne Behandlung. Der Vergleich der Inhibitoren gegeneinander ergab keine statistische Signifikanz (Tag 1 G04 vs. Forskolin:  $t(6) = 0,28$ ,  $p = 0,7871$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $t(6) = 2,29$ ,  $p = 0,0622$ ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $t(6) = 0,72$ ,  $p = 0,5004$ ). Fortan, ab Tag 4 bis einschließlich Tag 10, lag der Fold Decrease für alle 3 Inhibitoren unter einem Wert von 1. Statistische Signifikanz zwischen den Inhibitoren konnte dabei zu keinem Messzeitpunkt nachgewiesen werden (G04 vs. Forskolin Tag 4:  $0,89 \pm 0,17$  vs.  $0,67 \pm 0,07$ ,  $t(6) = 1,52$ ,  $p = 0,1797$ ; Tag 7:  $0,56 \pm 0,13$  vs.  $0,38 \pm 0,07$ ,  $t(6) = 1,05$ ,  $p = 0,3345$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK Tag 4:  $0,89 \pm 0,17$  vs.  $0,78 \pm 0,05$ ,

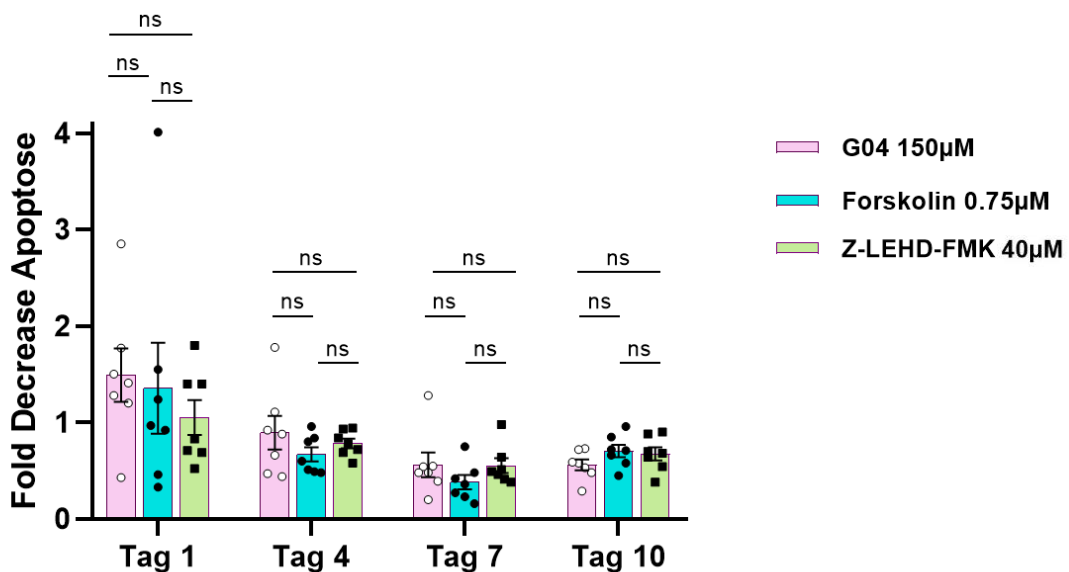


Abbildung 23: **Vergleich der Inhibitoren: Fold Decrease Apoptose** bei Behandlung mit G04, Forskolin oder Z-LEHD-FMK bei 4°C-Lagerung. Der Fold Decrease stellt die relative Änderung des prozentualen Anteils Annexin-positiver Thrombozyten bei Behandlung mit dem Inhibitor dar (% Annexin-positiver Thrombozyten Inhibitor (G04/ Forskolin/ Z-LEHD-FMK) / % Annexin-positiver Thrombozyten 4°C (unbehandelt)). Vergleich der effektivsten gemessenen Konzentrationen: 150 µM G04, 0,75 µM Forskolin, 40 µM Z-LEHD-FMK. Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit  $n = 7$ , dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. ns: nicht signifikant.

**t(6)= 0,61, p= 0,5664**; Tag 7:  $0,56 \pm 0,13$  vs.  $0,55 \pm 0,08$ , **t(6)= 0,11, p= 0,9161**;  
Forskolin vs. Z-LEHD-FMK Tag 4:  $0,67 \pm 0,07$  vs.  $0,78 \pm 0,05$ , **t(6)= 1,56, p=**  
**0,1705**; Tag 7:  $0,38 \pm 0,07$  vs.  $0,55 \pm 0,08$ , **t(6)= 1,48, p= 0,1906**).

Die stärkste relative Änderung wurde durch  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin an Tag 7 erreicht, hier konnte nur der 0,38-fache Anteil Annexin-positiver Zellen nachgewiesen werden. An Tag 10 wurde die größte Änderung durch  $150 \mu\text{M}$  G04 erzielt, es konnte der 0,56-fache Anteil Annexin-positiver Thrombozyten nachgewiesen werden. Durch  $0,75 \mu\text{M}$  Forskolin waren es zum gleichen Zeitpunkt der 0,75-fache, durch  $40 \mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK der 0,67-fache Anteil (Tag 10 G04 vs. Forskolin:  $0,56 \pm 0,06$  vs.  $0,70 \pm 0,06$ , **t(6)= 1,93, p= 0,1015**; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $0,56 \pm 0,06$  vs.  $0,67 \pm 0,07$ , **t(6)= 1,02, p= 0,3483**; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $0,70 \pm 0,06$  vs.  $0,67 \pm 0,07$ , **t(6)= 0,44, p= 0,6777**). Basierend auf den Ergebnissen kann für alle 3 Reagenzien eine Apoptoseinhibition kühlgelagerter Thrombozyten, in unterschiedlichem Ausmaß, angenommen werden. Die stärkste gemessene Reduktion, um 62%, wurde durch Forskolin an Tag 7 erreicht. Nach 10 Tagen konnte noch eine maximale Reduktion apoptotischer Thrombozyten um 44% erreicht werden, durch Inkubation des TK mit  $150 \mu\text{M}$  G04 bei Kühlung (4°C).

### 3.4.3 Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials

Als letzter Schritt wurde für die 3 Inhibitoren die relative Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials TMRE-Signals, als Ratio  $\Delta\Psi_m$  bezeichnet, untersucht. Es können dadurch Änderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) erfasst und verglichen werden. Es wurden folgende Inhibitoren gegeneinander ausgewertet: G04 150  $\mu\text{M}$ , Forskolin 1  $\mu\text{M}$  und Z-LEHD-FMK 40  $\mu\text{M}$ . Die Angabe erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet. Es liegen zu Forskolin 1  $\mu\text{M}$  an Tag 4 Daten zu 6 TK vor, sodass, aufgrund der gepaarten Auswertung, bei dem Vergleich zwischen Forskolin und G04 sowie Forskolin und Z-LEHD-FMK jeweils nur die entsprechend 6 TK gegeneinander analysiert wurden. Zu allen anderen Zeitpunkten liegen für alle Proben die Daten zu 7 TK vor. An Tag 1 war der Ratio  $\Delta\Psi_m$  für alle 3 Inhibitoren nahezu 1, die Differenzen zur unbehandelten 4°C Probe demnach gering und auch zwischen den Inhibitoren konnte keine

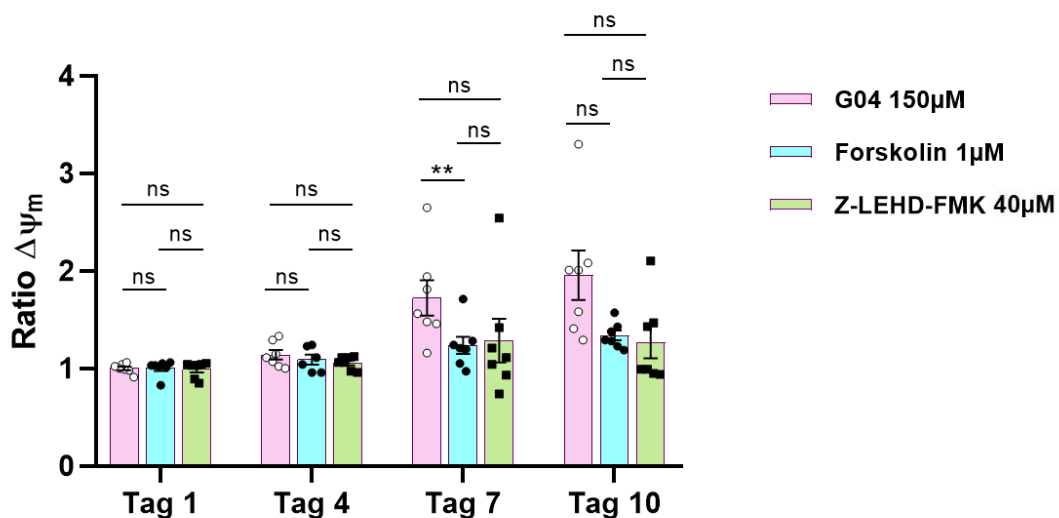


Abbildung 24: **Vergleich der Inhibitoren: Ratio des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ )** bei Behandlung mit G04, Forskolin oder Z-LEHD-FMK bei 4°C-Lagerung. Der Ratio  $\Delta\Psi_m$  stellt die relative Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des  $\Delta\Psi_m$  von Thrombozyten bei Behandlung mit dem Inhibitor (G04/ Forskolin/ Z-LEHD-FMK) dar (MFI  $\Delta\Psi_m$  Inhibitor (G04/ Forskolin/ Z-LEHD-FMK) / MFI  $\Delta\Psi_m$  4°C (unbehandelt)). Vergleich der effektivsten gemessenen Konzentrationen: 150  $\mu\text{M}$  G04, 1  $\mu\text{M}$  Forskolin, 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK. Angabe der Messzeitpunkte als Tag nach Gewinnung und Inkubation der TK. Die Daten wurden statistisch gepaart ausgewertet mit n= 7 (Ausnahme: n= 6 für Forskolin 1  $\mu\text{M}$  an Tag 4), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. ns: nicht signifikant.

statistische Signifikanz festgestellt werden (Tag 1 G04 vs. Forskolin:  $1,00 \pm 0,02$  vs.  $1,00 \pm 0,03$ ,  $t(6) = 0,12$ ,  $p = 0,9107$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $1,00 \pm 0,02$  vs.  $0,99 \pm 0,03$ ,  $t(6) = 0,45$ ,  $p = 0,6675$ ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $1,00 \pm 0,03$  vs.  $0,99 \pm 0,03$ ,  $t(6) = 0,42$ ,  $p = 0,6878$ ). Wie an Tag 1, wurden auch an Tag 4 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Inhibitoren nachgewiesen (Tag 4 G04 vs. Forskolin:  $1,14 \pm 0,05$  vs.  $1,09 \pm 0,05$ ,  $t(5) = 0,76$ ,  $p = 0,4834$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $1,14 \pm 0,05$  vs.  $1,06 \pm 0,03$ ,  $t(6) = 2,33$ ,  $p = 0,0590$ ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $1,09 \pm 0,05$  vs.  $1,06 \pm 0,03$ ,  $t(5) = 1,65$ ,  $p = 0,1602$ ). Der höchste Ratio  $\Delta\Psi_m$  an Tag 7 war bei G04 in  $150 \mu\text{M}$  nachweisbar, mit einem 1,72-fach höheren MFI  $\Delta\Psi_m$  als bei  $4^\circ\text{C}$  ohne Inhibitor. Die Differenz des Ratio  $\Delta\Psi_m$  zu Forskolin war hochsignifikant, während zu Z-LEHD-FMK keine Signifikanz festgestellt wurde (Ratio  $\Delta\Psi_m$ , Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Tag 7 G04 vs. Forskolin:  $1,72 \pm 0,18$  vs.  $1,24 \pm 0,09$ ,  $t(6) = 4,26$ ,  $p = 0,0053$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $1,72 \pm 0,18$  vs.  $1,28 \pm 0,22$ ,  $t(6) = 1,46$ ,  $p = 0,1943$ ). Auch war die Differenz zwischen Forskolin und Z-LEHD-FMK nicht signifikant (Tag 7 Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $1,24 \pm 0,09$  vs.  $1,28 \pm 0,22$ ,  $t(6) = 0,18$ ,  $p = 0,8630$ ). Auch an Tag 10 wurde durch G04 in  $150 \mu\text{M}$  der höchste Ratio  $\Delta\Psi_m$  erreicht, mit einer 1,95-fachen, respektive 95%, Erhöhung des MFI  $\Delta\Psi_m$ . Es wurden jedoch keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Inhibitoren erreicht (Tag 10 G04 vs. Forskolin:  $1,95 \pm 0,25$  vs.  $1,34 \pm 0,05$ ,  $t(6) = 2,19$ ,  $p = 0,0713$ ; G04 vs. Z-LEHD-FMK:  $1,95 \pm 0,25$  vs.  $1,27 \pm 0,16$ ,  $t(6) = 1,89$ ,  $p = 0,1083$ ; Forskolin vs. Z-LEHD-FMK:  $1,34 \pm 0,05$  vs.  $1,27 \pm 0,16$ ,  $t(6) = 0,46$ ,  $p = 0,6618$ ). Alle 3 Inhibitoren wiesen eine Zunahme des Ratio  $\Delta\Psi_m$  im zeitlichen Verlauf auf. An den Tagen 4, 7 und 10 wurde der höchste gemessene Ratio  $\Delta\Psi_m$  durch Inkubation mit  $150 \mu\text{M}$  G04 erreicht, mit einer maximalen Erhöhung um 95% durch diese Behandlung. Statistische Signifikanz wurde einzig an Tag 7 gegenüber Forskolin  $1 \mu\text{M}$  gefunden.



## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente, konnten einen Zusammenhang zwischen dem Einsatz der getesteten Substanzen G04, Forskolin, Z-LEHD-FMK und einer Inhibition der Apoptose kühlgelagerter Thrombozyten darstellen.

### 4.1 G04

Für beide, im Rahmen dieser Arbeit, gemessenen Konzentrationen des RhoA-Inhibitors G04 (Rhosin), kann ein statistisch signifikanter, respektive hochsignifikanter anti-apoptotischer Effekt auf Thrombozyten angenommen werden. Dieser Effekt zeigte sich bei einer Lagerungstemperatur von 4°C, unter dem etablierten Studiendesign, entsprechend des gemessenen Zeitraums von 10 Tagen.

Die Ergebnisse der Färbungen mit Annexin legen nahe, dass eine verminderte Phosphatidylserin-Externalisierung, mit statistischer Signifikanz, durch Behandlung der kühlgelagerten Thrombozyten mit G04 erreicht werden kann. Dieser Effekt wurde an Tag 7 signifikant für die Konzentrationen 75 µM, respektive 150 µM, gemessen und erreichte sequenziell die statistisch aussagekräftigste Differenz zur Kontrollprobe an Tag 10 bei einer Konzentration von 150 µM. In der statistischen Gegenüberstellung der beiden Konzentrationen, lässt sich weiterhin eine deutlich stärkere Verminderung der Externalisierung von Phosphatidylserin durch 150 µM eruieren (Abbildung 4).

Die Daten der Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials, stützen weiterhin die beschriebene Beobachtung, dass Rhosin/G04 in der Konzentration 150 µM einen signifikanten anti-apoptotischen Effekt auf kühlgelagerte Thrombozyten nach 7 und 10 Tagen aufweist. Weiterhin lassen auch die Ergebnisse der Färbung mit TMRE auf die Überlegenheit von 150 µM des Inhibitors gegenüber einer Konzentration von 75 µM schließen (Abbildung 8).

Ergänzend zu den genannten Färbungen, welche Rückschlüsse auf das Voranschreiten der Apoptose zulassen, wurde mit Calcein ein Marker eingesetzt, der die Lebensfähigkeit von Zellen darstellt. Die Betrachtung der Ergebnisse

ermöglicht die Feststellung eines signifikant höheren Anteils lebensfähiger Thrombozyten, bei mit G04 behandelten Proben bis einschließlich Tag 10. Während sowohl an Tag 7, als auch an Tag 10 für die Konzentration 75  $\mu\text{M}$  des RhoA-Inhibitors ein signifikant höherer Prozentsatz lebensfähiger Zellen gefunden wurde, zeigte sich für die Konzentration 150  $\mu\text{M}$  eine hochsignifikante Differenz an Tag 10 (Abbildung 9). Rückschließend ist die Inhibition der Apoptose in stärkerem Maße durch die Konzentration 150  $\mu\text{M}$  des Inhibitors anzunehmen.

Basierend auf den hier beschriebenen Ergebnissen scheint es plausibel, dass die Apoptose kühlgelagerter Thrombozyten durch den RhoA-Inhibitor G04 inhibiert werden kann, wobei 150  $\mu\text{M}$  als die effektivste Konzentration über einen Zeitraum von 10 Tagen angenommen werden kann. Dies ist in gewissem Maße vereinbar mit den Resultaten von Hegde et al., welche 2019 eine verminderte Phagozytose kühlgelagerter Thrombozyten und somit längere Überlebensdauer *in vivo*, durch den RhoA-Inhibitor G04 *in vitro* feststellen konnten. Unterschiede zur vorliegenden Arbeit fanden sich in den verwendeten Markern, aufgrund einer sich auf lagerungsbedingte Läsionen und hämostatische Funktionalität beziehenden Fragestellung. Auch wurde die von Hegde et al. verwendete Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von 14 Tagen gemessen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im tierexperimentellen Rahmen.

#### 4.2 Forskolin

Nach Auswertung der Messdaten zur Fragestellung einer potenziellen Apoptoseinhibition durch den Proteinkinase A-Aktivator Forskolin, kann sowohl für die Konzentration 0,75  $\mu\text{M}$ , als auch für 1  $\mu\text{M}$  jener zu untersuchende anti-apoptotische Effekt angenommen werden. Es konnte eine Inhibition der Apoptose kühlgelagerter (4°C) Thrombozyten bis zum Ende des Messzeitraums von 10 Tagen nachgewiesen werden.

Eine verminderte Externalisierung von Phosphatidylserin, abgebildet durch den Anteil Annexin-positiver Zellen, konnte mit statistischer Signifikanz für beide Konzentrationen nach 7 und 10 Tagen nachgewiesen werden (Abbildung 10). Folglich ist ein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Forskolin und

verminderter Apoptoseinduktion kühlgelagerter Thrombozyten wahrscheinlich. Im direkten Vergleich stellte sich die Differenz zum Anteil der gemessenen Annexin-positiven, demnach apoptotischen Zellen, als nicht signifikant heraus. Der anti-apoptische Effekt scheint daher vergleichbar zwischen den untersuchten Konzentrationen des Proteinkinase A-Aktivators, mit etwaiger Überlegenheit der Konzentration 0,75  $\mu\text{M}$ .

Durch die Färbung mit TMRE zur Darstellung des mitochondrialen Membranpotenzials, konnte ebenfalls für beide Konzentrationen eine geringere apoptotische Aktivität beobachtet werden. Die Ergebnisse der Färbung führen zur Annahme, dass durch die Behandlung mit Forskolin eine Inhibition der Apoptose der untersuchten Thrombozyten erreicht werden kann. Weiterhin legen die Daten der TMRE-Färbung nahe, dass diese Verminderung der Apoptoseaktivität in stärkerem Umfang durch die Konzentration 1  $\mu\text{M}$  zu erreichen ist (Kapitel 3.2.2).

Lebensfähige Thrombozyten wurden durch Färbung mit Calcein dargestellt, mithilfe dessen die zuvor beschriebenen Messungen ergänzt und deren Aussagekräftigkeit erhöht werden konnte. Die erläuterten Beobachtungen der apoptoseinhibierenden Wirkung von Forskolin auf 4°C-gelagerte Thrombozyten konnten weiter gestützt werden, was für einen Zeitraum von 10 Tagen mit statistischer Relevanz durch beide Konzentrationen zu erreichen scheint. Hierbei konnte eine stärkere Lebensfähigkeit bei mit 0,75  $\mu\text{M}$  Forskolin inkubierten Zellen bemerkt werden.

Die Zusammenschau der Ergebnisse aller Färbungen ermöglicht die Annahme, dass Forskolin die Apoptose kühlgelagerter Thrombozyten für eine Zeitraum von mindestens 10 Tagen deutlich und mit hoher Wahrscheinlichkeit inhibiert. Was im Einklang mit den Ergebnissen von Zhao et al. ist, wo eine erkennbare anti-apoptische Wirkung mit 10  $\mu\text{M}$  Forskolin, jedoch für kürzere Lagerungszeiten, bewiesen werden konnte <sup>41</sup>. Die eindeutige Feststellung einer überlegenen Konzentration scheint, beurteilt an den vorliegenden Daten, nicht sicher möglich.

### 4.3 Z-LEHD-FMK

Der vorliegenden Arbeit vorausgehend, wurde mit 40  $\mu\text{M}$  bereits die optimale Konzentration des Caspase 9-Inhibitors Z-LEHD-FMK durch Irene Marini eruiert. Die Feststellung einer effektivsten Konzentration ist folglich nicht Teil dieser Arbeit. Als Erweiterung wurde die Wirkung des Caspase 9-Inhibitors Z-LEHD-FMK, während der Kühlung analysiert und mit den anderen beiden Inhibitoren verglichen.

Anhand der Annexin-Färbung konnte am Ende des Messzeitraums ein hochsignifikant geringerer Anteil an Thrombozyten mit externalisiertem Phosphatidylserin gemessen werden, wodurch darauf geschlossen werden kann, dass Z-LEHD-FMK in der Konzentration 40  $\mu\text{M}$  eine Apoptoseinhibition 4°C-gelagerter Thrombozyten bewirkt, welche für ein Zeitfenster von mindesten 10 Tagen besteht (Abbildung 10).

Im Gegensatz dazu konnte, basierend auf den Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials, kein signifikanter anti-apoptotischer Effekt bestätigt werden. Nichtsdestotrotz konnte eine Tendenz zu einem höheren Verhältnis von  $\Delta\Psi\text{m}$  in Gegenwart des Caspase-9-Inhibitors beobachtet werden (Abbildung 14).

Wiederum deutet ein signifikant höherer Anteil lebensfähiger, Calcein-positiver Thrombozyten nach 7 und 10 Tagen auf die im Abschnitt zur Annexin-Färbung beschriebene anzunehmende Apoptoseinhibition durch mit 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK behandelte, kühlgelagerte Thrombozyten hin.

Insgesamt konnten zwei der drei durchgeführten Testungen die Annahme aufkommen lassen, dass durch 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK ein anti-apoptotischer Effekt hervorgerufen werden kann, während ein dritter Test keinen Anhalt zur weiteren Verifizierung dieser Annahme des anti-apoptotischen Potenzials zulässt.

### 4.4 Vergleich der Inhibitoren

Mit Rhosin (G04), Forskolin und Z-LEHD-FMK wurden drei Substanzen untersucht, deren Angriffspunkte unterschiedliche Schlüsselenzyme, sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Funktion, zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf

der intrinsischen Apoptose von Thrombozyten darstellen. Entsprechend der Unterschiedlichkeit Ihrer Substrate und deren Einfluss auf die Kaskade der intrinsischen Apoptose, würde es nahe liegen keine übereinstimmenden Resultate hinblickend des Nachweises und Ausmaßes eines anti-apoptotischen Effektes durch die potenziellen Apoptoseinhibitoren (in verschiedenen Testungen) zu erhalten. Die Ergebnisse aller durchgeführten Messungen dieser Arbeit betrachtend, kann diese Annahme gestützt werden. Während die ausgewerteten Daten für alle untersuchten Substanzen auf einen anti-apoptotischen Effekt auf bei 4°C gelagerte Thrombozyten für einen 10-tägigen Zeitraum hindeuten, fanden sich Unterschiede sowohl in der Stärke dieses Effektes als auch des Nachweises einer signifikanten Differenz zur Kontrollprobe. Sinnvoll erscheint die Betrachtung insbesondere zum Ende des Messzeitraums nach 10 Tagen, da jene Substanz und Konzentration, welche auf Dauer die stärkste Apoptoseinhibition und den effektivsten Zellerhalt lebensfähiger Thrombozyten erwirkt, die am ehesten zu bevorzugende, hinblickend der Vorteile einer längeren Lagerungsdauer darstellen könnte.

Die Externalisierung von Phosphatidylserin scheint durch alle drei Substanzen, in allen ihren untersuchten Konzentrationen, in signifikanter Stärke vermindert worden zu sein. Schlussfolgernd kann die Inhibition der Apoptose, dargestellt durch Reduzierung des Apoptosemarkers, in signifikanter Weise angenommen werden. Es erscheint plausibel zu erwägen, dass sowohl Rhosin/G04 als auch Forskolin und Z-LEHD-FMK einen anti-apoptotischen Effekt erwirken, welcher für einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen anhält. Auch wenn sich bei Betrachtung des genauen inhibitorischen Ausmaßes Differenzen zwischen den effektivsten Konzentrationen der Substanzen fanden, so stellten sich diese, in direkter statistischer Gegenüberstellung, als vorwiegend nicht signifikant heraus. Statistische Auswertungen konnten keinen eindeutig stärksten Apoptoseinhibitor darlegen. Während die Quantifizierung der Apoptoseinhibition in Prozentpunkten auf die Überlegenheit einer Behandlung mit 150 µM G04, gefolgt von 40 µM Z-LEHD-FMK, hindeutet, so wies die relative Änderung apoptotischer Zellen auf den stärksten Effekt durch 0,75 µM Forskolin und dem folgend 40 µM Z-LEHD-FMK hin.

In Anblick dieser ambivalent erscheinenden Ergebnisse, sollte die Vorgehensweise der statistischen Auswertung hinzugezogen werden, in welcher die Thrombozytenkonzentrate gepaart ausgewertet wurden. Vergleiche der relativen Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials lassen weitere Rückschlüsse auf die Effektivität der Apoptoseinhibition der drei Substanzen zu. Entgegen der Phosphatidylserin-Externalisierung, welche für G04, Forskolin und Z-LEHD-FMK auf einen mindestens signifikanten Effekt hinweist, konnte sich dies nicht mit statistischer Signifikanz für Z-LEHD-FMK in der relativen Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials widerspiegeln. Hinweise ergaben sich für 150  $\mu$ M G04 als effektivste Behandlung von Thrombozyten bei 4°C nach 10 Tagen, infolgedessen die geringste relative Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials, respektive der stärkste anti-apoptotische Effekt, beobachtet werden konnte. Auch mit 1  $\mu$ M Forskolin konnte statistische Signifikanz einer mutmaßlichen Apoptoseinhibition erreicht werden, jedoch mit geringerer Stärke, als dies für G04 möglich war, wiederum ohne statistische Signifikanz im direkten Vergleich der beiden potenziellen Inhibitoren.

Bei dem Versuch einen Erklärungsansatz für die beschriebenen Beobachtungen zu finden, lohnt sich der Blick auf die Angriffspunkte der einzelnen Substanzen. Wie zuvor erläutert (Kapitel 1.4), greifen die drei Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kaskade der intrinsischen Apoptose an. Die Rho-Kinase A wird, als spezifisches Substrat von G04, am frühesten im Verlauf der intrinsischen Apoptose durch dieses inhibiert. Es erscheint plausibel, dass, die Ergebnisse im Gesamten betrachtend, G04, aufgrund seines Angriffspunktes am weitesten Upstream aller drei Apoptoseinhibitoren, das stärkste Ausmaß einer anzunehmenden anti-apoptotischen Wirkung, darstellt. Durch den frühen Eingriff in den Ablauf der intrinsischen Apoptose könnte diese möglicherweise am effektivsten gehemmt werden. Forskolin, dessen Effekt sich ebenfalls eindrucksvoll, jedoch weniger ausgeprägt, insbesondere im Hinblick auf das mitochondriale Membranpotenzial, als G04 präsentierte, greift einige Schritte weiter Downstream ein, wobei die Proteinkinase A, als anti-apoptisches Enzym aktiviert wird. Mit G04 und Forskolin finden sich zwei Stoffe, welche ihre Wirkung, im Gegensatz zu Z-LEHD-FMK, primär der Freisetzung mitochondrialer

Komponenten infolge von Porenbildung der Mitochondrienmembran, entfalten. Das Substrat von Z-LEHD-FMK, Caspase 9, wird hingegen am weitesten Downstream inhibiert, nachdem die mitochondriale Membran bereits geschädigt wurde. Es erscheint dementsprechend naheliegend anzunehmen, dass die Wirkung auf die Apoptose nur in geringerem Maße möglich ist als durch G04 oder Foskolin, wobei sich dies insbesondere durch die statistisch nicht signifikante Differenz des mitochondrialen Membranpotenzials, erklärt durch den Zeitpunkt des Eingriffes in die Kaskade, widerspiegelt.

#### 4.5 Limitationen der Arbeit

Es soll angemerkt werden, dass die Blutgruppen der in dieser Arbeit verwendeten Thrombozytenkonzentrate, aus Gründen der Verfügbarkeit und generellen Knappheit der Blutprodukte, nicht einer einheitlichen Blutgruppe entsprechen konnten. Demnach können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob bei einzelnen Blutgruppen ein besseres Ansprechen der Apoptoseinhibitoren erreicht werden kann.

Weiterhin kann aufgrund des Versuchsaufbaus als *in vitro* Experiment, keine Aussage über die Toxizität der Substanzen beim Menschen getroffen werden. Es gilt im nächsten Schritt im tierexperimentellen Versuch zu klären, ob es durch Zufuhr der behandelten Thrombozytenkonzentrate zu toxischen Auswirkungen auf den Organismus kommt, um dem Ziel einer sicheren, optimierten Behandlung von PatientInnen im klinischen Alltag näher zu kommen. In Bezug auf ein potenzielles *in vivo* Experiment, sollten neben der Toxizität auch mögliche Wechselwirkungen sowie die Wirksamkeit eines entsprechenden Blutproduktes im Organismus geklärt werden. Hierbei könnte sich beispielsweise die Betrachtung der Elimination der Thrombozyten, aber auch deren Funktionalität/das Outcome als sinnvoll erweisen. Entsprechende Versuche im Tierexperiment mit der Frage nach der Apoptoseinhibition kühlgelagerter Thrombozyten im wurden/werden durch Lisann Pelzl, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, mit G04 in der Konzentration 150  $\mu$ M durchgeführt.

Der Messzeitraum, respektive Lagerungszeitraum, von 10 Tagen erwies sich, basierend auf den Ergebnissen, als eine weiterhin zu erwägende Dauer für zukünftige Experimente. Zum Ende dieses Zeitraums, konnte ein nicht unbeträchtlicher Anteil lebensfähiger Thrombozyten, insbesondere in der mit 150  $\mu\text{M}$  G04 behandelten Probe, bei einer Differenz mit statistischer Signifikanz zur unbehandelten Kontrollprobe und Vehikelkontrolle nachgewiesen werden. Die Annahme von Hegde et al., die eine potenzielle Lagerungsdauer von 14 Tagen zur Diskussion stellen, konnte demnach anhand der hier durchgeführten Färbungen und Messungen, nicht bestätigt werden <sup>47</sup>. Das Studiendesign von Hegde et al. zeigt wesentliche Abweichungen von dem hier durchgeführten (Kapitel 2.2.2), welche in dieser Gegenüberstellung nicht außer Acht gelassen werden sollten.

In dieser Arbeit wurden keine spenderspezifischen Ausschlusskriterien angewandt. Mögliche Einflüsse von außen, wie die Einnahme bestimmter Medikamente oder der Lebensstil der Spender wurden nicht überprüft und hatten keinen Einfluss auf den Einschluss in die Studie.

.

#### 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die zu Beginn gestellte Frage nach der Wirksamkeit von G04, Forskolin und Z-LEHD-FMK auf die Inhibition der Apoptose von Thrombozyten in kühlgelagerten ( $4^{\circ}\text{C}$ ) Apharese-Thrombozytenkonzentraten (A-TK) konnte geklärt werden. Es ist ein Zusammenhang zwischen der Behandlung der A-TK mit den Substanzen und der Beobachtung einer verminderten apoptotischen Aktivität anzunehmen. Die Wirksamkeit zeigt sich abhängig von der verwendeten Substanz sowie deren Konzentration. Alle Messungen und Auswertungen hinzuziehend, zeigte sich die Überlegenheit von 150  $\mu\text{M}$  G04 auf die Apoptoseinhibition von Thrombozyten in A-TK, gegenüber sowohl 75  $\mu\text{M}$  G04 als auch im Vergleich mit Forskolin und Z-LEHD-FMK. Hingegen konnten die verschiedenen Messungen keine eindeutig zu bevorzugende Konzentration von Forskolin hervorbringen. Die als am effektivsten angenommene Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  Z-LEHD-FMK war bereits zuvor durch Irene Marini bestimmt worden und nicht Teil der Fragestellung dieser



Arbeit. Der anti-apoptotische Effekt der Apoptoseinhibitoren wird für eine Dauer von ungefähr 10 Tagen angenommen.

Betrachtet man die aktuelle Versorgungssituation mit Thrombozytenkonzentraten, so steht man vor einer vielseitigen Problematik. Die Lagerung der A-TK bei Raumtemperatur entsprechend der aktuellen Leitlinien, mit einer Lagerungsdauer von maximal 4-5 Tagen, bedingt den Mangel an Blutprodukten. Diese A-TK können zudem zum Ende des Lagerungszeitraums nicht mehr für eine sichere Patientenversorgung gewährleisten, sowohl aufgrund der starken apoptotischen Aktivität der Thrombozyten, welche entsprechend auch Ihrer Funktion nicht mehr nachkommen können, aber auch da das Risiko bakterieller Besiedlung bei Raumtemperatur deutlich erhöht ist <sup>7,16</sup>. Die Chancen dieser Arbeit liegen genau in diesen Punkten. Durch die Lagerungstemperatur von 4°C zeigte sich ein ausgeprägter anti-apoptotischer Effekt, welcher eine mögliche Lagerungsdauer von 10 Tagen, bei verringertem Risiko bakterieller Vermehrung, im klinischen Alltag in Aussicht stellt. Hierdurch stünden den PatientInnen mit Thrombozytopathien und -penien A-TK mit erhöhter Sicherheit und Wirksamkeit, bedingt durch erhöhte Funktionalität bei geringerer Apoptose, zur Verfügung. Auch die Verfügbarkeit der Blutprodukte wäre aufgrund der Möglichkeit einer verlängerten Lagerungsdauer verbessert, was sowohl dem einzelnen Patienten durch weniger Versorgungsengpässe als auch dem Gesundheitssystem als Ganzes, durch eine Verringerung der Kostenbelastung, zugutekäme. Um dem Ziel des Erreichens der genannten Zukunftsperspektiven näher zu kommen, zählt es nun die weiterhin bestehenden Fragen zu klären, zu denen unter anderem die Frage nach Toxizität, Wechselwirkungen und der Wirksamkeit zunächst auf Tiere und potenziell sequentiell auf Menschen mit Ausblick auf Anwendung im klinischen Alltag. Sollte dies gelingen, ergibt sich die Perspektive einer bedeutenden Entlastung des Gesundheitssystems durch die verbesserte Versorgung von PatientInnen und eine verminderte Belastung der Kostenträger.

## 5. Zusammenfassung

Apharese-Thrombozytenkonzentrate (A-TK) können, entsprechend aktueller Leitlinien, unter kontinuierlicher Bewegung durch Agitatoren, bei Raumtemperatur für eine maximale Dauer von 4 bis 5 Tagen gelagert werden. Durch die Lagerungsbedingungen werden gefürchtete, wenn auch seltene, Komplikationen wie transfusionsbedingte bakterielle Infektionen (TBBI) begünstigt. Konzepte, wie die Kühllagerung der A-TK, sollen die Vorteile einer verlängerten Lagerungsdauer bei gleichzeitiger Reduktion des Kontaminationsrisikos verbinden. Basierend auf Hinweisen einer verstärkten Apoptoseinduktion der Thrombozyten in A-TK durch eine Lagerungstemperatur von 4°C, wurde die Fragestellung der vorliegenden Arbeit entwickelt.

Es sollte geklärt werden, ob die Substanzen G04, Forskolin und Z-LEHD-FMK die intrinsische Apoptose kühlgelagerter Thrombozyten in A-TK inhibieren. Weiterhin sollte neben der jeweils effektivsten Konzentration, die Dauer einer etwaigen Apoptoseinhibitor bestimmt werden. Um die Substanzen und deren Effekte zu vergleichen, wurden Thrombozyten von gesunden Blutspendern separat mit jedem Inhibitor behandelt. Jede Proben-Gruppe wurde über einen Zeitraum von 0 bis 10 Tagen bei 4 °C inkubiert, wobei in bestimmten Tagesabständen Proben für die Analyse mittels Durchflusszytometrie entnommen und mit Puffer- oder lösungsmittelbehandelten Kontrollen verglichen wurden.

Für alle der drei untersuchten Substanzen, wird ein anti-apoptischer Effekt auf Thrombozyten in A-TK bei 4°C-Lagerung für einen Zeitraum von 10 Tagen angenommen. In Zusammenschau aller Daten lässt sich die Konzentration 150 µM des Rhokinase A-Inhibitors G04 als überlegen sowohl 75 µM G04, als auch den anderen Apoptoseinhibitoren gegenüber erweisen, ohne das Bestehen statistischer Signifikanz. Zwischen den getesteten Konzentrationen des Proteinkinase A-Aktivatoren, Forskolin, lässt sich keine eindeutig effektivere Konzentration feststellen. Um das mögliche Potenzial einer Verdopplung der Lagerungsdauer von A-TK bis zu 10 Tagen sowie die Senkung Risikos von Komplikationen wie TBBI auszuschöpfen, gilt es im Weiteren die Toxizität,

Wechselwirkungen und Wirksamkeit der effektivsten Substanz im Rahmen von *in vivo* Experimenten zu klären. Es ergibt sich zukunftsprospektiv die Chance einer optimierten, sichereren Patientenversorgung, sowie einer Entlastung des Gesundheitssystems durch Verbesserung von Versorgungsengpässen und Einsparung finanzieller Ressourcen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Gesamtnovelle 2020*. (Deutscher Ärzteverlag, 2021). doi:10.47420/9783769137309.
2. Richtlinie Hämotherapie. 105 (2017).
3. Thiele, T. Thrombozytentransfusion bei hämatologisch-onkologischen Patienten. *InFo Hämatol. Onkol.* **23**, 31–35 (2020).
4. Kirchmaier, C. M. & Pillitteri, D. [Congenital thrombocytopathies]. *Internist* **51**, 1109–1114, 1116–1117 (2010).
5. Thiele, T. & Greinacher, A. Platelet Transfusion in Perioperative Medicine. *Semin. Thromb. Hemost.* **46**, 50–61 (2020).
6. Magron, A., Laugier, J., Provost, P. & Boilard, E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets* **29**, 2–8 (2018).
7. Levy, J. H., Neal, M. D. & Herman, J. H. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Crit. Care Lond. Engl.* **22**, 271 (2018).
8. Bolton-Maggs, P. H. B. & Cohen, H. Serious Hazards of Transfusion (SHOT) haemovigilance and progress is improving transfusion safety. *Br. J. Haematol.* **163**, 303–314 (2013).
9. Kleinman, S., Reed, W. & Stassinopoulos, A. A patient-oriented risk-benefit analysis of pathogen-inactivated blood components: application to apheresis platelets in the United States. *Transfusion (Paris)* **53**, 1603–1618 (2013).
10. Research, C. for B. E. and. Bacterial Risk Control Strategies for Blood Collection Establishments and Transfusion Services to Enhance the Safety and Availability of Platelets for Transfusion. *U.S. Food and Drug Administration* <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bacterial-risk-control-strategies-blood-collection-establishments-and-transfusion-services-enhance> (2022).
11. Hong, H. *et al.* Detection of septic transfusion reactions to platelet transfusions by active and passive surveillance. *Blood* **127**, 496–502 (2016).
12. Murphy, W. G. *et al.* Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox Sang.* **95**, 13–19 (2008).

13. Pearce, S., Rowe, G. P. & Field, S. P. Screening of platelets for bacterial contamination at the Welsh Blood Service. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **21**, 25–32 (2011).
14. Grossman, B. J. *et al.* Screening blood donors for gastrointestinal illness: a strategy to eliminate carriers of *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion (Paris)* **31**, 500–501 (1991).
15. Korte, D. de & Marcelis, J. H. Platelet concentrates: reducing the risk of transfusion-transmitted bacterial infections. *Int. J. Clin. Transfus. Med.* **2**, 29–37 (2014).
16. Palavecino, E. L., Yomtovian, R. A. & Jacobs, M. R. Detecting bacterial contamination in platelet products. *Clin. Lab.* **52**, 443–456 (2006).
17. Mundt, J. M., Rouse, L., Van den Bossche, J. & Goodrich, R. P. Chemical and Biological Mechanisms of Pathogen Reduction Technologies. *Photochem. Photobiol.* **90**, 957–964 (2014).
18. Corash, L. & Benjamin, R. J. The role of hemovigilance and postmarketing studies when introducing innovation into transfusion medicine practice: the amotosalen-ultraviolet A pathogen reduction treatment model. *Transfusion (Paris)* **56**, S29–S38 (2016).
19. Lozano, M. *et al.* A multi-centre study of therapeutic efficacy and safety of platelet components treated with amotosalen and ultraviolet A pathogen inactivation stored for 6 or 7 d prior to transfusion. *Br. J. Haematol.* **153**, 393–401 (2011).
20. McCullough, J. *et al.* Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* **104**, 1534–1541 (2004).
21. Estcourt, L. J. *et al.* Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *Cochrane Database Syst. Rev.* **7**, CD009072 (2017).
22. Waters, L., Cameron, M., Padula, M. P., Marks, D. C. & Johnson, L. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation: an updated perspective on platelet storage conditions. *Vox Sang.* **113**, 317–328 (2018).
23. Murphy, S. & Gardner, F. H. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--deleterious effect of refrigerated storage. *N. Engl. J. Med.* **280**, 1094–1098 (1969).
24. Becker, G. A., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M. K. & Aster, R. H. Studies of platelet concentrates stored at 22 C nad 4 C. *Transfusion (Paris)* **13**, 61–68 (1973).

25. Shea, S. M., Thomas, K. A. & Spinella, P. C. The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: potential for personalised medicine. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **17**, 321–330 (2019).
26. Currie, L. M., Harper, J. R., Allan, H. & Connor, J. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion (Paris)* **37**, 18–24 (1997).
27. Johnson, L., Tan, S., Wood, B., Davis, A. & Marks, D. C. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion (Paris)* **56**, 1807–1818 (2016).
28. Wood, B., Padula, M. P., Marks, D. C. & Johnson, L. Refrigerated storage of platelets initiates changes in platelet surface marker expression and localization of intracellular proteins. *Transfusion (Paris)* **56**, 2548–2559 (2016).
29. Vostal, J. G. *et al.* Temperature cycling during platelet cold storage improves in vivo recovery and survival in healthy volunteers. *Transfusion (Paris)* **58**, 25–33 (2018).
30. Reddoch, K. M. *et al.* Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 °C and 22 °C. *Shock Augusta Ga* **41**, 54–61 (2014).
31. Marini, I. *et al.* Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates. *Haematologica* **104**, 207–214 (2019).
32. Montgomery, R. K., Reddoch, K. M., Evani, S. J., Cap, A. P. & Ramasubramanian, A. K. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion (Paris)* **53**, 1520–1530 (2013).
33. Stubbs, J. R. *et al.* Cold platelets for trauma-associated bleeding: regulatory approval, accreditation approval, and practice implementation-just the ‘tip of the iceberg’. *Transfusion (Paris)* **57**, 2836–2844 (2017).
34. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59 (2008).
35. McArthur, K., Chappaz, S. & Kile, B. T. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood* **131**, 605–610 (2018).
36. Mason, K. D. *et al.* Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* **128**, 1173–1186 (2007).
37. Julien, O. & Wells, J. A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* **24**, 1380–1389 (2017).

38. Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. & Kurokawa, M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **327**, 43–87 (2016).
39. Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**, 393–403 (2005).
40. Kelly, P. N. *et al.* Individual and overlapping roles of BH3-only proteins Bim and Bad in apoptosis of lymphocytes and platelets and in suppression of thymic lymphoma development. *Cell Death Differ.* **17**, 1655–1664 (2010).
41. Zhao, L. *et al.* Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 4338–4351 (2017).
42. van der Wal, D. E. *et al.* Platelet apoptosis by cold-induced glycoprotein Iba clustering. *J. Thromb. Haemost. JTH* **8**, 2554–2562 (2010).
43. Kim, B.-J., Ryu, S.-W. & Song, B.-J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 21256–21265 (2006).
44. Badlou, B. A. *et al.* Role of glycoprotein Iba in phagocytosis of platelets by macrophages. *Transfusion (Paris)* **46**, 2090–2099 (2006).
45. Shang, X. *et al.* Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* **19**, 699–710 (2012).
46. Li, Z. *et al.* Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat. Cell Biol.* **7**, 399–404 (2005).
47. Hegde, S. N. *et al.* RhoA Targeting Suppresses Cold-Induced Platelet Lesion and Allows Refrigerated Storage of Functional Human Platelets to Fourteen Days. *Blood* **134**, 99 (2019).
48. Ding, X. & Staudinger, J. L. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 849–856 (2005).
49. Mullani, N. *et al.* Caspase-9 inhibitor Z-LEHD-FMK enhances the yield of in vitro produced buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-implantation embryos and alters cellular stress response. *Res. Vet. Sci.* **104**, 4–9 (2016).

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Transfusionsmedizin unter Betreuung von Frau Irene Marini und Herrn Prof. Dr. med. Tamam Bakchoul, Institutsleiter, durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Tamam Bakchoul und Frau Irene Marini.

Ich, Chiara-Tanita Mättler, habe die Versuche geplant und durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Die Funktionalität der Thrombozyten, welche nicht in diesem Manuskript enthalten ist, wurde durch Yoko Tamamushi zur selben Zeit erforscht.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die kritische Revision des Manuskripts erfolgte durch Irene Marini.

Teile der dargestellten Daten wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

ARTICLES

### **Inhibition of GPIIb- $\alpha$ -mediated apoptosis signaling enables cold storage of platelets**

Irene Marini, Lisann Peitzl, Yoko Tamamushi, Chiara-Tanita Maettler, Andreas Witzemann, Karina Althaus, Stefanie Nowak-Harnau, Erhard Selfried, Tamam Bakchoul

Haematologica Early view Jun 22, 2023 <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.282572>



## **Danksagung**

Zum Ende möchte ich mich insbesondere bei meiner Mutter bedanken, für Ihre vielseitige Unterstützung und dafür immer an mich geglaubt zu haben.

Ein großer Dank gebührt zudem meinem Opa, für seine aufmunternden und einzigartigen Worte, die mich so oft aufgebaut haben.

Danke an zwei der wichtigsten Menschen in meinem Leben. Hanna, ich könnte mir keine bessere Freundin vorstellen. Ken, mein liebster Partner für Sternenregen, der unermesslich viel Magisches in meine Welt bringt.

Zuletzt auch ein Dank an meinen Doktorvater, Prof. Dr. Tamam Bakchoul, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung sowie die Möglichkeit einen Einblick in die Forschungsarbeit zu erhalten. Sowie ein Dank an Irene Marini, für die Betreuung auf diesem Weg.